



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala**



INVESTIGACION DE LA FRECUENCIA DE GASTROENTERITIS  
POR ROTAVIRUS EN PACIENTES DE LA CONSULTA EXTERNA  
DE DOS CLINICA DEL IMSS  
( Clínicas 19 y 22 )

---

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

**P R E S E N T A**

**EVA FRAGOSO CURIEL**

---

IZTACALA, EDO. DE MEX. 1991

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Por su gran amor y por todo  
lo que me han dado.

A TODOS MIS FAMILIARES Y AMIGOS:

Que consecuentaron mi forma de -  
ser, y me estimularon hacia el -  
logro.

A MI ABUELA:

Que en vida, participó  
de mis realizaciones y  
descaba como yo este -  
momento.

## A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco a todo el personal del Departamento de Virología y Bacteriología de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, del Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S.) por haber hecho posible la realización de este trabajo. Asimismo, al personal de las Clínicas 22 de San Jerónimo y 19 de Coyoacán, por su orientación y ayuda en la obtención de las muestras.

A QUIEN CONSULTE ESTE TRABAJO ....  
EN FORMA MUY ESPECIAL,  
YA QUE  
ES LA FINALIDAD DEL MISMO  
QUE LE SEA DE PROVECHO;  
QUE LO CRITIQUE Y LO ENRIQUEZCA.

Y FINALMENTE, A DIOS GRACIAS .....

EN MI CONCEPTO QUE TENGO DE EL:

IDENTIDAD UNIVOCA Y EQUIDISTANTE;

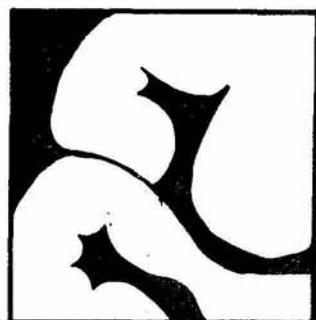
NATURALEZA INOBJETABLE E INEXPLORABLE;

PRESENCIA LATENTE E INVISIBLE;

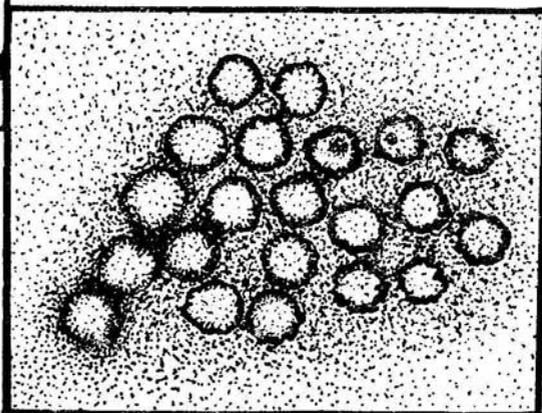
CULMINACION Y PRINCIPIO;

.....

SUBUNIVERSO INMERSO Y UNIVERSO.



INVESTIGACION DE LA FRECUENCIA DE  
GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS  
EN PACIENTES DE LA CONSULTA EXTERNA  
DE DOS CLINICAS DEL IMSS  
(Clínicas 19 y 22).



Viriones característicos del "rotavirus".  
Dibujo tomado de: Fenner White, Virología Médica. 1984

"En los primeros días de la nueva era, las enfermedades infecciosas fueron vistas como claras contiendas entre el huésped y el agente infeccioso. Los microorganismos entraban, se multiplicaban y eran controlados y muertos, y si no, el huésped sucumbía. Ahora nosotros sabemos que en muchas enfermedades un nuevo tipo de equilibrio se establece en el cual el microorganismo permanece en algún lado en el huésped y está listo a multiplicarse nuevamente cuando éste se descuida".

EVA FRAGOSO C.

## R E S U M E N

Con el objeto de conocer la etiología y frecuencia relativa de los rotavirus así como las características clínicas de la diarrea aguda en pacientes ambulatorios que acuden a la consulta externa, se procedió a estudiar a 374 enfermos (47 con diarrea con sangre en heces y 327 sin ella) y a 96 sujetos testigo. Se les practicó: a) un cuestionario precodificado para conocer su sintomatología; b) exploración física incluyendo peso a los menores de 5 años; c) recolección de una muestra de materia fecal el día de la consulta en la clínica para ELISA para rotavirus, coprocultivo, estudio de moco fecal y frotis para búsqueda de otros microorganismos.

El 52.1% de los pacientes eran mayores de 15 años de edad, el 74.5% acudían a la consulta en los primeros tres días de evolución del padecimiento y el 12.6% presentaban sangre en las evacuaciones. El 12.8% tenía deshidratación leve y el 27.8% desnutrición de 1 grado.

La frecuencia de identificación de microorganismos en los pacientes fue: E. coli citotóxica 24.8%, E. coli toxigénica (LT) 13.9% Shigella spp. 12.3%, E. coli enteropatógena 8.9% y Rotavirus 7.0%. Otros gérmenes se aislaron en menos del 5% de los casos. Entamoeba histolytica se identificó en sólo 4 casos (1.1%). No se encontraron microorganismos potencialmente patógenos en el 40.1%. Al comparar con la frecuencia de identificación en los sujetos testigo, sólo se observó una diferencia significativa en Shigella (12.3% vs. 3.1%,  $p < 0.05$ ). En los pacientes con diarrea con sangre se encontró con mayor frecuencia Shigella y amiba, que en aquellos con diarrea sin sangre (42.5% y 8.5% vs. 4.9% y 0.0%,  $p < 0.05$ ). En los niños menores de 2 años se identificó más frecuentemente Rotavirus (13.3%) y E. coli toxigénica (19.0%) que en los adultos (5.8% y 10.0%). Shigella se aisló predominantemente en preescolares (22.0%) y escolares (17.4%). Los pacientes en los que se identificó Rotavirus presentaron más frecuentemente vómito (46.2%), eritema glúteo (22.2%) y deshidratación (13.3%); mientras que aquellos son Shigella tuvieron con mayor frecuencia fiebre (63.0%) y sangre en heces (43.4%).

Se considera que los Rotavirus y otros gérmenes identificados en los pacientes ambulatorios del área urbana son semejantes a los encontrados en sujetos hospitalizados; sin embargo, en este tipo de población, por el número elevado de portadores asintomáticos, la identificación de microorganismo potencialmente patógeno no permite afirmar que éste sea realmente el agente causal, con la excepción de la identificación de trofozoitos de E. histolytica, por un observador experimentado. Se hace énfasis en que la decisión terapéutica debe basarse predominantemente en los datos clínicos y en que de éstos, la presencia de sangre en las evacuaciones es el mejor indicador.

## ABSTRACT

With the aim of knowing the etiology and frequency relative about Rotavirus so the clinical characteristics of acute diarrhea in ambulatory patients attending two out-patient clinics, we proceeded the study of 374 cases (47 with diarrhea and blood in their stools and 327 - - - without it) and 96 controls. To them: a) a precodified questionnaire - was applied in order to know their symptomatology; b) a detailed physical examination including the weight of those under the age of five; c) collection of samples of fecal material the same day of the - - - consultation in order to do: stool culture, ELISA for rotaviruses, - - studies of the fecal mucus, and amears to search for other - - - - - microorganisms.

52.1% of the patients were older than 15 years of age, 74.5% - - - attended consultation on the first three days of clinical course of - - their disease and 12.6% presented blood in their stools. 12.8% had - - slight dehydration and 27.8% first-degree malnutrition.

The frequency of identification of microorganisms in the patient was: citotoxic E. coli 24.8%, toxigenic E. coli 13.9% (LT), Shigella spp. 12.3%, enteropathogen E. coli 8.9% and Rotavirus 7.0%. Other - - germs were isolated in less than 5% of cases. Entamoeba histolytica - was identified in only 4 cases (1.1%). In 40.1%, potentially pathogen microorganisms were not found. When comparing with the frequency of - - identification in the control individuals, significant difference, - - only was found with Shigella (12.3% vs. 3.1%,  $p < 0.05$ ). In the patients with diarrhea with blood a higher percentage of shigella and ameba, - - was found than in those with diarrhea without blood (42.5% and 8.5% - - vs. 4.9 and 0.0%  $p < 0.05$ ). In children of less than two years of age - - Rotavirus was more frequently identified (13.3%) and toxigenic E. coli (19.0%) than in adults (5.8% and 10.0%). Shigella was mainly isolated in preschoolers (22.0%) and scholars (17.4%). Patients in whom Rotavirus was isolated presented vomiting mor frequently (46.2%), gluteal - - erythema (22.2%) and dehydration (13.3%); while those with Shigella - - had a higher frequency of fever (63.0%) and blood in their feces - - (43.4%).

It is considered that Rotavirus and other identified germs in the ambulatory patients of the urban area, are similar to those found in - hospitalized patients; however, in this type of population, due to the elevated number of asymptomatic carriers, the identification of a - - potentially pathogen microorganism does not allow the affirmation - - that it really is the etiologic germ (with the exception of the - - - identification of E. histolytica trophozoites, seen by an skilled - - observer). An emphasis is done to show that the therapeutic decision - must be predominatly based on clinical data, and, among these, the - - presence of blood in the stools, is the best indicator.

## I N D I C E

	Págs.
Introducción .....	1
Antecedentes Históricos .....	5
Hallazgos Clínicos .....	11
Hallazgos Anatomopatológicos .....	12
Incidencia .....	14
Inmunidad y Serología .....	16
Variaciones Estacionales .....	20
Transmisión .....	21
Otras Diarreas Virales .....	23
Diagnóstico de Laboratorio .....	33
Material y Métodos .....	42
Resultados .....	45
Discusión de Resultados .....	52
Tratamiento .....	56
Prevención y Control de las Enfermedades Diarreicas .....	59
Métodos de Control y Prevención de las Enfermedades Diarreicas .....	71
Comentarios .....	75-83
Bibliografía.	

## INTRODUCCION.

Como parte de un estudio para mejorar los esquemas terapéuticos utilizados por los médicos familiares en los pacientes con diarrea aguda (DA) (1), se procedió a identificar en heces fecales a los rotavirus y otros microorganismos potencialmente patógenos. Los resultados obtenidos se utilizaron, principalmente, para evaluar el esquema terapéutico tipo algoritmo, basado exclusivamente en datos clínicos. Sin embargo, se ha considerado de interés mostrar los hallazgos microbiológicos y su correlación clínica, debido a las diferentes características de la población estudiada, en comparación con la mayoría de las investigaciones realizadas en México y en otros países (2,3): a) los pacientes incluidos en este estudio no estaban hospitalizados y por lo tanto no tenían complicaciones de gravedad, b) la investigación no se concretó a los niños menores de 5 años, sino que abarcó a todos los grupos de edad, tal como se observa en la consulta diaria de las clínicas de Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (4) y c) el estudio fue realizado en un área urbana.

De este modo, la presente investigación, muestra como la gastroenteritis infecciosa aguda (GIA) ocupa uno de los primeros lugares de morbi-letalidad en el mundo, especialmente en menores de cinco años, por lo que es de gran importancia realizar estudios que nos permitan conocer la prevalencia de los nuevos agentes de los cuadros diarreicos de diferentes edades.

Se menciona que el problema es más grave en países en desarrollo donde la contaminación fecal-oral es más intensa. De acuerdo a una evaluación efectuada en el lapso de 1977 a 1978 (5) en las áreas de Asia, Africa y Latino América, se registraron entre 3 a 5 millones de casos de GIA que culminaron en defunciones.

En la República Mexicana la GIA ocupa el segundo lugar en morbilidad, con 3'204,415 casos notificados durante 1985 (6), con una prevalencia lápsica de 16.3% en los niños menores de cinco años y un promedio de 4.9% de episodios diarreicos por niño por año (7).

En los últimos años se han realizado grandes avances en el campo de la etiofisiopatología y epidemiología de la GIA. Esta información ha tenido un impacto sobre el manejo de las infecciones diarreicas agudas en áreas desarrolladas, pero en las regiones en proceso de desarrollo ha sido relativamente difícil promover esquemas adecuados para su tratamiento o manejo e inclusive no se cuenta con el conocimiento de la prevalencia de los diversos agentes etiológicos de la diarrea en el área.

Dentro de la GIA, la de etiología viral es extremadamente común, afecta a todos los grupos de edad y ocurre tanto en la forma epidémica como endémica. Estudios prospectivos de gastroenteritis aguda en la población en general han esta-

blecido consistentemente la etiología en aproximadamente el 60% de los casos y se presume que la mayor parte de los casos de etiología desconocida pudieran ser de origen viral.

Los virus capaces de infectar el intestino humano, así como de causar daño local y enteritis sistémica, se han dividido en dos grupos (8): a) PATOGENOS COMPROBADOS: Rotavirus humano y virus semejantes al Norwalk. b) CANDIDATOS: Adenovirus, virus del grupo Picorna-parvovirus, Minireovirus, -Astrovirus, Calcivirus y Coronavirus.

Los virus que con mayor frecuencia se asocian con gastroenteritis son los rotavirus (9), los adenovirus no cultivables, entre ellos los tipos 40 (Dugan) y 41 (Talk) (10); varios otros virus, llamados "virus nuevos", se han reportado en años recientes como asociados a gastroenteritis como son: los agentes Norwalk-like (11), Calcivirus (12), Astrovirus (13), Coronavirus (14,15) y virus pequeños "smallround" (12), éstos últimos agentes están parcialmente caracterizados y son heterogéneos en su composición, cuya característica es que son pequeños (20-35 nm).

Se han sugerido que algunos de estos virus puedan ser patógenos de potencial importancia en una variedad de ambientes epidemiológicos y clínicos. En algunos casos ellos solamente han sido demostrados por la observación de heces diarreicas al microscopio electrónico (ME) y/o ELISA, ya que, en

su mayoría, no han sido eficientemente cultivados "in-vitro". La patogénesis, por lo cual estos agentes virales causan enfermedad (vómito y/o diarrea) es desconocida.

Recientemente informes sobre la etiología de la diarrea infecciosa aguda indicaron que los virus que ocupan el primer lugar como productores de GIA son los rotavirus, motivo por el cual, el desarrollo de esta investigación será enfocado inicialmente hacia la búsqueda de rotavirus y otros microorganismos en heces diarreicas de pacientes con GIA, provenientes de la consulta externa de dos clínicas del IMSS (19 y 22). De esta manera será posible conocer la prevalencia de estudios prospectivos y sistemáticos de la epidemiología de los rotavirus en poblaciones bien definidas de diferentes grupos de edad. Así mismo, se podrá establecer la frecuencia relativa de los rotavirus y otros microorganismos, así como la misma de portadores asintomáticos en un grupo testigo de individuos sanos.

Tal información obtenida, será esencial para poder establecer medidas apropiadas de control y manejo del paciente con "síndrome diarreico" de origen rotavírico, así como de otros microorganismos patógenos. De esta manera, la realización periódica de estudios microbiológicos en los casos con DA, proporcionará al médico un panorama epidemiológico y clínico que podrá ser de mucha ayuda para aplicarlo directamente en el tratamiento de sus pacientes.

## ANTECEDENTES HISTORICOS.

Antes del decenio de 1960 no existían pruebas fehacientes de que los virus causaran diarrea, pero la relación se sospechaba a raíz de ciertos estudios en que se administraron por vía oral, filtrados fecales con "diarrea no bacilar y no amibica" a voluntarios que contrajeron diarrea (5). Además, algunos informes esporádicos indicaban una relación estadística entre ciertos enterovirus y adenovirus y la presencia de diarrea (6,7).

Gracias a los adelantos tecnológicos de los últimos - decenios, se ha descubierto una amplia gama de agentes entéricos víricos o similares a los virus, como los rotavirus, - los virus Norwalk y tipo Norwalk, los adenovirus entéricos - (antes mencionados "no cultivables" ó "fastidiosos"), los - agentes similares a los parvovirus, los calcivirus, los astrovirus y otros virus entéricos pequeños (8). Además, se - identificaron las enterobacteriáceas y Vibrionaceae enterotoxigénicas y se descubrieron ciertos agentes como Campylobacter fetus jejuni, Aeromonas hydrophyla, Yersinia enterocolitica y Criptosporidium sp. Más del 60% de los casos con diarrea estaban relacionados con esos agentes y otros que ya se conocían (9,10).

Los rotavirus se destacan como agentes en los casos - pediátricos de diarrea atendidos en los dispensarios de los países en desarrollo (por ejemplo, Bangladesh Costa Rica y Guatemala

la) (9,11). Sin embargo, la realización prospectiva en tales países, ha demostrado que los agentes enteropatógenos bien conocidos, como *Shigella* y *Gardia lamblia*, y el agente enterotoxigénico o *Escherichia coli* desempeñan un papel relativamente más importante que los rotavirus.

La enfermedad diarreica infecciosa aguda es conocida como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en naciones en desarrollo e incluso en países desarrollados, la gastroenteritis infecciosa se cita en segundo lugar después de las infecciones respiratorias como causa de morbilidad en la infancia. Se ha demostrado que los agentes virales reconocidos durante la última década son responsables de una gran proporción en casos de diarrea. La gastroenteritis viral aguda afecta a todos los grupos etarios y puede ocurrir en forma esporádica o epidémica. Aunque la enfermedad es generalmente autolimitante, puede ser mortal en los muy jóvenes, los muy viejos o los que se encuentran desnutridos.

La infección del tubo digestivo con agentes como los enterovirus habitualmente es asintomática. Sin embargo, la replicación inicial del virus puede ser seguida por viremia con diseminación del virus a otros órganos blanco y síntomas relacionados con la infección de tejidos adicionales. En contra de sugerencias previas, los enterovirus no parecían ser responsables de una proporción significativa de enferme-

dad gastrointestinal. También era necesario hacer notar que para diversas enfermedades no diarreicas del tubo digestivo - se postulaba una etiología viral. La intususcepción ocurre - más comunmente en niños menores de 2 años y se han observado agrandamiento de ganglios linfáticos mesentéricos en el área de íleon terminal en el momento de la cirugía (14).

En 1943 Ligth y Hodes informaron un brote de diarrea en lactantes. Aislaron un agente filtrable de las heces que causó diarrea en terneros. Establecieron el período de incubación y reprodujeron la diarrea con pasajes seriados del - agente. Se describió la patología del intestino, el desarrollo de inmunidad del agente y la protección pasiva por medio de la administración de suero inmune. En ese momento no hubo confirmación de la etiología viral de la diarrea ni pudo detectarse el agente en los sistemas disponibles en cultivo de células. En 1973, cuando las partículas virales fueron vizualizadas en un biopsia duodenal por microscopía electrónica, el agente etiológico se definió como un rotavirus (15).

En la última década, ha comenzado a apreciarse que - los rotavirus son el único agente más común que causa la diarrea epidémica en niños de 6 a 24 meses. Se sabe que los rotavirus causan diarrea en potros, corderos, cerdos, conejos, ciervos, monos y otras especies. Se produce la infección experimental de animales que no son las especies de origen con muchos rotavirus (15, 16).

## ROTAVIRUS.

Los rotavirus se clasifican como miembros de la familia Reoviridae de virus animales que contienen ácido ribonucléico de cadena doble segmentada como material genético (17,18). El rotavirus tiene aproximadamente 70 nm de diámetro y su genoma se forma de 11 segmentos de RNA de doble cadena, una interna y otra externa. Su nombre deriva de la palabra latina "rota" - que significa rueda. Inicialmente también referido como: orbivirus, agente semejante y virus de la gastroenteritis infantil.

Con el microscopio electrónico se han podido distinguir en heces diarreicas dos tipos de partículas redondas: viriones "lisos" o "completos" de doble cápside y de 70 nm de diámetro y partículas "rugosas" o "incompletas" de cápside simple y de 60 a 65 nm de diámetro (19). Los rotavirus son muy resistentes a las altas temperaturas, pH ácido, solventes y detergentes no iónicos. El cloro es relativamente ineficaz como inactivador de los rotavirus, mientras que el etanol al 70% o más es muy eficaz (20).

El rotavirus de humano es morfológicamente similar y comparte ciertos antígenos con rotavirus de animales. En muestras fecales de pacientes se observan comunmente partículas de 60 nm sin envoltura externa. Al parecer esta última es necesaria para la infectividad, y el antígeno tipo específico está situada en esta capa externa de la cápside. Un antígeno grupo específico está presente en la partícula rugosa de 60 nm. El

antígeno grupo-específico es compartido por ambos tipos de rotavirus que infectan al hombre y también por rotavirus de otras especies mamíferas (21). La infección cruzada entre especies puede existir experimentalmente pero el grado en que existe en la naturaleza no está aclarado por ahora. El rotavirus permanece antigénicamente estable durante muchos años - si se mantiene a  $-20^{\circ}\text{C}$  (20).

Empleando pruebas de fijación de complemento (FC) se ha visto que se encuentra claramente relacionado con cuatro virus animales: virus de Nebraska que produce la diarrea de las terneras (NCDV), el virus que produce epizootias de diarrea en ratones lactantes (EDIM), el virus de simios (SA-11) y el agente Offal (0) de carneros y terneras. En tales pruebas, el antígeno común fijador de complemento, ha sido de gran ayuda en investigaciones serológicas que permiten poner de manifiesto infecciones en el hombre, supliendo el rotavirus que afecta al humano, ya que este último no ha sido eficientemente propagado en cultivos celulares; lo cual ha retrasado las investigaciones del mismo. Se dice que esto ha sido debido a que el cuarto gen es el que neutraliza la capacidad de los rotavirus humanos para crecer en cultivos de células y si este gen es aportado por un rotavirus bovino, el remezclado podría crecer (21).

El gen 9 codifica el antígeno neutralizante y el gen 6 codifica la mayor proteína estructural interna responsable de la especificidad de tipo. De esta manera, el hecho de que pu-

diera tipificarse un alto porcentaje de cepas indicaría que el número de serotipos diferentes podría ser limitado. Por lo tanto, se dice que es de importancia crítica obtener información adicional para definir la factibilidad de desarrollar inmunógenos protectores (22).

Las especificidades antigénicas de los rotavirus determinadas por las pruebas de fijación de complemento, ELISA (inmunoabsorción Enzimática) e inmunoaderencia los divide en subgrupos; mientras que la valoración en anticuerpos neutralizantes los clasifican en serotipos. Se conocen dos subgrupos que son determinados por la migración electroforética de los segmentos 10 y 11 de ARN. El subgrupo I corresponde a migración "corta" y el subgrupo II a migración "larga", esto nos permite tipificar electroforéticamente las cepas prevalentes en una comunidad o en un medio particular, durante un período determinado. No se ha podido establecer una correlación entre el subgrupo antigénico y la virulencia (24).

Se conocen cuatro serotipos de rotavirus humanos (20,23).

#### SEROTIPO

#### C E P A S

1	Wa, KS, Kv. DBII
2	DS1, s2, KUN, 390 (I)
3	P, M, Walk 57/14, Mo, Ito. Nemoto, YO McMz (II)
4	St Thomas No. 3 y No. 4 Hosakawa, Hochi (II)

En la Gran Bretaña y Australia se ha asociado la presencia de cepas de los tipos 3 y 4 con la excreción asintomática de partículas virales y la presencia de síntomas leves en grupos de recién nacidos (24).

## HALLAZGOS CLÍNICOS.

El período de incubación de una enteritis por rotavirus varía de 1 a 7 días, aunque usualmente es menor de 48 horas. Frecuentemente el síntoma inicial es vómito y en muchas ocasiones éste precede a la aparición de la diarrea, se observa moco en un 25% de los casos y rara vez se acompaña de sangre.

Puede existir una moderada elevación de la temperatura en 30 a 50% de los pacientes. La deshidratación en la diarrea por rotavirus es principalmente isotónica, ocasionalmente hipertónica y excepcionalmente hipotónica (28).

En Japón, la infección por rotavirus se ha asociado en algunas ocasiones con diarrea grave caracterizada por heces de color blanquecino (hakuri).

Las infecciones por rotavirus producen un espectro de respuesta clínica que varían de una infección subclínica, diarrea moderada o grave y ocasionalmente con deshidratación letal. Los factores que pueden causar la muerte, son la deshidratación y el desequilibrio electrolítico. El intervalo de duración de considerar a la enfermedad es de 5 a 7 días, tiempo en que se presenta la mayor excreción del rotavirus, aún cuando en ocasiones su presencia en las heces puede detectarse hasta después de 10 días. Los adultos que son infectados con rotavirus pueden presentar diarrea moderada y frecuentemen

te cursan con una infección subclínica. Por razones desconocidas, los recién nacidos que son infectados con rotavirus son a menudo asintomáticos o presentan un cuadro clínico leve (30,31).

Los rotavirus pueden producir una infección asintomática crónica en niños inmunodeficientes con una excreción prolongada del virus. Este mismo fenómeno ha sido observado en pacientes que han sufrido trasplantes de médula ósea (32). Una asociación temporal de infección con rotavirus ha sido descrita en enfermedades aisladas o como simples brotes en padecimientos como: invaginación, púrpura Henöch-Shoenlein, sangrado gastrointestinal, síndrome de Reye, encefalitis, meningitis - aséptica, síndrome urémico-hemolítico, coagulación intravascular, síndrome de muerte súbita del recién nacido, exantema súbito, síndrome de Kawasaki, enterocolitis necrosante y gastroenteritis hemorrágica en guarderías, así como diarrea crónica o aborto (30).

Sin embargo, el estudio de anticuerpos apoya la observación de que la infección por rotavirus, está únicamente asociada con el síndrome "diarrea-fiebre-vómito" (24).

#### HALLAZGOS ANATOMOPATOLOGICOS.

La infección por rotavirus al parecer está limitada a la capa de células epiteliales del intestino delgado. La fisiopatología de la diarrea por este virus ha sido estudiada en terneras gnobióticas, a las cuales se les suprime la toma de calostro. Las biopsias de intestino delgado muestran que el tejido al que se dirige el rotavirus es el epitelio veloso y las célu--

las cilíndricas en las que se detecta replicación viral por inmunofluorescencia, son reemplazadas rápidamente por células - cuboidéas no fluorescentes. En el ser humano ocurren cambios histopatológicos similares: acortamientos y edema de las vellosidades, infiltración mononuclear en la lámina propia, obser--vándose partículas virales fácilmente reconocibles en las cisternas distendidas del retículo endoplásmico rugoso (37,8,30).

La regeneración del epitelio se inicia entre los 5 y 7 días después del comienzo de la diarrea, 10 ó 15 días después de la terminación de la enfermedad, el aspecto de las vellosidades es casi normal (8). La diarrea resulta de la denudación inherente, atrofia a las vellosidades y la disminución evidente de la capacidad de absorción de los enterocitos. Puede demostrarse experimentalmente alteración en la absorción de glucosa y D-xilosa, disminución de la concentración de disacáridos y alternación de la actividad de timidina-cinasa, sin modificación de AMP-cíclico y adenilato-ciclasa (38).

La absorción y la digestión son gravemente afectadas, al grado que permita la deshidratación oral exitosa de sal y - azúcar (8).

Los rotavirus también han sido asociados con infecciones respiratorias en algunas especies animales. En el hombre este tipo de infección no ha sido plenamente corroborada al - no haberse logrado su recuperación de exudado faríngeos, se-

creciones nasofaríngeas y organismos de individuos con infecciones intestinales por estos virus (30).

#### INCIDENCIA.

La gastroenteritis por rotavirus es generalmente una enfermedad de recién nacidos y menores de cinco años y tiene una distribución mundial. La frecuencia de infecciones por rotavirus va del 20 hasta el 50% de los casos de gastroenteritis y el porcentaje más alto se encuentra entre el grupo de niños 6 a 24 meses de edad, con un pico de incidencia de los 9 a los 12 meses (28, 8, 30, 31).

Los datos de estudios obtenidos en población abierta son muy escasos de acuerdo con la información en diferentes ciudades del mundo, la frecuencia del rotavirus en una comunidad que presenta casos de diarrea es de aproximadamente 10 a 25% (30). Resultados similares se han obtenido en poblaciones de la República Mexicana (38, 39).

Es común la infección generalmente leve o asintomática de los hermanos mayores y los adultos que están en contacto con los niños infectados por rotavirus. La infección de los niños recién nacidos durante la primera o segunda semana de vida presenta casos frecuentes de excretores asintomáticos o neonatos con síntomas de infección intestinal leve, fenómeno que puede persistir de manera endémica. Probablemente este tipo de infección se adquiere en los hospitales (8,30). En es-

tos neonatos se han aislado los serotipos 3 y 4, que son lo - menos comunes (24).

Se han notificado brotes esporádicos de diarrea graves causada por rotavirus en adultos y en ancianos que se encontraban hospitalizados. En estos pacientes, la gastroenteritis puede ser signo de disminución de la inmunidad (8).

Se dispone de muy poca información sobre las tasas reales de prevalencia e incidencia de las infecciones por rotavirus (15). En países en desarrollo, los niños generalmente padecen de 2 a 8 episodios diarréicos por año (de diferente etiología) (8). En los países desarrollados, los niños generalmente sufren un solo episodio de diarrea en el año. Las tasas correspondientes a los virus oscilan entre 0.3 y 0.8 episodios por niño al año. Se estima que en la diarrea por rotavirus la incidencia de muertes es de 2.9 por 1,000 individuos menores de dos años de edad (30, 40).

Infecciones por este agente han sido asociados con algunos casos de diarrea en turistas en ciertas áreas. Las infecciones nosocomiales por rotavirus ocurren frecuentemente en las áreas hospitalarias, debido a la constante existencia de susceptibles y a la resistencia a la inactivación con agentes físicos, así como la contaminación ambiental (8). Por último debemos señalar que se han observado niños menores de dos años que excretan rotavirus sin presentar diarrea, aún -

cuando el porcentaje es menor que el de los excretadores con diarrea; así, en el estudio realizado por Champsaur (31) se describe: rotavirus en 43 (36%) de 119 niños con diarrea y en 40 (24%) de 164 niños sin diarrea; de estos últimos, en el 71% de los neonatos, en el 50% de los niños de 1 a 6 meses y en el 26% de los niños de 7 a 24 meses ocurrió excreción asintomática de rotavirus.

Es necesario efectuar estudios serológicos basados en la presencia de IgM, un dato preliminar ha dado a conocer que el suero específico de tal anticuerpo es producido en respuesta a la infección primaria (25, 26), seguida por IgM (27, 29). De esta manera, se podrá establecer un diagnóstico diferencial entre la infección sintomática o asintomática y portador ya que infección inaparente y portador son la regla más que la excepción (31, 33).

#### INMUNIDAD Y SEROLOGIA.

El mecanismo responsable de la inmunidad para la infección y enfermedad por rotavirus humano es pobremente conocido; no obstante, se conoce sobre la existencia de una barrera específica de defensa a nivel del aparato gastrointestinal, que es independiente de los anticuerpos séricos ó de la acción directa de las células T.

Esta inmunidad ligada a la producción local de IgA en esos tejidos, desempeña un papel prioritario ante numerosas -

infecciones. La IgA es la Ig que predomina en las secreciones gastrointestinales y dentro de tejidos que tienen continuidad con el medio externo (35). A diferencia de las IgA del suero con un PM de 165,000 daltones, la IgA de las secreciones cuenta con un PM de 390,000 daltones; tal diferencia está ligada a la presencia de un "pieza secretoria" de 60,000 daltones; en las IgA secretorias que unen dos moléculas de IgA análogas a las que se encuentran en el suero. Esta pieza secretoria es una glucoproteína que contiene cerca de 10% de azúcar. Parece que vuelve a las moléculas de IgA menos sensibles a la proteólisis (34). También podría desempeñar un papel importante en el transporte de las moléculas de IgA a través de las membranas de las células mucosas (36). Al respecto se ha observado que las cabras recién nacidas, frecuentemente desarrollan diarrea a pesar de los niveles altos de anticuerpos circulantes y que la inmunidad intestinal local parece desempeñar un papel protector más importante que la inmunidad sistémica.

Los anticuerpos en la luz del intestino delgado parecen ser los determinantes mayores en la resistencia a enfermedades por rotavirus (8). De esta manera la inmunidad específica proporcionada por las IgA parece desempeñar un papel básico en la defensa contra numerosas infecciones locales. Sin duda, los anticuerpos IgA del calostro y luego de la leche, desempeñan una función importante en la defensa del recién nacido contra infecciones gastrointestinales (35).

Sin embargo la preexistencia de anticuerpos neutralizantes en alto título en el suero de voluntarios humanos correlacionó con la resistencia a enfermedad diarréica, cuando fueron desafiados con rotavirus homotípicos o heterotípicos. Se piensa que de esta manera, los anticuerpos séricos pueden correlacionarse y quizá reflejar los anticuerpos locales del intestino y el estado inmunitario del individuo (8, 30).

La falta de correlación de los anticuerpos séricos pasivamente transferidos a través de la placenta con resistencia a la infección durante las primeras semanas de vida puede ser explicada por la localización predominante sistémica de esos anticuerpos (41).

La alimentación con leche materna parece conferir una resistencia parcial a la infección por rotavirus durante la lactancia, en comparación con aquéllos niños que son alimentados con leche industrializada; en ocasiones, los primeros experimentan ante el contacto con rotavirus, menor excreción de partículas o infecciones leves en comparación con los segundos (8, 26, 13).

La concentración de anticuerpos en el suero de los neonatos refleja la transferencia de IgG materna a través de la placenta. Los títulos disminuyen a los cuatro o seis meses y después aumentan constantemente como consecuencia de las infecciones sintomáticas y asintomáticas que se producen durante la infancia y la niñez, así como en la edad adulta, por la

exposición de los padres a los rotavirus de sus hijos. Los anticuerpos disminuyen en las personas de más de 40 años (30).

Es posible que los adultos actúen como reservorios de la infección y que los rotavirus circulen en la comunidad sin producir síntomas; sin embargo, los principales propagadores del virus son los niños con diarrea (27).

En un estudio realizado por Espinosa-Larios (42) para valorar la persistencia de anticuerpos transplacentarios (IgG) con seguimiento hasta los seis meses de edad, tanto en el suero obtenido de la sangre del cordón umbilical como en el de las madres, la seropositividad era semejante, ya que los primeros mostraron 94.4% de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (HI) y los segundos 96.1%. El porcentaje disminuyó al aumentar la edad de esos 54 niños, hasta el cuarto mes; a partir de este momento se inició la elevación en el título de anticuerpos lo que indicó infección por rotavirus. Resultados similares obtuvo Ruiz-Gómez (43) al valorar anticuerpos HI contra las cepas Nebraska y SA-11. Los datos indican que en nuestro país los niños desde muy temprana edad, son infectados por este virus, independientemente de que el niño tenga o no anticuerpos transmitidos por la madre. En estudios que relacionan la frecuencia de la infección por estado socio-económico en individuos de 1 a 54 años, no se encontraron diferencias significativas, ya que el porcentaje de seropositividad de anticuerpos HI varió de 95.9% en Coyoacán, zo-

na de nivel económico elevado hasta el 100% en Tepito (43).

Investigaciones recientes señalan que los individuos - que han sufrido infección por un serotipo determinado, no quedan protegidos contra otro serotipo (30). El estudio de Yamaguchi (44) demuestra que existe respuesta anamnésica con producción de anticuerpos IgA en el intestino de niños después - de una reinfección con rotavirus, y que la memoria de IgA puede durar hasta un año. Estos datos deberán ser tomados en - cuenta para el desarrollo futuro de una vacuna con virus vivo.

#### VARIACIONES ESTACIONALES.

Estudios realizados en diferentes partes del mundo han demostrado que el porcentaje de gastroenteritis por rotavirus puede aumentar hasta un 50% en los meses fríos. En los países industrializados de clima templado los rotavirus son la - causa del 50 al 70% de los casos con diarrea aguda infantil, que requieren atención médica. La máxima incidencia ocurre - en invierno (30).

En los países en desarrollo de clima tropical, la frecuencia oscila entre el 40 y 50% de los casos en los meses de mayor incidencia, generalmente son los más fríos, siendo endémicos los rotavirus durante el resto del año (entre el 10 y - 20% de los casos) (8). En las zonas templadas, rara vez se - detectan rotavirus durante el verano. Las observaciones refe

rentes a la distribución temporal de serotipos específicos es limitada debido a la dificultad para el cultivo de los rotavirus en células. El conocimiento del patrón de distribución temporal de estos virus se obtendrá cuando pueden caracterizarse las cepas como subgrupo y serotipos (30, 48, 49).

#### TRANSMISION.

La infección por rotavirus ocurre a través de la vía fecal-oral, lo cual ha sido comprobado en voluntarios animales de experimentación. Hasta el momento, no se ha demostrado que los rotavirus puedan multiplicarse fuera de los enterocitos del intestino delgado con producción de partículas infectantes.

No obstante, continúan las especulaciones con respecto a si los rotavirus son transmitidos por la vía respiratoria - (30). Las evidencias de esto son circunstanciales apoyadas sobre:

a) La rápida adquisición de anticuerpos contra rotavirus durante los primeros años de vida en todas las ciudades - independientemente de los estándares de higiene.

b) Algunos brotes en los cuales la transmisión fecal-oral no ha podido ser comprobada.

c) La presencia de síntomas respiratorios en una proporción de pacientes con gastroenteritis por rotavirus (30).

La fuente de infección para los recién nacidos que normalmente no están en contacto con otros lactantes y con niños mayores con gastroenteritis no ha sido bien establecida, quedando la posibilidad de que un humano mayor a un familiar con infección subclínica sean los transmisores.

Estudios basados en infecciones hospitalarias han demostrado que una proporción importante de familiares de lactantes y niños pequeños con gastroenteritis por rotavirus son infectados con el virus al mismo tiempo.

La resistencia a la inactivación física puede contribuir a la contagiosidad del rotavirus humano. Otras observaciones sugieren también que la contaminación ambiental es una fuente de infección en cuneros y áreas hospitalarias (45). Una desinfección efectiva de material contaminado y un cuidadoso lavado de manos pueden ser medidas preventivas importantes especialmente en áreas hospitalarias o institucionales así como, el aislamiento de los pacientes infectados en brotes hospitalarios.

Los rotavirus han sido identificados en aguas de abastecimiento tratadas o sin tratar, lo que lleva a considerar que las aguas contaminadas pueden participar de una manera importante en la transmisión de rotavirus. Se ha hablado sobre el posible papel de los animales como fuente de infecciones al hombre. Sin embargo, bajo condiciones naturales no hay evidencia

de que los rotavirus de animales se transmitan al hombre o viceversa (46, 47, 133).

#### OTRAS DIARREAS VIRALES.

Un número de agentes virales ha sido identificado como un grupo etiológico de diarrea que no ha sido aclarado. Estos agentes pueden ser divididos en dos grupos. Uno incluye a los adenovirus, coronavirus pararrotavirus y enterovirus que son universalmente reconocidos como virus de mamíferos; el otro grupo, incluye partículas o agentes que han sido descritos por un número de investigadores y determinados como astrovirus, calcivirus y minireovirus. La disponibilidad del conocimiento de tales agentes es resumido a continuación.

#### ADENOVIRUS.

Los adenovirus han sido más bien establecidos como virus respiratorios (33 serotipos que han sido reconocidos en cultivos celulares) y los serotipos comunes que han sido posiblemente aislados de heces mediante cultivos celulares. Recientemente, varios investigadores han reportado mediante la observación por microscopio electrónico (ME) la morfología indistinguible de virus en heces que no habían podido crecer subsecuentemente en cultivos celulares. La razón de tal fenómeno es desconocido; pero más que saber la razón de ello, lo que se pretende es la identificación de sus especies semejan-

tes. No obstante, los adenovirus han sido aislados de muchas especies animales pero aún no han sido claramente implicados como una causa de diarrea (50).

Los adenovirus entéricos (Ead), incluyendo los serotipos 40 (Dugan) y 41 (Talk), frecuentemente han sido asociados con la gastroenteritis infantil e investigados en muestras de heces por ME ó ELISA; sin embargo, algunos adenovirus han sido observados en materias fecales de niños que no presentan enteritis. No obstante, en varios estudios, en los que los adenovirus han sido establecidos por ME. Se han encontrado heces de un 5 a 8% de lo normal en niños y en algunos la excreción ha sido comunmente prolongada. Cabe señalar que no solamente un serotipo ha sido asociado convincentemente con diarrea; pués en una epidemia reciente los virus pudieron ser identificados por inmunomicroscopía electrónica (IEM) y no por su crecimiento. El tipo de adenovirus, especialmente esos que no se desarrollan o que se desarrollaron pobremente en cultivos celulares, han sido reconocidos como agentes etiológicos de diarrea necesarios para futuros estudios.

En un estudio realizado por Brant (51), se sugiere que una gran mayoría de los adenovirus observados por ME en muestras de heces de pacientes enfermos de diarrea, son asociaciones casuales; aún cuando los niños menores de dos años pueden ser especialmente infectados cuando se exponen a un adenovirus.

Actualmente los adenovirus 40 y 41 son considerados - como la segunda causa de diarrea viral y se consideran como - virus "fastidiosos", ya que, no se replican en cultivos celu- lares por los métodos convencionales (52).

#### ASTROVIRUS.

Otro tipo de partículas virales observadas por ME en - heces de niños con cuadros leves, o moderados de diarrea son - aquéllos que presentan una morfología que asemeja una estre- - lla de seis picos, que miden 29 a 30 um.

Los primeros en identificar estas partículas por ME en heces de neonatos afectados por un brote de diarrea y vómito en una maternidad fueron Appleton y Higgins (53) en Escocia - en 1975 y subsecuentemente en el Reino Unido; así mismo, muy - similares pero no idénticas, fueron las partículas reportadas en Australia y Canadá. Estas partículas no pudieron crecer - en cultivos celulares de rutina, pues el desarrollo se vió li - mitado al emplear células de riñón de embrión humano (HEK); - tal desarrollo fue detectado por inmunofluorescencia usando - un antisuero preparado en conejillos de indias (cuyos). Al - respecto, no hubo una rápida evidencia sobre la existencia de más de un serotipo.

El tipo de astrovirus como agente etiológico aún es - desconocido. En un estudio fueron encontrados con mayor fre- cuencia en heces de niños con diarrea que en controles; algu-

nos de ellos fueron implicados en dos epidemias en el Reino Unido. El incremento de la posinfección en anticuerpo fue detectado por inmunomicroscopía electrónica; así mismo, los voluntarios adultos fueron enfrentados con los astrovirus, cuya infección fue acompañada por excreción de grandes cantidades de virus y por seroconversión (50). No obstante, a pesar de ello, ocurrieron enfermedades en un número pequeño de algunos individuos.

Fueron encontrados virus morfológicamente semejantes - en heces de corderos y becerros. Los virus de corderos fueron descubiertos a causa de la diarrea en corderos gnobióticos. De esta manera, los astrovirus para el hombre, corderos y becerros fueron reportados como serológicamente diferentes (50).

En la actualidad se conocen 5 serotipos de astrovirus de humanos. De tal modo que recientemente han sido observadas partículas semejantes a astrovirus en muestras de neonatos asintomáticos, así como lactantes y niños con gastroenteritis; también se han registrado brotes de gastroenteritis - por astrovirus en maternidades y en niños de guardería.

Entre los pocos estudios epidemiológicos realizados, - se señalan que hacia los 3 y 4 años de edad aproximadamente - un 70% de la población tienen anticuerpos específicos (54).

## CALCIVIRUS.

Hacia 1976 en los suburbios de una comunidad de Escocia, se observaron por ME en muestras de niños con diarrea, - partículas de 31 a 35 um en forma de pequeños cálices (55). - Se demostró que contenían ARN de cadena sencilla y fueron clasificados como un género de la familia de los picornaviridae; los cuales en la actualidad son considerados como una familia independiente.

Virus similares fueron reportados por otros dos laboratorios en el Reino Unido; así mismo, aparentemente partículas similares fueron reportadas por dos laboratorios en Canadá -- (50), en ambos casos presentaron astrovirus, situación que resultó un tanto confusa. No hubo desarrollo de estos agentes en cultivos celulares de humanos o felinos que hallan sido - originalmente reportados; así mismo no se han descrito diferentes serotipos.

En un reporte se menciona, que partículas de calcivirus fueron detectadas en heces de niños involucrados en epidemias escolares de "vómito en invierno". Las partículas fueron determinadas en las heces de algunos pacientes y no en - contacto, así mismo un maestro también fue afectado, pero no seroconvertido. Otros reportes indican una carencia definitiva en cuanto a la asociación entre calcivirus y gastroenteritis, pues no se presentan estudios de voluntarios donde se hallan reportado (50).

Virus similares morfológicamente han sido aislados de cerdos, gatos y leones marinos; sin embargo, no solo estos - agentes han sido conocidos como causantes de diarrea en el - huésped natural (50), pues aún no ha sido aclarada la existencia de más de un serotipo de virus felino.

Los hallazgos epidemiológicos y clínicos de los calci-virus son muy parecidos a los reportados con los rotavirus, - ya que, entre los 6 y 24 meses de edad adquiere inmunidad y - en los niños mayores y adultos el 90% presentan inmunidad pa-  
ra este agente viral.

#### CORONAVIRUS.

Los coronavirus son una de las mayores causas de dia-  
rrea en terneras recién nacidas. Se ha asociado a los corona-  
virus CVs como posibles agentes etiológicos de gastroenteri-  
tis en el hombre, basados en los hallazgos en heces y en el -  
epitelio intestinal por ME de partículas semejantes a corona-  
virus (virus de 80 a 180 um, envueltos y pleomórficos) (56).  
En humanos se ha observado la excreción de coronavirus por -  
Moscovici y col. (57) los que describieron un brote de en-  
terocolitis hemorrágica aguda en niños prematuros, las partí-  
culas virales fueron identificadas por inmunomicroscopía elec-  
trónica (IEM) y hubo respuesta serológica en estos pacientes.  
Mas recientemente se reportó un brote de gastroenteritis en -  
neonatos, con hallazgos del virus por IEM, donde algunas ce-

pas de CVs obtenidas de heces diarréicas se han podido propagar en cultivos celulares (línea HRT-18) (58).

#### PARARROTAVIRUS.

Recientemente han sido descritas partículas virales - que infectan al hombre y animales morfológicamente indistinguibles de los rotavirus, las cuales carecen del antígeno de grupo, a dichas partículas se les ha llamado "pararrotavirus". Su patogenicidad e importancia epidemiológica en casos de diarrea en el hombre está por determinarse (59).

#### ENTEROVIRUS.

Sesenta y ocho enterovirus han sido identificados, de los cuales con excepción de dos, han podido ser aislados de heces. Empleando la técnica de microscopía electrónica han podido ser descubiertas pequeñas partículas (25 um) sin características esféricas indistinguibles de una a otra. Así mismo técnicas para el aislamiento de enterovirus han sido válidas por 10 años y varios investigadores han intentado implicarlas como causa de diarrea. Sin embargo, no ha habido generalmente una evidencia convincente que lo presente, aunque recientemente de manera aparente, las epidemias han involucrado tipos bien caracterizados que han sido reportados (por ejemplo, tipos de Echovirus 11, 14, 18 y 19). No obstante de todas maneras tales epidemias han sido debidas a que aún no han sido -

detectados sus agentes. Por lo tanto, no hay evidencia muy bien conocida sobre los enterovirus patogénicos semejantes a los poliovirus y coxackiviruses, como causa de la diarrea (60, 50).

Debido a la ausencia de una asociación clara entre enterovirus y diarrea se ha propuesto la realización de algunos estudios con voluntarios. Estos han sido llevados a cabo mediante el empleo de especies Echoviruses y Coxsackie aislados de la garganta; sin embargo, esto fue considerado como causas pequeñas y no por enfermedad gastrointestinal (50).

Cabe señalar que los enterovirus han sido encontrados en un número considerable de especies animales pero no se ha presentado evidencia de que ellos causan diarrea en su huésped natural (60).

#### AGENTE NORWALK.

En 1972 en Norwalk, Ohio se visualizaron por ME en filtrados de heces fecales provenientes de sujetos con cuadro de gastroenteritis partículas de 27 um, sin envoltura y con subestructura no clara a las que se les denominó virus Norwalk. Este virus causa enfermedad diarréica explosiva y autolimitante en todos los grupos de edad. La duración de la enfermedad es de 12 a 60 horas, con un período de incubación de 24 a 48 horas (61).

Las fuentes de infección con estos virus son: agua para beber, agua de albercas y alimentos, incluyendo mariscos - crudos y ensaladas. La transmisión primaria de persona a persona se ha descrito con mucha menor frecuencia que la secundaria, a partir de una fuente común en forma de brotes.

Estudios epidemiológicos indican que el virus se encuentra distribuido mundialmente y se transmite por vía fecaloral.

A diferencia de los rotavirus, el agente Norwalk se - considera un patógeno de niños mayores y adultos. En países en vía de desarrollo, la infección es adquirida a principios de la vida y a los dos años de edad más del 90% de los individuos presentan títulos detectables de anticuerpos.

Algunos de los agentes del grupo Norwalk no se han desarrollado en el sistema de cultivo celular, pero gracias a - los esfuerzos de investigadores se ha encontrado la vía de - propagación de estos agentes. Pues mediante ellos se pretende encontrar agentes serológicamente diferentes a los asociados con la gastroenteritis viral.

La detección práctica de métodos y ensayos serológicos para otros agentes Norwalk como los semejantes a Hawaii "W", se menciona podrá dilucidar en un futuro su origen natural - (62). En cuanto a los esfuerzos adicionales se comenta que - han logrado el desarrollo de modelos animales para el estudio

de enfermedades causadas por el grupo de agentes Norwalk. -  
Así mismo la ausencia observada de inmunidad aparente del --  
agente Norwalk en un grupo de voluntarios en contraste con -  
otros de una inmunidad aparente del agente Norwalk en un gru-  
po de voluntarios en contraste con otros de una inmunidad se-  
mejante han hecho que se realicen cuestiones importantes en -  
relación con la inmunidad intestinal. Por lo tanto, las razon  
es de tal carencia de inmunidad en un grupo como éste ha de-  
sarrollado la necesidad de ser elucido (50).

#### OTROS VIRUS SEMEJANTES PEQUEÑOS REDONDOS (SRVs).

En extractos de heces se encontraron partículas de vi-  
rus semejantes con un diámetro de 25 a 35  $\mu$ m de lo cual inves-  
tigaciones observaron una diferencia clara en el fondo del ma-  
terial; tales partículas tampoco crecieron en cultivos celular  
es. Estas han sido reportadas en su mayor parte en la aso-  
ciación por epidemia de gastroenteritis en comunidades o ins-  
tituciones. Dentro de cada una de las epidemias, las peque--  
ñas partículas redondas son semejantes en apariencia, pero di-  
fieren entre una epidemia y otra (50).

Investigaciones a fondo han reportado que tales pa-  
tículas se han encontrado en heces de pacientes con diarrea -  
esporádica (por ejemplo los "mini-rotavirus" fueron descritos  
en Canadá morfológicamente similares a los virus observados en  
una epidemia en Escocia (55), por lo tanto, debido a la ausenu

cia de asociación de epidemias (60), ha sido difícil obtener el material necesario para su investigación detallada.

Por último cabe señalar que tales partículas pequeñas, redondas SRVs han sido observadas en heces de perros y cerdos con diarrea, pero su relación con SRVs humanos aún es desconocida (50).

#### DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

El diagnóstico de infección por rotavirus humanos se hace por la demostración del virus en heces o empleando métodos serológicos. Tal diagnóstico depende de la detección directa de virus en una muestra fecal, o de la demostración de un aumento cuádruple de título de anticuerpo entre muestras de suero agudo y convaleciente. Sólo las heces diarréicas de la fase aguda de la enfermedad pueden contener virus.

El examen directo de muestras fecales en el método primario de diagnóstico de infección por rotavirus, porque este último todavía no se ha cultivado in-vitro. De tal modo, la microscopía electrónica (ME) es la técnica original de diagnóstico y el método que se mantiene como estándar para valorar la eficacia de otros métodos. El procedimiento requiere que una suspensión de heces sea colocada sobre una rejilla para ME, teñida negativamente con ácido fosfotúngstico y examinado a 30,000 - 50,000 aumentos con objeto de observar las

partículas de virus por cuadrante de la rejilla, esta muestra debe contener alrededor de 100,000 partículas por milímetro de suspensión; es decir, 10 billones de partículas virales por gramo de muestra (62,18,64). En los últimos años, sin embargo, para evitar la necesidad del microscopio electrónico, se han desarrollado otros métodos como la inmunomicroscopía electrónica; el cual requiere de tiempo y experiencia para su manejo y solamente pueden ser examinadas un número limitado de muestras por día. También se ha empleado la inmunofluorescencia (64) para detectar la presencia de antígeno viral en el tejido infectado.

Cuando se encuentra presente un gran número de partículas en heces diarréicas, los métodos inmunológicos que se emplean para la búsqueda del antígeno son: fijación de complemento (FC) y contraímmunoelectroforésis para examen directo, inmunofluorescencia directa (IF), electroferésis de RNA viral radioinmunoanálisis (RIA) y el inmunoanálisis enzimático (ELISA). Cabe señalar, que técnicas como fijación de complemento contraímmunoelectroforésis e inmunofluorescencia; no tienen la comodidad, sensibilidad ni aplicación en gran escala de los inmunoanálisis de la fase sólida, que son las pruebas más recientes para la detección de rotavirus en heces. Los procedimientos de radioinmunoanálisis de fase sólida (RIA) (66, 67) y de análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) - fig. 1 (68) pueden usarse ya como instrumentos diagnósticos -

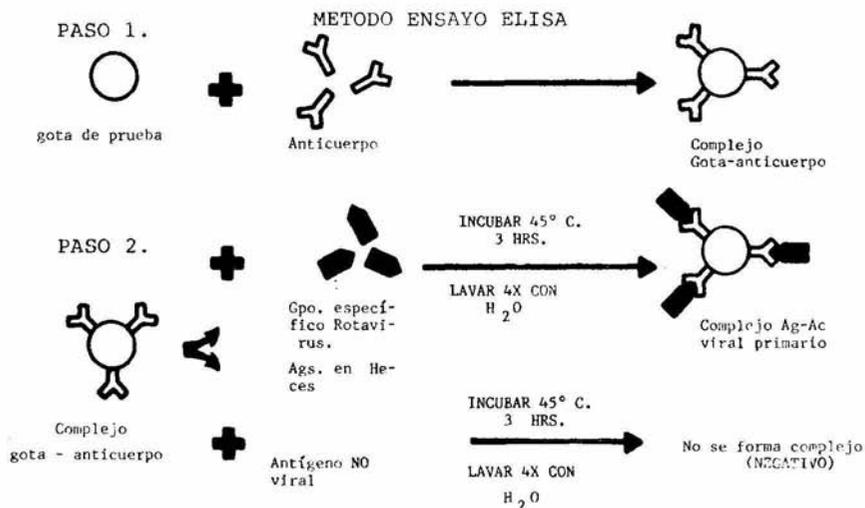
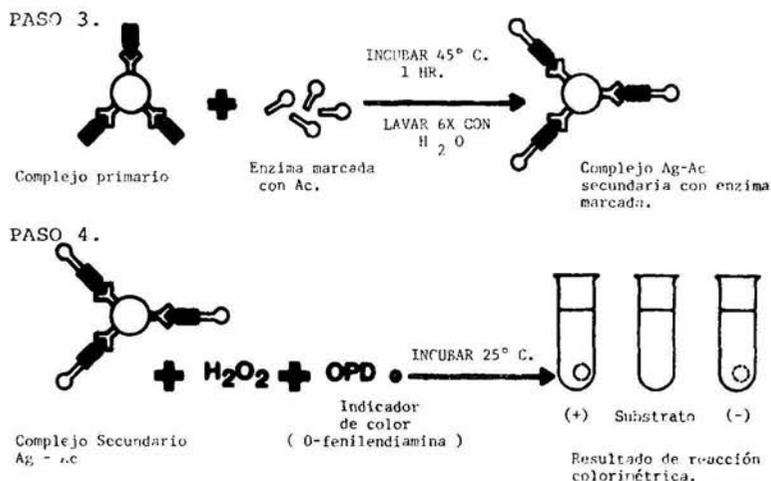


FIG. 1 Método ELISA, tomado de: Sandy, J. Mc. Guire, M.S., et al (Con autorización de ref. 68)



para rotavirus y parecen ser las pruebas diagnósticas preferidas para uso en casi todos los laboratorios.

Los inmunoanálisis de fase sólida son de realización técnicamente simple y relativamente fáciles de establecer para usarlos en una sola ocasión, pero se requiere un esfuerzo considerable para la determinación empírica y el mantenimiento de condiciones óptimas de análisis para alcanzar un máximo de especificidad y sensibilidad. El análisis para detección de virus debe estar inicialmente validado por el uso de muestras fecales positivas y negativas examinadas independientemente por otro método, como la microscopía electrónica. En cuanto a la importancia entre cada uno de los métodos anteriormente mencionados, se considera que ELISA ofrece grandes ventajas sobre RIA, debido a que no requiere el uso de materiales radioactivos y equipos de contadores de gamma radiaciones; pues solo se necesita de un espectrofotómetro capaz de manejar rápidamente pequeños volúmenes de muestra. Todos los reactivos son estables durante su almacenamiento a diferencia del anticuerpo marcado que se usa en RIA, además, muchos de los conjugados anticuerpo-enzima de detección usados en ELISA son de fácil obtención en el comercio. No obstante, para que la prueba ELISA de rotavirus alcance la sensibilidad de RIA necesita de una prueba indirecta que incluye un paso más de ampliación. Esto es posible mediante el uso de anticuerpos de detección de diferentes especies animales. Por lo tanto, el RIA tiene la ventaja de que puede hacerse una prueba directa

que requiere suero hiperinmune de una sola especie animal.

De este modo ha sido considerado que el paso más importante para establecer los procedimientos de RIA y ELISA será la correcta preparación y selección de sueros inmunes. De esta manera, para la detección de rotavirus en heces, algunos han empleado como reactivos críticos suero preparado contra rotavirus purificado de heces humanos o de terneros gnobióticos infectados experimentalmente con rotavirus humanos (67, - 69).

Otro problema potencial de estos análisis, es que los sueros hipermunes poseen ocasionalmente reactividad no específica contra componentes extraños de las heces. Considerando esto, la técnica RIA (66) ha desarrollado para la detección de rotavirus humanos en muestras fecales, un antisuero de fácil preparación contra un rotavirus de monocultivo en tejido que tiene muy estrecha relación inmunológica con el rotavirus humano. La técnica es específica, sensible y práctica, asimismo, puede establecerse, fácilmente en laboratorios de diagnóstico viral.

Recientemente, se han desarrollado dos nuevas técnicas para la investigación de antígenos y anticuerpos de rotavirus estas son: la prueba de aglutinación en látex y el empleo de anticuerpos monoclonales en pruebas de neutralización (71).

En cuanto a los cultivos celulares, (65), se han desarrollado técnicas para el cultivo directo de muchos rotavirus humanos en cultivo primario de células de riñón (AGMK ó MK) - con buena eficacia y mediante el empleo de enzimas proeteolíticas como la tripsina, pacaetina o elastina. Por ejemplo, se cuenta con información bibliográfica sobre el virus SA-11, un rotavirus citopático de mono aislado originalmente por H. - Malherbe y M. Strickland-Cholmley, del Health Science Center - de la Universidad de Texas, San Antonio (70) del cual se indica que ha sido cultivado en una línea continua de células renales embrionarias rhesus (MA-104).

No obstante, a pesar de varios rotavirus, tales como - el ya mencionado (SA-11) y el agente "O" han crecido radicalmente en cultivo celular para los rotavirus humanos ésto ha - sido un tanto difícil, pues hasta el momento, éstos no han podido crecer eficientemente en algún sistema de cultivo de tejido (72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94). Inicialmente los rotavirus - humanos fueron observados sobre una infección abortiva de un - cultivo celular, con producción de antígenos virales, sin embargo, tales virus infecciosos no pudieron ser pasados en serie en cultivo celular (89).

El primer rotavirus humano que tuvo un buen crecimiento así como pases en series en cultivos celulares, fue el rotavirus

mutante Wa (serotipo 1); el cual fue fortuitamente selecto durante 11 pases de esa especie en lechones gnobióticos (95). - Cabe señalar que el eficiente crecimiento de este mutante requirió de un pretratamiento de virus con tripsina.

En el caso del rotavirus humano no cultivable DS-1 (serotipo 2), también se intentó su propagación en lechoncillos pero careciendo de éxito; por lo cual se adoptó otra estrategia de cultivo (96). Tal estrategia tomó ventaja de la propiedad bien conocida de los Reoviridae al estar sometidos a un rearrreglo genético, con una elevada eficiencia durante la coinfección en el cultivo celular. Los cultivos celulares fueron coinfectados con un rotavirus humano no cultivable, tal como DS-1 y un rotavirus bovino cultivable ts mutante. Posteriormente el crecimiento se dio para los cultivos coinfectados, presentando un reacomodo genético (i.e., virus con un genotipo mezclado) siendo antigénicamente similar al paterno humano.

La recuperación de los rotavirus humanos no cultivables fue lograda usando dos tipos de urgencia selectiva, favoreciendo al reacomodo dado por los virus cultivables así como la especificidad de la neutralización del rotavirus humano paterno los cuales son:

(a) El rotavirus bovino mutante ts paterno y el reacomodo dado, que produjeron los genes ts, fueron seleccionados

después del crecimiento que se da a una temperatura restrictiva de inoculación a los cultivos inoculados.

(b) Y los virus con una especificidad serotípica de rotavirus bovino seleccionados después de la inoculación cuando se da el crecimiento con el antisuero de rotavirus bovino. Los virus que presentaron un reacondo genético fueron seleccionados, los cuales crecieron eficientemente en cultivo celular; y por ende produjeron placas a una temperatura restrictiva; así mismo teniendo una especificidad en la neutralización del rotavirus paterno no cultivable y de mezcla genotípica. Con esta técnica, 33 de 52 rotavirus humanos fueron afortunadamente recuperados; de tal modo que la diversidad serotípica de tales virus fue demostrada por ensayos de neutralización convencional (97).

Cabe señalar, que tales estudios han proporcionado información convincente en cuanto a genes que codifican para ciertas proteínas de rotavirus; tales como la proteína que estimula la neutralización de anticuerpos, el comportamiento de la proteína del subgrupo antigénico y la proteína responsable para la restricción de crecimiento en cultivo celular. Además, la generación de los virus con reacondo genético se considera puede tener una importante aplicación en el desarrollo de vacunas.

Estas técnicas se han desarrollado por cultivo directo

de más rotavirus humanos en cultivo celular (85, 91). Esto ha sido logrado por un pretratamiento del virus con tripsina ( $10 \mu\text{g/ml}$ ); así mismo, la incorporación de tripsina ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) en el medio de mantenimiento y el uso de tubos de cultivo de la línea celular MA-104 colocados en rotores. Siguiendo el crecimiento en los tubos de cultivo, muchas especies de rotavirus humanos han sido capaces de producir placas cubiertas de medio conteniendo 0.6% de agar purificado, tripsina acetilada  $3 \mu\text{g/ml}$  y DEAE dextrano  $50 \mu\text{g/ml}$ . Así mismo, más de un 75% de muestras fecales han sido conocidas por otras pruebas como rotavirus positivos, siendo cultivados exitosamente en tubos de cultivo usando el procedimiento ya antes mencionado. Sin embargo, tal metodología no ha sido capaz de probar un cultivo eficiente de rotavirus tomados directamente del recto mediante un isopo. Así mismo, se manifiesta que el cultivo celular primario AGMK ó MK es aún más eficiente que el cultivo con la línea celular MA-104 para el aislamiento de rotavirus de muestras clínicas (98, 99, 100).

## MATERIAL Y METODOS.

El estudio se realizó en las clínicas de Coyoacán y de San Jerónimo del IMSS, durante los meses de mayo a diciembre de 1987. Se incluyeron en el mismo a 374 pacientes con diarrea aguda (de 15 días de evolución) que acudieron a las clínicas por esa causa y que no tenían otro padecimiento de fondo. Los pacientes fueron seleccionados en forma aleatoria, tomando dos casos diariamente en cada clínica. Las características de los pacientes se pueden observar en el cuadro I: el 52.1% fueron mayores de 15 años de edad, el 74.5% asistieron a la consulta durante los primeros tres días de evolución del padecimiento, el 49.7% presentaron entre 5 y 8 evacuaciones en las últimas 24 horas, una tercera parte de los casos tenían fiebre o vómito, tres cuartas partes manifestaron cólicos y sólo un 12.6% tuvo sangre en las evacuaciones. De los niños menores de 5 años, un 12.8% presentaba al ingreso deshidratación leve y un 27.8% eran desnutridos, casi todos ellos sólo de primer grado. Habían recibido antibióticos previos a la consulta el 22.9% de todos los casos y antiparasitario únicamente el 6.2%.

A cada paciente se le aplicó un cuestionario precodificado para conocer la sintomatología y el tratamiento previo. Se le exploró calificando el grado de hidratación de acuerdo a los criterios clínicos de la OMS (159). A los niños menores de 5 años, además, se les pesó. A los menores de 5 años

## CUADRO 1

CARACTERISTICAS CLINICAS DE 374  
 PACIENTES QUE ASISTIERON A LA CONSULTA EXTERNA POR DIARREA  
 AGUDA Y EN QUIENES SE REALIZARON EXAMENES DE  
 LABORATORIO PARA IDENTIFICAR EL  
 POSIBLE AGENTE CAUSAL

CARACTERISTICA	NUMERO	%
Edad (años)		
< 2	83	22.2
2 - 4	50	13.4
5 - 14	46	12.3
15 - 44	154	41.2
> 44	41	10.9
Días de evolución previos a la consulta		
< 5	280	74.5
3 - 5	80	21.3
> 8	14	3.7
No. de evacuaciones en las últimas 24 horas		
1 - 4	112	29.9
5 - 8	186	49.7
> 8	76	20.3
Sintomatología:		
Fiebre	148	39.6
Vómito	115	30.7
Cólico	272	72.7
Sangre en heces	47	12.6
Deshidratación leve (&)	17	12.8
Desnutrición de I grado (&)	37	27.8

(&) En 133 niños de 5 años.

se les citó nuevamente a la clínica para ser pesados en la misma báscula; se consideró disminución de peso cuando hubo una diferencia de menos de 100g. o más entre el peso inicial y el final.

A todos los casos se les tomó una muestra de heces recién emitidas; la muestra fue procesada inmediatamente, en forma inicial, en el laboratorio de la clínica y una parte fue trasladada al laboratorio de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS para su procesamiento final. Este mismo procedimiento se realizó a 96 sujetos testigo tomados de la misma consulta externa de las clínicas, pero no tenían diarrea. El grupo testigo también fue seleccionado al azar, aunque estratificado en edades; la distribución del grupo testigo en este último aspecto fue similar a la del grupo de pacientes (datos no mostrados en las Tablas).

Los procedimientos de laboratorio para la identificación de los rotavirus y otros microorganismos, se llevaron a cabo de acuerdo con lo recomendado por la OMS (160). Se realizó ELISA para la identificación de Rotavirus (162, 163), coprocultivo para el aislamiento de las bacterias (161), estudio del moco fecal con solución salina y con azul de metileno para la identificación de trofozoitos de amiba a Giardia y de leucocitos, respectivamente (164).

Para la identificación de *Cryptosporidium* se utilizó - de Ziehl Neehlsen modificada (165). Durante el procedimiento del coprocultivo se tomaron 5 colonias de *Escherichia coli* y se procesaron para investigar los siguientes mecanismos patógenos: citotoxicidad mediante su efecto tóxico en células HeLa (166), producción de toxina termolábil mediante hibridación con sondas radioactivas de DNA (167) y adherencia mediante su fijación a células HeLa (168). Para agrupar las *E. coli* en enteropatógenas o no enteropatógenas se procedió también a la serotipificación mediante antisueros comerciales - (Difco. (160).

Para evaluar las diferencias estadísticas se utilizó - la prueba de Chi cuadrada, la de probabilidades exactas de -- Fisher y la de U. de Mann Whitney.

## RESULTADOS.

En el cuadro II se pueden apreciar los microorganismos identificados, tanto en los 374 pacientes como en los 96 testigos. Se incluye, además, el análisis de la frecuencia de - aislamiento en los casos de diarrea con sangre en heces y en aquellos sin sangre en las evacuaciones. En los pacientes, - los gérmenes que se identificaron con mayor frecuencia fueron las *E. coli* citotóxicas (24.8%) y las toxigénicas (13.9%), se - guidas de *Shigella spp.* (12.3%), de *E. coli* enteropatógena - (8.9%) y de Rotavirus (7.0%). La frecuencia de identifica-

ción de los demás microorganismos fue menor al 5%.

Entamoeba histolytica sólo se identificó en cuatro casos de DA (1.1%). En 75 de los 187 casos en los que se practicaron todos los exámenes de laboratorio, no se identificó ningún germen (40.1%).

Al realizar el análisis estadístico de la frecuencia de identificación en comparación con el grupo testigo, solamente se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el caso de Shigella (12.3% vs. 3.1%  $p < 0.05$ ). En el grupo testigo no se encontró germen potencialmente patógeno en el 52.2%; sin embargo, la diferencia con el grupo de pacientes no fue estadísticamente significativa. En los pacientes de diarrea con sangre, se identificó con mayor frecuencia Shigella spp. y E. histolytica que en los casos de diarrea sin sangre (42.5% y 8.5% vs. 4.9% y 0.0%,  $p < 0.05$ ). Para los microorganismos restantes, las diferencias no fueron significativas. El aislamiento o identificación de más de un germen por caso, se presentó en el 11.3% de los pacientes y en el 8.3% de los testigos. La asociación que más frecuentemente se presentó fue la de dos cepas de E. coli con diferente mecanismo patogénico (7.4%).

Se analizó la frecuencia de identificación de microorganismos entre los 86 pacientes que recibieron antibiótico antes de la consulta y los 288 que no lo habían recibido; no se encontró ninguna diferencia significativa. El mismo fenómeno

CUADRO II  
IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGENICOS EN  
PACIENTES QUE ACUDIERON A LA CONSULTA EXTERNA  
MAYO - DICIEMBRE 1987

Microorganismos	Grupo testigo (n=96)	Total de casos (n=374)	PORCENTAJE DE IDENTIFICACION °	
			GRUPO DE PACIENTES CON DIARREA AGUDA	
			Diarrea con sangre (n=47)	Diarrea sin sangre (n=327)
<u>Escherichia coli</u> °°				
Citotóxica	13.4	24.8	33.3	20.3
Toxigénica (TL)	12.5	13.9	19.3	11.8
Enteropatógena	8.3	8.9	7.4	9.6
Enteroadherente	3.9	3.4	4.2	2.8
<u>Shigella spp.</u>	3.1*	12.3*	42.5 <sup>+</sup>	4.9 <sup>+</sup>
<u>Rotavirus</u>	3.1	7.0	2.1	7.6
<u>Salmonella spp.</u>	5.2	2.4	2.1	2.4
<u>Giardia lamblia</u> (Trofozoitos)	1.0	2.1	0.0	2.4
<u>Aeromonas spp</u>	1.0	1.6	0.0	1.8
<u>Campylobacter spp.</u>	1.0	1.1	0.0	1.2
<u>Entamoeba hisolytica</u> (Trofozoitos)	0.0	1.1	8.5 <sup>+</sup>	0.0 +
<u>Yersinia enterocolitica</u>	0.0	0.8	0.0	0.9
<u>Cryptosporidium spp.</u>	0.0	0.5	0.0	0.6
No identificado	52.2	40.1	30.4	41.5

° Se identificó más de un germen en el 11.3% de los pacientes y en el 8.3% de los testigos, por lo que las sumas de los porcentajes son mayores a 100.

°° Solamente se investigó y calculó en la mitad de los casos de cada grupo.

\* +  $p < 0.05$

CUADRO III  
 FRECUENCIA DE LOS MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS DE ACUERDO  
 A LA EDAD DE LOS PACIENTES CON DIARREA AGUDA

Microorganismo	No. de cepas	% por grupo de edad en años				
		< 2 (n=83)	2-4 (n=50)	5-14 (n=46)	15-44 (n=154)	> 44 (n=41)
<u>Escherichia coli</u> <sup>o</sup>						
Citotóxica	46	19.0	28.0	21.7	24.7	35.0
Toxigénica	26	19.0	16.0	13.0	11.7	10.0
Enteropatógena	17	7.1	12.0	13.0	7.8	15.0
Enteroadherente	6	2.4	4.0	4.3	2.6	5.0
<u>Shigella spp</u>	46	8.4	22.0	17.4	10.4	9.8
<u>Rotavirus</u>	26	13.3	8.0	4.3	5.8	0.0
<u>Salmonella spp.</u>	9	2.4	0.0	6.5	1.9	2.4
<u>Giardia Lamblia</u>	8	1.2	2.0	0.0	1.9	2.4
<u>Aeromonas spp.</u>	6	1.2	2.0	0.0	0.0	2.4
<u>Campylobacter spp.</u>	4	0.0	2.0	0.0	1.9	0.0
<u>Entamoeba histolytica</u>	4	0.0	4.0	2.2	0.6	0.0
<u>Yersinia enterocolitica</u>	3	1.2	0.0	0.0	0.6	2.4
<u>Cryptosporidium spp.</u>	2	1.2	0.0	0.0	0.0	2.4
No identificado	75	30.2	34.6	33.5	45.6	35.6

<sup>o</sup> Solamente se investigó en la mitad de los casos de cada grupo etario.

se observó entre los 23 pacientes que recibieron antiparasitario y los 351 que no lo recibieron; los porcentajes de identificación fueron similares, aunque fue evidente que entre los pacientes que recibieron metronidazol, no se identificó en ningún caso *Giardia* o *amiba*.

En el cuadro III, se muestra la frecuencia de los gérmenes identificados, pero en relación a los grupos de edad de los pacientes. Como se puede observar, tanto *E. coli* toxigénica como Rotavirus se identifican más frecuentemente en los niños menores de dos años de edad y esta frecuencia desciende conforme se incrementa la edad. *Shigella spp.* por el contrario, predomina principalmente en los niños preescolares y escolares. Los microorganismos restantes no muestran un predominio por algún etario, aunque el número de cepas identificadas de varios de los gérmenes es muy escaso para poder hacer interpretaciones valederas.

En el cuadro IV se presentan las características clínicas de los pacientes y su evolución, en relación con los microorganismos identificados más frecuentemente. Como se puede apreciar, en los pacientes en los que se aisló Shigella spp. se presentó con mayor frecuencia fiebre (63.0%) y sangre en las evacuaciones (43.4%), mientras que en los casos en los que se identificó Rotavirus se presentó con mayor frecuencia vómito (46.2%) y eritema glúteo (22.2%). La duración de la diarrea fue similar, independientemente del germen identificado. En los niños menores de 5 años, la frecuencia de deshidratación fue mayor para los casos en los que se identificó Rotavirus (13.3%) y E. Coli tixigénica (7.7%) y la disminución de peso fue mayor en los casos en los que se identificó Rotavirus (33.3%) y Giardia lambia (33.3%), aunque para este último análisis, el número de pacientes con giardiasis es muy escaso. A pesar de las variaciones en los porcentajes, no existen diferencias estadísticas entre todos los datos analizados en este Cuadro.

Respecto al estudio del moco fecal, se encontraron 10 leucocitos polimorfonucleares o más por campo a seco fuerte en los siguientes gérmenes y con la frecuencia que se anota: Shigella 44.4%, Salmonella spp. 22.2%, E. Coli citóxica 10.0% E. coli enteropatógena 5% y Aeromonas una de seis cepas. En los demás gérmenes identificados siempre se encontraron menos

CUADRO IV  
 CARACTERISTICAS CLINICAS Y EVOLUCION DE LOS PACIENTES CON DIARREA AGUDA,  
 DE ACUERDO A LOS MICROORGANISMOS MAS FRECUENTEMENTE IDENTIFICADOS

Microorganismo	No. de Cepas	Fiebre	SINTOMATOLOGIA %		Sangre en heces	EVOLUCION		Disminución de peso* %
			Vómito	Eritema glúteo		Días con diarrea (mediana)	Deshidratación* %	
<u>Escherichia coli*</u>								
Citotóxica	46	34.6	38.1	8.4	15.2	4.5	2.1	21.2
Toxigénica	26	29.4	42.5	10.2	15.3	3.0	7.7	19.8
Enteropatógena	17	32.3	39.3	9.3	11.8	4.0	0.0	16.3
<u>Shigella spp.</u>	46	63.0	41.3	10.9	43.4	4.0	4.3	22.2
Rotavirus	26	23.1	46.2	22.2	3.8	4.5	13.3	33.3
<u>Salmonella spp.</u>	9	44.4	33.3	11.1	11.1	3.0	0.0	0.0
<u>Giardia lamblia</u>	8	25.0	25.0	12.5	0.0	3.0	0.0	33.3

\* Datos calculados solamente en los menores de 5 años.

p > 0.05 entre los microorganismos, en relación a las características clínicas y la evolución.

de 10 leucocitos polimorfonucleares por campo. Cuando se analizaron únicamente los casos de diarrea con sangre, se encontraron 10 ó más polimorfonucleares por campo en el 70.5% de los pacientes con Shigella y en el 15.5% de los pacientes con identificación de otros microorganismos.

#### DISCUSION

Las características clínicas de los 374 casos que se incluyeron en este estudio, son muy parecidas a lo observado en la muestra total descrita en un trabajo realizado sobre DA (169), por lo que se considera que es representativa del tipo de pacientes que se atienden por DA en las clínicas de Coyoacán y de San Jerónimo. La metodología de laboratorio que se utilizó, empleó las técnicas más actualizadas para poder identificar a un mayor número de microorganismos potencialmente patógenos, de acuerdo a las últimas recomendaciones de la OMS (160).

La frecuencia de identificación de gérmenes en el grupo de pacientes (Cuadro II) es muy parecida a lo encontrado por otros autores tanto en nuestro país como en el extranjero (2,3), a pesar de que el tipo de pacientes es muy diferente: casos no hospitalizados, con un predominio de adultos y jóvenes y provenientes de población abiertas del área urbana. En

cambio, la frecuencia de aislamiento en el grupo testigo fue más elevada a lo encontrado habitualmente en las investigaciones en niños y no hubo diferencias estadísticamente significativas en relación al grupo de pacientes, con excepción de Shigella. Este hecho ya ha sido referido por otros autores (3,170) y dificulta la interpretación de un resultado positivo.

El germen que más frecuentemente se identificó fue -- E. Coli. en niños hospitalizados, este microorganismo se identifica, en general, en tercero o cuarto lugar (2,164). En este estudio se incluyó la identificación de E. coli citotóxica y de E. coli adherente. La primera fue, de las E. coli, la aislada con mayor frecuencia. Estudios recientes han señalado un número similar de aislamientos entre sujetos sanos y enfermos de DA y plantean la necesidad de realizar la cuantificación de la toxina Vero o de la toxina parecida a toxina de Shigella, para diferenciar entre ellos (171); pues se realizó un análisis solamente de tipo cualitativo. Para las E. coli adherentes aún hay pocas investigaciones para asignarles un verdadero papel patogénico (168); en este estudio no hubo diferencias respecto del grupo control. E. coli productora de toxina termolábil también se encontró con una frecuencia elevada; -- sin embargo, otros autores han encontrado cifras mayores -- (172). Están pendientes de procesarse las cepas de E. coli para la producción de toxina termoestable; en la mayoría de los trabajos, su frecuencia es mayor a la de las cepas productoras

ras de toxina termolábil (173,3). La identificación de cepas de E. coli enteropatógena se encontró en una frecuencia menor a lo esperado, pero no hubo diferencias con el grupo testigo.

El segundo germen más frecuentemente aislado fue Shigella; el porcentaje de aislamiento fue similar a lo encontrado en otros estudios en México (2,172). Predominó su identificación en los niños preescolares y escolares, como ya también se ha descrito (164). Rotavirus es el agente etiológico más frecuentemente identificado en niños menores de 2 años (164, 172), aunque en este estudio se identificó en segundo lugar. Al respecto se plantea la necesidad de la aplicación de técnicas de cultivo de células (MA-104) con la finalidad de aislar otros virus causantes de DA, capaces de crecer en este tipo de células. Así mismo, emplear las células 293 (línea celular transformada por el adenotipos), con el objeto de inocular las muestras diarreicas y aislar los adenovirus 40 y 41, causantes de diarrea en forma importante (164). Tales técnicas, podrán ser complementadas con la microscopía electrónica ME directa convencional con la finalidad de confirmar el diagnóstico (175); pues la prueba de Rotazyme (ELISA) (176,177), pudo haber disminuído su eficacia debido al decremento de la producción del virus o bien a la complejidad del antígeno con el anticuerpo local; en cuanto a ésto, el uso del radioinmuno ensayo también sería conveniente (178). No obstante, llama la atención la elevada frecuencia de identificación, de tales vi

rus en el grupo control, indicando con ello una alta circulación del virus entre la población.

Del resto de la población de los microorganismos, su frecuencia de identificación fue similar a lo encontrado en casos hospitalizados (2,3) y sólo se resaltaron dos aspectos: 1) la baja frecuencia de aislamiento de Campylobacter spp.; - este germen se ha identificado más frecuentemente en pacientes hospitalizados y en cantidades semiurbanas en México - -- (170). No se cuenta con explicación clara para esta diferencia; - 2) la baja frecuencia de identificación de Entamoeba histolytica; en otros estudios (164,173) se ha repetido este hallazgo, a pesar de lo cual se sigue pensando, por parte del personal médico, que la DA por amiba es frecuente, lo que se refleja en el amplio uso de metronidazol, tal como se hace ver en otros trabajos anteriores, concernientes a la DA (1,31).

En los pacientes con diarrea con sangre se identificaron con una frecuencia significativamente mayor Shigella y E. histolytica. Otros datos clínicos o características de la evolución de los pacientes no permiten sospechar, con cierto grado de seguridad, otros tipos de microorganismos (Cuadro IV).

El estudio del moco fecal, aunque no fue analizado en forma extensa por el bajo número de algunos germenos, permite concluir, sobre todo en los casos de diarrea con sangre, que

es orientado el diagnóstico de shigelosis, como ya ha sido mencionado (164).

De este modo, la identificación de los rotavirus y -- otros microorganismos potencialmente patógenos en DA, permitió a los médicos familiares tener información sobre el tipo de pa-  
cientes que se manejan; así como el comprobar que la frecuen-  
cia relativa de microorganismos fue muy parecida a lo referido  
en otras series de pacientes hospitalizados, pero que la fre-  
cuencia de identificación en el grupo testigo fue muy alta, di-  
ficultando su interpretación. Con los datos mencionados, se pu-  
do confirmar, que en la mayoría de los casos de DA, no es nece-  
sario practicar exámenes de laboratorio y que los datos clíni-  
cos per se, no permiten tener una orientación etiológica, ex-  
cepto en los casos de Shigella y amiba, en los que el signo --  
clínico más orientador es la presencia de sangre en las evacua-  
ciones.

#### TRATAMIENTO

El primer objetivo del tratamiento de la gastroenteri-  
tis por rotavirus, es el reemplazo de fluídos y electrolitos  
perdidos por vómito y diarrea. La administración de fluído in-  
travenoso ha sido usado con éxito por muchos años como trata-  
miento de la deshidratación en diarrea. Debido a que la faci-  
lidad para la administración de fluídos y electrolitos no han  
sido fácilmente disponibles en muchas partes del mundo; se --

han hecho esfuerzos intensos para evaluar la eficacia del fluido oral reemplazando la terapia anterior (101,102).

Tal terapia para la gastroenteritis por rotavirus fue exitosa, mediante el uso de soluciones electrolíticas glucosa o sacarosa (103). En otro estudio de rehidratación oral para diarrea infantil de etiología mezclada, en pacientes provistos de una solución de electrolitos con glucosa y un 92% de solución electrolítica con sacarosa, se observó como un tratamiento adecuado (104). El grupo experimentado con sacarosa presentó una corrección tardía de anomalías electrolíticas, de esta manera, un gran número de pacientes requirieron más de 24 hrs., de terapia. A partir de ésto, se concluye que la sacarosa puede ser empleada como un sustituto de glucosa; no obstante, las soluciones electrolíticas de glucosa son recomendadas. El estándar oral WHO electrolito-glucosa es una fórmula hecha con los siguientes componentes, en 1.lml de agua se agrega: 35 g. de NaCl, 2.5 g. NaCa, 1.5 g. KCl y 20 g. de glucosa. La eficiencia de las soluciones electrolíticas (electrolito-glucosa) conteniendo uno u otro 90 mmol Na/litro (WHO fórmula antes mencionada) o 50 mmol Na/litro fué evaluada en una buena alimentación de niños hospitalizados con diarrea aguda de varias causas, incluyendo a los rotavirus (105). Ambas concentraciones pueden ser establecidas como seguras y efectivas.

La leche humana, conteniendo anticuerpos de rotavirus - puede ser usada satisfactoriamente para tratamiento de niños inmunodeficientes por enfermedad ocasionada por infecciones - crónicas de rotavirus (106). En contraste, el calostro de vacas inmunizadas con rotavirus humano no fue efectivo para el tratamiento de niños con gastroenteritis aguda por rotavirus. (107).

## PREVENCIÓN Y CONTROL

Observaciones realizadas durante la epidemiología y estudios basados en hospitales de todas partes del mundo han evidenciado la necesidad sobre la prevención de la enfermedad -- causada por rotavirus (108,109). Estos han sido la causa de -- bastantes enfermedades diarreicas graves, lo cual ha requerido la hospitalización de niños y jóvenes. En tales ciudades, se han venido desarrollando enfermedades de tipo deshidratación; de lo cual aún se desconoce la elevada mortalidad que -- esta produzca. A su vez, también se han estado desarrollando diferentes situaciones como enfermedades diarreicas que representan la primer causa de muerte durante los dos primeros -- años de vida. Sin embargo, el tipo de etiología de rotavirus en diarrea infantil letal no ha sido demostrada formalmente, pero se considera probable que tales virus sean los responsables de una proporción significativa de muertes por enfermedades entéricas. Los rotavirus son raramente propensos para ser considerados como causa severa en enfermedades de deshidratación que aún no han podido ser tratados fácilmente como letales.

La intención de obtener una vacuna antirrotavírica ha sido con la finalidad de prevenir la gastroenteritis severa por rotavirus durante los primeros 2 años de vida, período en que tal enfermedad es más acentuada (110,111,109,112). Evidencias

disponibles de estudios en animales indican que la inmunidad intestinal local juega un papel importante en cuanto a la resistencia de enfermedad de rotavirus. Tales observaciones sugieren que la eficacia de una vacuna antirrotavírica depende - en gran parte, sobre la habilidad de estímulo intestinal al - producir anticuerpos IgA y otras formas de inmunidad local. - La efectividad de los intestinos en la estimulación de inmunidad local es el propósito de la infección involucrada en el - sitio local. Por esta razón, esfuerzos recientes sobre estu--dios experimentales sobre inmunoprofilaxis de rotavirus han - sido dirigidos hacia el desarrollo de vacunas de virus atenuados.

Un número de cuestiones comentan acerca de una estrategia efectiva por inmunoprofilaxis que ha sido desarrollada. - Así mismo, sobre que tan efectiva es la inmunidad homotípica en cuanto a la prevalencia, infección y enfermedad. La rein--fección dentro de alguno de los primeros años de vida, mani--fiesta ser un evento común en ciertos ambientes; sin embargo, aún se ignora que la reinfección por virus sea usualmente o - siempre representada por serotipos diferentes. En cuanto a --las técnicas para cultivo directo de rotavirus humano in-vi--tro, ahora pueden ser usadas para recuperar rotavirus humanos bajo vigilancia longitudinal y determinar a cada uno de los - serotipos aislados. Este tipo de información, al mismo tiempo que toda la descripción clínica detallada de cada una de las

enfermedades asociadas con infección por rotavirus, ha requerido de una valoración en cuanto al grado y duración de una inmunidad homotípica.

Lo anteriormente expuesto ha hecho posible continuar -- con los estudios a gran escala de niños que fueron infectados durante período neonatal, apareciendo en particular una especie de rotavirus (113). De tales pacientes experimentados casi el 50% presentaron episodios diarreicos por rotavirus; -- tres años después un cohorte de niños no fueron infectados -- con rotavirus por placenta (30% contra 85%); de los cuales -- ninguno de los 24 niños infectados ~~neonatalmente~~ desarrollaron severas enfermedades o reinfección, mientras que 8 de 20 que no fueron infectados neonatalmente desarrollaron severas enfermedades diarreicas asociadas con infección de rotavirus.

Durante los tres años del período de vigilancia, participantes en el estudio fueron infectados posnatalmente con especies de rotavirus, presentando al menos dos electroferotipos, donde ninguno correspondió a la especie responsable de infección neonatal. Las especies de rotavirus posnatales no fueron identificados como serotipos, pero basándose en observaciones hechas en otros estudios es probable que al menos -- dos serotipos están involucrados; puesto que en ambos fue observada una distribución corta y larga de ARN.

Es posible que el 50% del efecto protector se de en enfermedades diarreicas, observadas en estudios realizados a gran escala, los cuales reflejaron una inmunidad homotípica; no obstante, el efecto absoluto de protección acerca de las enfermedades diarréicas severas reflejaron ambas inmunidades, heterotípica y homotípica.

Se ha considerado que pruebas de inmunidad homotípica son relativamente efectivas en cuanto enfermedades diarréicas pues como la infección por rotavirus es superficial y principalmente implica el epitelio del intestino, experiencias con mutantes de otros virus que causan infección en la mucosa como virus influenza y virus RS, han indicado que la atenuación es usualmente asociada con la disminución en el nivel de replicación viral en el órgano blanco que también es el sitio en el que es iniciada la infección (110).

De este modo, experiencias con virus mutantes atenuados de la mucosa también indican que el decremento de la replicación está asociada con una disminución de la respuesta inmune. Esto pretende obtener un balance delicado entre una atenuación aceptable y una inmunogenicidad satisfactoria. En cuanto a la eficacia protectora del tipo de determinación del virus, se ha visto marginada, pues resulta difícil, pero no imposible al poder alcanzar un balance con un mutante que tenga un crecimiento significativamente menor en el intestino.

Acerca de las observaciones realizadas durante la vigilancia longitudinal de niños infectados durante el período -- neonatal se considera ha sido instructivo (113). Las infecciones neonatales que han ocurrido en estos estudios al parecer, han sido atenuadas, porque los síntomas primarios asintomáticos han sido asociados con una leve diarrea. Por lo tanto, tales infecciones inducen a una inmunidad de diarrea por rotavirus al menos durante 3 años. De este modo, esto indica que -- una infección atenuada puede ser protectora.

En cuanto a la inmunidad heterotípica, existe un cuestionamiento sobre los serotipos que pueden ser incluidos en -- una vacuna de rotavirus en el orden en que provea de una máxima protección (114). Hay 4 serotipos de rotavirus humano reconocidos, pero uno de ellos, el serotipo 4, no es frecuentemente encontrado como una causa de tal enfermedad. Considerando ésto, se pretende una protección efectiva acerca de la gastroenteritis infecciosa, siendo prevista por una vacuna trivalente (tipo 1,2,3). Así mismo, se cuenta con la posibilidad de -- que la inmunidad heterotípica puede ser inducida por uno o -- dos serotipos para la protección de la enfermedad por rotavirus.

Estudios epidemiológicos, no han sido útiles en cuanto el arreglo de sus productos. La reinfección ocurre comunmente durante algunos de los primeros años de vida, desconociendo -- si la reinfección es heterotípicamente primaria.

La inmunidad heterotípica de vacas y lechoncillos genobióticos ha sido demostrada entre un rotavirus animal (serotipo 6 bovino) y un rotavirus humano (serotipo 1) (115,116,117). La descendencia de las vacas infectadas in-útero con rotavirus bovino, resistió el desafío con rotavirus humano. Sin embargo, en otros estudios con lechoncillos y vacas, la inmunidad homotípica pero no heterotípica demostró que las especies de rotavirus son dañinas; no obstante, en ciertos momentos la gravedad de la diarrea fue reducida siguiendo el desafío heterotípico (118,119,120,121). De todas maneras, la inmunidad heterotípica afectiva puede ser inducida en humanos por infección con rotavirus animales permaneciendo en ellos para ser determinados. Generalmente, la inmunidad heterotípica de virus es mas trascendental que la inmunidad homotípica, y esto puede limitar la utilidad de un "Jennerian" llevando a la inmunoprofilaxis a los rotavirus.

Dos especies de rotavirus bovino, NCDV y UK, han sido evaluados por atenuación en humanos (122,123). Ambos fueron observados satisfactoriamente atenuados y escasamente inmunogénicos en voluntarios adultos. El primer virus adaptado al frío, fue un mutante de NCDV, el cual también fue evaluado en jóvenes (122,124). Los mutantes de NCDV también fueron atenuados en ellos de manera individual, los cuales frecuentemente desarrollaron anticuerpos homotípicos y ocasionalmente anticuerpos heterotípicos que reaccionarán con rotavirus huma-

nos. De este modo, la vacuna de NCDV, mostró una protección - significativamente en cuanto a la gastroenteritis por rotavirus en niños jóvenes (124).

Hace tiempo, el mayor obstáculo para el desarrollo de - rotavirus humanos mutantes para uso en inmunización, había co rrespondido a esos virus fastidiosos naturales, los cuales no podían ser pasados seriadamente en cultivo celular. No obstan te, después de algunos años tal situación cambió drásticamente. Primero el mutante adaptado al cultivo de tejido del rota virus Wa (serotipo 1) fue recuperado durante pases seriados - de los virus en lechoncillos genobióticos (95). A partir de - esto, procedimientos simples fueron desarrollados para la se lección de rotavirus mutantes humanos que crecieron eficiente mente en cultivo celular. Ahora, más especies de rotavirus hu manos pueden ser cultivadas por este prodecimiento.

La primer especie de rotavirus humano (Wa) cultivable - ha sido evaluada por atenuación en 10 voluntarios adultos sus ceptibles e individuos con una cantidad baja de anticuerpos - en suero homotípico (125,126,123). Seis de los voluntarios -- quedaron infectados y desarrollaron anticuerpos sin enfermar- se. Estas observaciones sugieren que los rotavirus mutantes Wa adaptados al cultivo de tejidos fueron atenuados por los adul tos susceptibles. De todas maneras estos virus en niños y jó venes susceptibles y en todo caso mantienen tal propiedad des

pués de la replicación in-vivo permaneciendo para ser determinada.

Diferentes aproximaciones sobre el desarrollo de vacunas atenuadas de especies de rotavirus ha tomado ventaja del segmento del genoma de estos virus y su propensión a estar sometido a un rearrreglo genético durante la coinfección (110,111, 96, 127, 109,128). Una serie de virus con reacomodo genético han sido aislados para coinfección de cultivos con un rotavirus animal de tipo silvestre cultivable (especie de rotavirus bovino UK ó resus) y un rotavirus humano cultivable (127,128). Los rotavirus humanos "no cultivables" representaron a cada uno de los cuatro serotipos humanos, los cuales no fueron adaptados a un cultivo celular. El antisuero monoespecífico dirigido en cuanto al rotavirus animal progenitor o anticuerpos monoclonales dirigidos al rotavirus animal progenitor VP7, el cual fue usado y seleccionado por virus reacomodados con neutralización específica de rotavirus humano.

Este procedimiento de selección produjo muchos reacomodos que recibieron algún segmento del gen codificado por VP7 (la mayor proteína de neutralización), para el rotavirus humano progenitor, ya que permanecieron 10 genes derivados por el rotavirus animal progenitor. De esta manera, fue posible aislar un solo gen de rotavirus por sustitución dada durante el reacomodo, en que el gen de rotavirus para VP7 del serotipo -

1,2, ó 3 presentaron antecedentes de los 10 genes de rotavirus animales (127,128). De todas maneras, aún no es aclarado el serotipo 4 reacomodado que contienen uno o dos genes de origen rotavirus humano (129). A excepción de estos reacomodos se exhibe la especificidad de neutralización del rotavirus humano progenitor.

Ahora se sabe que ambos rotavirus el bovino UK y rhesus son atenuados en voluntarios adultos (130,126,123). De esto es probable que la presencia de 10 genes de rotavirus bovino y 10 de rhesus en el reacomodo genético, resultarán atenuados por humanos. Posteriormente estudios de hibridización de RNA-RNA involucraron a estos rotavirus, y los cuatro rotavirus humanos indican diferencias considerables entre los genes de rotavirus bovino y rhesus así como los genes correspondientes a los rotavirus humanos (131). Esto sugiere, que bajo condiciones naturales los rotavirus de bovino, simio y humano exhiben una especificidad en el huésped y los genes de esos virus son seleccionados durante un largo período en cuanto a función óptima en células o de su huésped natural.

Otras aproximaciones sobre la inmunización también son posibles. Acerca de esto, se trata de el uso de la proteína viral expresada por rotavirus clonados cDNA (132). El gene VP7 de los rotavirus de simio SA-11, al igual que RRV (serotipo 3), los rotavirus bovino NCDN al igual que UK (serotipo 6)

y los rotavirus humanos Wa (serotipo 1) han sido clonados, y el extremo completo o casi completo de cDNA es disponible para la expresión de la glicoproteína de cápside externa en sistemas de células procariota o eucariotas (133,134,135,132).

Es poco probable que el gene VP7 producido de esta manera cuenta con un estímulo primario efectivo en una respuesta inmune intestinal, el antígeno es administrado especialmente por vía parenteral. Sin embargo, una inoculación parenteral de gene VP7 es una prueba de fuerte utilidad en cuanto a la preparación de una respuesta inmune, administrando previamente una vacuna de virus atenuado o favoreciendo una respuesta inmune después de haber dado una vacuna de virus vivo (136).

Conociendo la secuencia de nucleótidos del gene VP7, para la variedad de rotavirus se ha hecho posible que otros - - aproximen una vacunación involucrada con el uso de péptidos - sintéticos que corresponden a un mayor sitio antigénico de -- esa proteína (137,138,139); además, los péptidos sintéticos - pueden ser preparados en cuanto sea necesario para definir la secuencia de aminoácidos del mejor sitio antigénico sobre el gene VP7 (134,135). Esto puede ser realizado por varias aproximaciones que incluyen.

(a) Una comparación de secuencia de aminoácidos VP7 para virus que difieren por neutralización cruzada; este tipo de análisis ha permitido la indentificación de regiones elevada

das que frecuentemente representan mayores sitios antigénicos.

(b) El análisis de secuencias de mutantes espontáneos -- que resisten neutralización por anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante; éstos se acercan para permitir la -- identificación de epítopes (regiones pequeñas dentro del sitio antigénico) al reaccionar con anticuerpos semejantes y, -

(c) La identificación de elevadas regiones hidrofílicas que ocupan un sitio exterior y accesible sobre la molécula -- del gene VP7.

Algunos de los mejores sitios antigénicos han sido iden tificados por péptidos sintéticos que corresponden a sitios - en la secuencia; éstos pueden ser evaluados por su utilidad - en inmunoprofilaxis. Por ejemplo, son una prueba útil en la - preparación de una respuesta inmune de rotavirus atenuado - - (136, 140, 141). Un efecto con la preparación de péptidos sin téticos recientes fue demostrado con poliovirus (136). En co- nejos inmunizados con poliovirus VP1 los péptidos correspon- dieron a un mayor sitio antigénico no desarrollando anticuer- pos neutralizantes; sin embargo, ellos respondieron a una ino culación subsecuente que subinmunizando cantidades de virus - desarrollaron una elevada concentración de anticuerpos neutra lizantes. Tal vez como una preparación de un efecto fuerte -- por convertir la respuesta inmune moderada usualmente sea in- ducida por virus mutante atenuados con una respuesta de alto nivel, pareciéndose con los virus virulentos.

Finalmentè, la inmunización pasiva ha sido considerada como efectiva en la prevenci3n de enfermedades por rotavirus en animales (142,143,144,145,146,147,148,149,150). Estudios similares ahora son llevados a cabo completamente en ni3os y j3venes con resultados prometedores. La protecci3n pasiva de neonatos acerca de los s3ntomas gastrointestinales asociados con rotavirus en una guarder3a fueron observados siguiendo la administraci3n oral de gama-globulina conteniendo anticuerpos anti-rotavirus (151). Adem3s, la administraci3n oral de calostro de vaca inmunizada con rotavirus humano fu3 observada al prevenir enfermedades durante una epidemia de rotavirus que tambi3n enferm3 a ni3os (107).

METODOS DE CONTROL Y PREVENCION DE LAS  
ENFERMEDADES DIARREICAS.

En condiciones experimentales se ha demostrado que los anticuerpos presentes en los intestinos confieren inmunidad contra los rotavirus. En los animales la infección y diarrea por rotavirus pueden evitarse mediante la ingestión de preparaciones ricas en anticuerpos contra rotavirus (143,152,149). La inoculación de rotavirus por vía parenteral de vacas paridas aumentó y prolongó la secreción de anticuerpos IgG en la leche durante un plazo de hasta 28 días. Aunque esos anticuerpos aplazaron la infección por rotavirus en los terneros lactantes, no evitaron la enfermedad (153).

Según los investigadores, la fuerte dosis inoculada superó el efecto protector de la leche. El mismo grupo llevó a cabo un experimento similar con ovejas y sus crías como modelos de rumiantes. Esta vez, la dosis de virus inoculada fue 4 log menor, y protegió a los corderos (154).

Hace poco se evitó la diarrea causada por rotavirus en los neonatos hospitalizados que permanecían en una unidad de atención especial para recién nacidos por medio de la administración oral de IgG (151).

Actualmente se considera la posibilidad de inmunizar a mujeres gestantes por vía oral o parenteral para reforzar los

títulos de anticuerpos en la leche y evitar las infecciones y la diarrea causadas por rotavirus en lactantes, especialmente en los países en desarrollo. (8)

En Gran Bretaña se notificó el caso de una madre lactante en cuya leche no se detectaron anticuerpos. El niño contrajo diarrea causada por rotavirus a las 43 semanas, pero 9 - - días después del episodio se observó un aumento considerable de la IgA específica contra rotavirus en la leche de la madre e IgG específica en el suero (155).

Se considera preciso determinar la edad óptima para la administración de una vacuna contra los rotavirus. Se ha propuesto la vacunación durante las primeras semanas de vida. -- Existen indicios no confirmados de que los niños que contraen infecciones por rotavirus durante el período neonatal tienen menos posibilidades de contraer enfermedades en caso de reinfecciones posteriores (113).

La estrategia de la vacunación neonatal es prometedora, a juzgar por los estudios con terneros vacunados in-útero con una cepa bovina y luego inoculados al nacer con un rotavirus humano. La protección fue mayor en los terneros vacunados que en el grupo testigo (116). Sin embargo, antes de recomendar - la vacunación neonatal hay que tener en cuenta otros factores como el desarrollo y persistencia de la respuesta inmunitaria y el efecto de la lactancia natural.

Es necesario encontrar una cepa adecuada para la vacuna. Todavía no es posible cultivar en altos títulos los rotavirus humanos, y la replicación eficaz en los histocultivos se logra sólo después del pasaje repetido de especímenes fecales con un gran número de partículas. Se necesita un nuevo adelanto en el cultivo de rotavirus humano a fin de desarrollar cepas atenuadas para que las compañías productoras de vacunas puedan disponer de grandes cantidades de virus atenuado, necesarias para las campañas de vacunación en masa que se han propuesto. Es posible evitar esos problemas, usando un rotavirus heterólogo que proporcione una protección cruzada contra la infección por rotavirus humano.

En Finlandia hace poco se realizaron pruebas de la inmunogenicidad e inocuidad de la vacuna oral de la cepa RIT 4237 de rotavirus bovino vivo en 20 adultos y 20 niños (122). Una dosis produjo seroconversión homóloga en el 70% de los casos seronegativos y respuesta de refuerzo en el 25% de los niños seropositivos. En el suero de tres niños se comprobó la presencia de anticuerpos neutralizadores heterólogos del rotavirus humano. Los resultados de esta primera prueba de la vacuna son alentadores, ya que se comprobó la inmunogenicidad de la cepa bovina administrada por vía oral y la ausencia de reacciones intestinales o funcionales.

Es preciso investigar nuevos métodos de vacunación. Hace poco se realizó clonaje molecular de genes de rotavirus -- (156,157). Es posible que dentro de poco tiempo se logre el clonaje de genes o secuencias que codifiquen para polipéptidos que, a su vez, induzcan la aparición de anticuerpos neutralizadores. También es posible que con la tecnología de recombinación de ADN se obtenga un toxoide colérico/LT/ST que pueda combinarse con una vacuna preparada con una subunidad de rotavirus, administrada oralmente. Si esa vacuna no produce una concentración satisfactoria de anticuerpos en los intestinos, se podría producir cepas con modificaciones genéticas que no tengan las secuencias causantes de la virulencia. Sin embargo, hay que destacar también la importancia molecular y epidemiología de los "pararrotavirus" descubiertos recientemente (58,158).

## COMENTARIOS

A manera de comentario, a continuación se elaborará un desarrollo cronológico sobre la obtención de la vacuna de rotavirus y su aplicación hasta el momento en grupos piloto.

En 1986, el uso de técnicas convencionales de cultivo celular para mantener el crecimiento de especies de rotavirus animal eran consideradas la gran promesa para el desarrollo de una vacuna efectiva de rotavirus para humanos. De este modo, el aprovechamiento "Jennerian" debía inducir a una inmunidad adecuada de la enfermedad incluida por cada uno de los -- cuatro serotipos de rotavirus, mediante el reacomodo en la -- sustitución de un gen para cada serotipo que estuviera disponible.

En ese momento, no se había obtenido ninguna de esas vacunas que se consideraban como probables para prevenir enfermedades de gastroenteritis; esto fue debido a la carencia del grupo A de rotavirus (también conocido como "pararrotavirus") lo cual, causó epidemias considerables en China (179). Estos agentes que no fueron parte del grupo antigénico común fueron recuperados sólo esporádicamente fuera de China, manteniéndolos cuidadosamente para su posterior determinación (180).

En el transcurso del mismo año se evaluó el curso de -- utilidad de un panel de anticuerpo monoclonal para la identi\_

ficación serotípica de más de 1000 estratos de rotavirus positivos almacenados desde 1975. Además se realizaron anticuerpos monoclonales frente a la carencia de distribución de los serotipos 1 y 3 aislados; con la esperanza de que la inoculación en el panel de anticuerpo monoclonal produjera un mejoramiento en la identificación de tales serotipos (186).

De esta manera, estudios epidemiológicos pensaban dar un poco de luz a la variación antigénica; pues se había observado la influencia de la misma en la eficacia de vacunas de rotavirus.

Hasta 1988, una proporción considerable de episodios -- con GE en niños había sido estática y de etiología desconocida, especialmente en el área de GE adquirida por la comunidad. Sin embargo, en este año, nuevos agentes etiológicos habían sido descubiertos, tales como los adenovirus entéricos, los cuales serían incluidos para futuras investigaciones; y a su vez, indirectamente proveerían de mayor información detallada acerca de las características de GE por rotavirus (181).

En este mismo año, la comprensión de un diagnóstico serológico había revelado una enorme proporción uniforme de GE por rotavirus. Así mismo, una sugerencia en cuanto a las manifestaciones respiratorias a nivel superior en GE por rotavirus las cuales eran debido a la coexistencia de dos agentes infecciosos diferentes, y no a los rotavirus por sí mismos --

(182); no obstante esto necesitaba ser bien confirmado por investigación de tales agentes. También, se incluían estudios que presumiblemente contaban con métodos más sensibles de cultivo, que podían proveer de una mayor evidencia verdadera o - correcta para estimar la ausencia o presencia de los rotavi-- rus en el tracto superior y consecuentemente de la probabili-- dad de infecciones por rotavirus a nivel aéreo.

De esta manera, la gastroenteritis por rotavirus nosoco-- mial no había sido solamente un asunto de inconformidad en - cuanto a los niños así como de implicaciones financieras sino que también había presentado un reto para el apoyo a conside-- rar en cuanto a su intento higiénico. De esta manera, estu-- dios sobre los efectos de sistemas semejantes aunque difíci-- les de realizar de una manera apropiada científicamente (183), necesitaba ser aprobado.

Estudios sobre GE por rotavirus nosocomial, incluía la detección de diferentes especies de rotavirus y serotipos; co-- mo comparaciones de esto sería posible encontrar episodios adquiridos en la comunidad. Lo cual, indudablemente produciría mayor información detallada acerca de la epidemiología de - - diagnóstico.

En cuanto a los progresos recientes en el cultivo de ro-- tavirus humano, se había dado la posibilidad para la medición

de la respuesta inmune específica de los serotipos (184). Del mismo modo, estudios sobre tal correlación con rotavirus IgA y un supuesto muy interesante de esa naturaleza adquirida por los anticuerpos del organismo, solamente han permitido detectar de los cuales gran parte han presentado un efecto protector frente a la naturaleza adquirida por la infección de rotavirus, deberán incluir la examinación de la respuesta inmune serotípica gastrointestinal.

La duración del efecto protector relacionado con el anticuerpo también necesitaba investigación. Chiba et al. 1986 y Hjelt et al. en 1987, tendieron a establecer una duración de al menos 6 meses pero, no obstante sin probar la relación anticuerpo; Bishop et al. en 1983 reportaron que el efecto protector de la infección neonatal por rotavirus era de por lo menos 3 años.

Entre otras impresiones podía producirse un enigma de que la mayoría de infecciones neonatales por rotavirus serían asintomáticas mientras que algunas completamente severas. Si esta situación permaneciera, podría llevar a acontecer para un organismo un huésped específico debido a los factores semejantes de rotavirus específicos de diferente especie o tipo.

Hjelt et al. en 1987, descubrieron la edad en que por sí mismos tenían un efecto protector en niños y preescolares. Sin embargo, necesitaban ser investigados preferiblemente a

futuro en el laboratorio por estudios con medición directa de interacción enterocito-rotavirus, no solamente en especies -- animales (181), sino también en biopsias pequeñas de intesti- no humano obtenidas para la defensa de niños con enfermedades gastrointestinales.

De este modo, la mayor recompensa en el campo de inves- tiguación de los rotavirus era indudablemente establecer los - esfuerzos necesarios para hallar una vacuna efectiva contra - rotavirus. Tal bojetivo se había hecho más urgente, después - de haber realizado previamente una vacuna para candidato RIT 4237; de este modo, hasta el momento se había considerado man- tener alguna promesa que demostrara la ineficacia en ambien- tes tropicales (185). Esto era una esperanza en cuanto a los estudios con que se contaban los aspectos inmunológicos de in- fección de rotavirus (187). Al respecto, algunas observacio- nes sobre el desarrollo de la respuesta en la mucosa adquiri- da en cierta neutralidad en las infecciones virales y la admi- nistración de vacunas virales por diferentes vías, mostraba - que la inmunización parenteral con cierta vida (virus rubeola RA27/3), como algunas vacunas inactivadas son capaces de as- cender, variando los niveles de respuesta en las superficies mucosas. Esto se manifestaba al menos, por las vacunas de po- liovirus, que con una preparación parenteral con IPV (vacuna de Polio Inactivada) seguida por una inmunización oral con po

liovacuna viva era más efectiva; pues inducía a una elevada - respuesta de anticuerpos en la mucosa nasofaríngea que solo - repetía la inmunización parenteral con IPV.

No obstante, a pesar de la vía de inmunización, los niveles de anticuerpo IgA de virus específico en la nasofaringe tenía una mejor influencia limitando la replicación de polivirus sobre una posible reinfección subsecuente. Estudios en -- animales han seguido adelante con RSV (virus sincitial respiratorio); los cuales sugirieron que la inmunización intestinal puede ser tan efectiva como la del tracto respiratorio induciendo una respuesta de anticuerpo IgA en el tracto respiratorio. Sin embargo, experimentos de una reinfección subsecuente sugieren que la inmunización intestinal, es determinación del resultado o consecuencia del enfrentamiento subsecuente con - el virus en el tracto respiratorio (188).

De esta manera, considerando la vía de inmunización; -- así como una vacuna de RV con serotipo, potente multivalente y pruebas mejoradas para la medición de potencia de la vacuna, ayudarán a eliminar la necesidad de preprobar la eficacia de la vacunación en cada ciudad seleccionada para este fin. - Sin embargo, tal necesidad continúa para los ensayos de vacunas en varias ciudades debido a la patogénesis y epidemiología de RV, así como en la manera en que difieren los serotiopos de rotavirus dentro y entre las ciudades. De este modo, -

aunque la vacunología de los rotavirus es compleja, esto mismo debe forjar a que se continúe con el conocimiento de la inmunopatogénesis así como de la epidemiología de los RV, debido a la importancia de control de la GIA por RV a nivel mundial (189).

Hasta 1989, tres vacunas orales de rotavirus diferentes han sido probadas en Suecia y se ha establecido su prevención efectiva para la diarrea por rotavirus (190,191). Debido a -- que los cuatro serotipos de rotavirus son comunmente establecidos en humanos, la eficacia de la vacuna presenta una medida de protección para cada uno de los serotipos. Dos de las - vacunas son derivadas de los rotavirus bovinos (serotipo 6), RIT 4237 realizadas por Smith-Kline-RIT (Rixensart, Belgium) (190), y el WC-3 realizada en el Instituto Wistar de Philadelphia (191).

La protección frente a la diarrea por rotavirus en - -- áreas de prueba, con serotipos humanos fue predominante. La - vacuna de rotavirus rhesus (RRV) especie MMV-18006 (serotipo 3), fue desarrollada en el instituto Nacional de Salubridad, siendo efectiva en el área de pruebas donde la especie de rotavirus circulante fue el serotipo homólogo (192). Sin embargo, la eficacia no ha sido demostrada en pruebas que involu-- cren a niños indios americanos en prácticas de pediatras en - el estado de Nueva York, que sugieran que el efecto de la vacuna pueda ser un serotipo específico (193).

Los resultados reportados de un área de prueba con RRV en Umea, Suecia, entre Junio de 1985 y Mayo de 1986; documentaron una protección significativa heteróloga de la misma especie (MMV-18006) de la vacuna RRV, entre dos temporadas invernales. También se identificó una elevada medida de leves reacciones adversas de la vacuna en niños de 5 a 12 meses de edad. Esta observación llevó a que en tal prueba, la reactogenicidad disminuyera mientras que la inmunogenicidad fue mantenida por la administración de la vacuna a niños menores en una dosis 10 veces más baja, al mismo tiempo con una solución amortiguadora (189).

Posteriormente a la aplicación de la vacuna, fueron presentadas reacciones adversas (fiebre y diarrea), que no habían sido anticipadas previamente en estudios con esa vacuna (194,193,195). Esas reacciones también se observaron en una prueba simultáneamente en Finlandia (196). El seguimiento de este estudio ha documentado que la frecuencia de las reacciones han disminuido en niños y jóvenes sugiriendo que el factor relacionado con la edad así como los anticuerpos maternos pueden atenuar la respuesta a la vacuna y siendo de otra manera muy reactogénica. Esos anticuerpos maternos son la clave de esa afinidad de los niños con un bajo peso al nacimiento y a su vez presentando bajos niveles de anticuerpos naturales; por lo cual se pueden esperar el desarrollo de reacciones de inmunización adversas con rotavirus rhesus.

Restos desconocidos presentes en madres Suecas han tenido una baja prevalencia de anticuerpos de rotavirus que atraviesan la placenta.

En las pruebas de RRV se informa que la vacuna ha sido administrada junto con una solución amortiguadora de bicarbonato (20-30 ml.). Sus resultados indicaron que esto fue prudente, pues el empleo de tal solución puso de manifiesto el incremento de la respuesta del anticuerpo en el suero.

De esta manera, en futuros trabajos será necesario alcanzar el mismo nivel de inmunogenicidad, pues quizás por el incremento del título de la vacuna conocida en jóvenes, con anticuerpos trasplacentarios se mantuvo mayor tiempo por ser complementada con la solución buffer. Simultáneamente, sus descubrimientos sugirieron que los niños que no habían sido vacunados, no serían correctamente inmunizados, a diferencia de los alimentados por leche materna; pues la actividad neutralizante en esta leche podía alterar la dosis del virus de la vacuna que penetra al intestino. Por lo tanto, la inmunogenicidad de la vacuna conocida en bajas dosis podía ser significativamente alterada con una pequeña cantidad de buffer; así mismo, parece probable, que la leche materna pueda tener elevados títulos de actividad neutralizante, efecto similar a la vacuna (181). De este modo, los regímenes alternados de vacunación necesitarán considerar el alimento del niño.

## BIBLIOGRAFIA

1. Guiscafre H.; Muñoz O.; Padilla G. y col. (1988): Estrategias para mejorar los patrones terapéuticos utilizados en diarrea aguda, en unidades de atención médica primaria. VI. Evaluación de una estrategia dirigida a los médicos familiares para incrementar el uso de hidratación y disminuir el de antimicrobianos y dietas restrictivas. Arch. Invest. Med. (Méx.): 19:395-408.
2. Pickering L.; Evans D.; Muñoz O. y col. (1978): Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and México. J. Pediatric.; 93:383-388.
3. Nelson J. (1985): Etiology and epidemiology of diarrheal diseases in the United States. Am J. Med.; 78:76-78.
4. Instituto Mexicano del Seguro Social: Departamento de Estadística.  
Jefatura de Medicina Familiar. 1986.
5. Gordon, I. (1985): The nonamebic nonbacillary diarrheal disorders. Am. J. Trop. Med. Hyg. 4:739-755.
6. Ramos-Alvarez, M. (1956): Cytopathogenic enteric viruses associated with undifferentiated diarrheal syndrome in early childhood. Ann. NY. Acad. Sci. 67:326-331.

7. Kjellen, L., Zetterberg, A. y Svedmyr, A. (1957): An epidemic among Swedish children caused by adenovirus type 3. Acta Paediatr. 46:561-568.
8. Simhon A. (1985): Virología de los rotavirus y epidemiología de la diarrea por rotavirus. Bol. of Sanit. Panam. 98:295-307.
9. Stoll, B.J., Glass, R.I., Huq, M.I., Khan, M.U., Holt, J.E. y Banu, H. (1982): Surveillance of patients attending a diarrheal disease hospital in Bangladesh. Br. Med. J. 285: 1185-1188.
10. Black, R.E., Brown, K.H., Becker, S., Alim, A.R.M.A., y Huq, I. (1982): Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth rural Bangladesh. II. Incidence of diarrhea and association with known pathogens. Am J. Epidemiol. 115: 315-324.
11. Mata, L., Simhon, A., Padilla, R., Gamboa, M.M., Vargas, G., Hernández, F., Mohs, E. y Lizano, C. (1983): Diarrhea associated with rotaviruses, enterotoxigenic *Escherichia coli*, Campylobacter and other agents in Costa Rican children, 1976-1981. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: - - - 146-153.

12. Mata, L., Bolaños, H., Pizarro, P. y Vives, M. (1984). Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rican rural and urban areas. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 24-29.
13. Mata, L., Simhon, A., Urrutia, J.J., Kronmal, R.A., Fernández, R. y García B. (1983), Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. J. Infect. Dis. 148:452-461.
14. Tirrel DAJ. Kapikian AZ. (1982): Virus Infections of the Gastrointestinal Tract. New York, Marcel Dekker.
15. Blacklow WR., Cukor, G. (1981): Viral Gastroenteritis. N. Engl. J. Med. 304:397.
16. Steinhoff, M.C. (1980): Rotavirus: The firsts years. J. Pediatr. 96:61.
- 17.- Blacklow, N.R., D.S. Schreiber, and J.S. Trier. (1978). Viral enteritis. In L. Weinstein and B. Fields. (ed). Seminars in infectious disease, Stratton, N.Y. 1: 256-277.
18. Flewett, T.H., and G.N. Woode. (1978): The rotaviruses. Arch. Virol. 57:1-23 .

19. Matthews, R.E.F. (1979): The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in The Hague, September. 1978. Intervirology. 11:133-135.
20. Welch, A.B. y Thompson, T.L. (1973): Physicochemical characterization of a neonatal calf diarrhea virus. Can J. Comp. Med. 37:295-301.
21. Kapikian, A.Z., W.L. Cline, W.H. Kim, A.R. Kalica, R.G. Wyatt, D.H., Vankirk, R.M. Chanock, H.D. James, and A.L. Vaughan. (1976): Antigenic relations among five reovirus-like (RVL) agents by complement fixation (CF) and development of new substitute CF antigens for the human RVL agent of infantile gastroenteritis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152:535-539.
22. Homes, I.H., Buck, B.J., Bishop. R.F., and Davidson. G.P. (1975): Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. H. Virol. 16:937-943.
23. Kapikian, A.Z., Chanock, R.M. (1985): Rotaviruses In: Fields BN and col. eds.: Virology. New York. Raven - - Press. 863-906.
- 24.- Wyatt, R.G., James, H.D., Pittman, A.L., and col. (1983): Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. J. Clin. Microbiol. 18:310-317.

25. Davidson, G.P., Goller, I., Bishop, R.F., Townley, R.R.W., Holmes, I.H., and Ruch, B.J. (1975): Immunofluorescence in duodenal mucosa of children with acute enteritis due to a new virus. J. Clin. Pathol. 28:263.
26. Ørstavik, I., and Havy, K.W. (1976): Virus specific IgM antibodies in acute gastroenteritis due to a reovirus-like agent (rotavirus). Scand J. Infect Dis. 8:327.
27. Konno, T., Suzuki, H., Imai, A., and Tshida, N. (1977): Reovirus-like agent in acute epidemic gastroenteritis in Japanese infants: fecal shedding and serologic response. J. Infect Dis. 135:259
28. Trujillo, H., Jaramillo, C. Restrepo, M. y col. (1982): Rotavirus y otros enteropatógenos en la etiología de la diarrea aguda en Medellin, Colombia. Bol. of Sanit Panam. 98:251-259.
29. Yolken, R.H. Wyatt, R.G. Kim, H.W. Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. (1978): Immunological response to infection with human reovirus-like agent. Infect. Immun. 19:540.
30. Kapikian, A.Z., Chanock, R.M. (1984): Rotaviruses. Virology, New York. Raven Press. 763-803.

31. Champasaur H., Questaux, E. Prevot, J. col. (1984): Rotavirus carriage, asymptomatic infection, and disease in the first two yerars of life. I. Virus aheding J. Infect. Dis. 149:667-674.
32. Yolken, R.H., Bishop, C.A., Townsend, T.R. (1982): Infecticus gastroenteritis in bonemarrow trasplant recipients. N. Engl. J. Med. 306: 1009-1012
33. DuPont, H.L. (1984): Rotaviral gastroenteritis some recent developments. J. Infect. Dis. 149:660-700.
34. Edelman, C.M. (1973): Antibody structure and molecular immunology. Science. 180-830.
35. Bienestok, J. (1974): The physiology of the local immune response and the gastro-intestinal tract. En l. - -- Brent and J. Holborow. Immunology II. Vol. 4, Amsterdam, North Hollan. p. 197.
36. Buxbaum, J. (1973): The biosynthesis, assembly and secretion of immunoglobulins. Semin Hemat. 10,33.
37. Hamilton, J.R. (1985): Viral diarrhea. Pediatric Annals. 14:25-28.
38. Muñoz, O Coello, R.P., Serafín, A.F. y col. (1979): Gastroenteritis infecciosa aguda. Etiología y su corre-lación con las manifestaciones clínicas y modo focal. Arch. Invest. Med. (Méx.), 10:135-145.

39. Espinosa-Larios E.L., Colorado-Domínguez J., Padilla-Fierro R., Cetina-Sauri C., Durán-Liñán G., Ruíz-Gómez J. (1983); Frecuencia de gastroenteritis infecciosa aguda por rotavirus en niños de diversas poblaciones de la República Mexicana. Bol. Med. Hosp. Infant.. Méx. 40: 188-191.
40. Gurwith, M., Wenman, W., Hinde, D., Feltham, S., Greenberg, H.A. (1981): Prospective study of rotavirus infection in infants and young children. J. Infect. Dis. 144: 218-224.
- 41.- Davidson, G.P., Hogg, R.J., Kirubakaron, C.P. (1983): Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. Infect. Immun. 40:447-452.
- 42.- Espinosa-Larios E.L., Ruíz - Gómez J. (1981): Persistencia de anticuerpos transplacentarios contra rotavirus en niños menores de seis meses de edad. Bol. Med. Hosp. Infan. (Méx.). 38:595-598.
- 43.- Ruíz-Gómez J., Alvarez-Muñoz MT., Silva-Acosta C., Huerta Hernández E., Jiménez R.M. (1981): Rotavirus I. Anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y fijadores del complemento en individuos de la ciudad de México. Arch. Invest. Med. (Méx.). 12: 121 - 131.

- 44.- Yamaguchi H., Inovye S., Yamauchi M., y col. (1985): Anamnestic response in fecal IgA antibody production after rotaviral infection of infants. J. Infect. Dis. 152:398-400.
- 45.- Flewett, T.M. (1983): Rotavirus in the home and hospital nursery. Br. Med. J. 287: 568-569.
- 46.- Marrie, T.J., Lee, S.H.S., Faulkner, R.S., Ethier, J., and Young, C.H. (1982): Rotavirus infection in a geriatric population. Arch. Intern. Med. 142: 313-316.
- 47.- Hoshino, Y., Wyatt, R.G., Greenberg, H.B., Flores, J., and Kapikian, A.Z. (1984): Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque production neutralization. J. Infect. Dis. 149: 694-702.
- 48.- Brandt, C.D., Kim, H.W., Yolken, R.H., Kapikian, A.Z., Arrubio, J.O., Rodríguez, W.J., Wyatt, R.G., Chanock, R.M., and Parrott, R.H. (1979): Comparative epidemiology of two rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis. Am. J. Epidemiol. 110:243-254.

- 49.- Yolken, R.H., Wyatt, R.G., Zissis, G.P., Brandt, C.D., Rodríguez, W.J., Kim, H.W., Parrott, R.H., Urrutia, J.J., Mata, L., Greenberg, H.B., Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M. (1978): Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. N. Engl. J. Med. 299: 1156-1161.
- 50.- Kapikian, A.Z., Lam, S.K., Madeley, C.R., Minnie Maltham, P.K., Middleton, G.N., Woode, et al. (1980): Rotavirus and other diarrhoeas. Boletin of World Health Organization 58(2): 183-198.
- 51.- Brandt, C.D., Kim, H.W., Rodríguez, W.J. and col. (1985): Adenovirus and Pediatric Gastroenteritis. J. Infect. Dis. 151:437-443.
- 52.- Whnnoo, I., Wadell, G., Svensson, L. and Johansson, M.E. (1984): Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in infants and young children. J. Clin Microbiol. 20:365 -- 372.
- 53.- Appleton, H., Higgins, P.G. (1975): Viruses and gastroenteritis in infants (Letter). Lancet. 1:1297,
- 54.- Nazaer, H. (1985): Astrovirus gastroenteritis. J. Trop. Pediatric. 31:67-71.

- 55.- Dolin, R., Treanor, J.J. and Madore, P. (1987): Novel agents of viral enteritis in humans. J. Infect. Dis. 155:365-376.
- 56.- Gerna, G., Passarini N., Battaglia, M., y col. (1985): Human enteric coronaviruses: Antigenic relatedness to human coronaviruses OC 43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. J. Infect. Dis. 151:796-803.
- 57.- Moscovia, D., Chany, C., Lebon, P., and col. (1980): Association d'infection á coronavirus avec l'entérocolite hémorragique d'un veau-ne, CR. Seance Acad. Sci. D. 290:869-872.
- 58.- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. y col. (1974): Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis. Lancet; 1:149-157.
- 59.- Rodger, S.M., Bishop, R.F. and Holmes, I.H. (1982): Detection a rotavirus-like associated with diarrhea in an infant. J. Clin. Microbiol. 16:724-726.
- 60.- Middleton, P.K. (1980): Epidemiology and Etiology Viral. Departament of Virology, Hospital for Sick Children: Toronto, Ontario, Canada. (Rapporteur). Bolletin of the -- World Health Organization. 58(2):183-198.

- 61.- Kaplan, J.E., Gary, G.W., Baron, R.C., and col. (1982): Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis. Ann. Intern. Med. 96:756-761.
- 62.- Lieb, S., Gunn, R.A., Medina, A. y col. (1985): Norwalk virus gastroenteritis. Am. J. Epidemiol. 121:259-268.
- 63.- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., and Ruck, B.J. (1974): Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis. Lancet. 1:149-151.
- 64.- Kapikian, A.Z., Kim, H.W., Wyatt, R.C., Rodríguez W.J., Cline, W.L., Parrott, R.H., and Chanock, R.M. (1974): Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. Science. 185:1049-1053.
- 65.- Bryden, A.S., Davies, H.A., Thouless, M.E., en Flewett, T.H. (1977): Diagnosis of rotavirus infection by cell culture. J. med. Microbiol. 10:121-125.
- 66.- Cukor, G., Berry, M.K., and Blacklow, N.R., (1978): Simplified radioimmunoassay for detection of human rotavirus in stools. J. Infect. Dis. 138: 906-910.

- 67.- Kalica, A.R., Purcell, R.H., Sereno, M.M., Wyatt, R.G., Kim, H.W., Chanock, R.M., and Kapikian, A.Z. (1977): A microtiter solid phase radioimmunoassay for detection of the human reovirus-like in stools. J. Immunol. 118: 1275-1279.
- 68.- Sandy, J., Mc. Guire, M.S., Anthony, E. Castro, DVM, Ph. D.(1982): Evaluación de un Inmunoensayo Comercial para la Diagnósis. Rápida de Rotavirus en Especímenes Fecales para Especies Domésticas. Amer. Assn. Veterinaria Proceedings. 375-388.
- 69.- Yolken, R.H., Kim, H.W., Clem, T., Wyatt, R.G., Kalica, A.R., Chanock, R.M., and Kapikian, A.Z. (1977): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Lancet. 2:263-267.
- 70.- Malherbe, H.H., and M. Strickland-Cholmley. (1967): Simian virus SA-11 and the related O agent. Arch. Gesamte Virusforsch. 22:235-245.
- 71.- DuPont, H.L. (1987): Rotaviral gastroenteritis some recent developments. J. Infect. Dis. 149:663-665.
- 72.- Albrey, M.B., and Murphy, A.M.(1976): Rotavirus growth in bovine monolayers. Lancet. 1:753.

- 73.- Almeida, J.D., Hall, T., Banatuala, J.E., Totterdell, B.M., and Chrystie, I.L. (1978): The effect of trypsin on the growth of rotavirus. J. Gen Virol. 40:213-218.
- 74.- Babiuk, L.A., Mohammed, K., Spence, L., Fauvel, M., and Petro, R. (1977): Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. J. Clin Microbiol. 6:610-617.
- 75.- Dyall-Smith, D.L., Elleman, T.C., Hoyne, P.A., Holmes, I.H. and Azad, A.A. (1983): Cloning and sequence of UK bovine rotavirus gene segment 7: marked sequence homology with simian rotavirus gene segment 8. Nucleic Acids Res. 11:3351-3362.
- 76.- Estes, M.K., Graham, D.Y., Gerba, C.P., and Smith, E.M. (1979): Simian rotavirus SA-11 replication in cell cultures. J. Virol. 39:810-815.
- 77.- Kapikian, A.Z., and Yolken, R.H. (1985): Rotavirus. in: Principles and Practice of Infectious Diseases, 2nd ed., edited by G.L. Mandell, R.G. Douglas, Jr., and J.E. - - Bennet. Wiley, New York. 933-944.
- 78.- Malherbe, H.H., and Strickland-Cholmley, M. (1969): Simian virus SA-11 and the related "O" agent. Arch. Ges. 24:300-344.

- 79.- Matsuno, S., Inouye, S., and Kono, R. (1977): Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. J. Clin. Microbiol. 5:1-14.
- 80.- Mc Nulty, M.S., Allan, G.M., Curran, W.L., and Mc Ferran, J.B. (1976): Comparison of methods for diagnosis of rota virus infection of calves. Vet. Rec. 98:463-464.
- 81.- Mc Nulty, M.S., Allan, G.M., Todd, D., and Mc Ferran J. B. (1979): Isolation and cell culture propagation of rotavirus from turkeys and chickens. Arch Virol., 61:13-21.
- 82.- Mc Nulty M.S., Curran, W.L., Allan, G.M., and Mc Ferran, J.B. (1978): Syntesis of coreless, probably defective virus particles in cell cultures infected with rotavirus. Arch. Virol. 58:193-202.
- 83.- Mebus, C.A., Kono, M., Underdahl, N.R., and Twiehaus, M.J. (1971): Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. Can. Vet. J. 12:69-72.
- 84.- Moosai, R.B., Gardner, P.S. Almeida. J.D., and Greenaway M.A. (1979): A simple immunofluorescent technique for the detection of human rotavirus. J. Med. Virol. 3:189-194.

- 85.- Sato, K., Inaba, Y., Shinozaki, T., Fojii, R., and Matu-  
moto, M. (1981): Isolation of human rotavirus in cell --  
cultures. Arch. Virol. 69:155-160.
- 86.- Schoub, B.D., Kalika, A.R., Greenberg, H.B., Bertran, D.  
M., Sereno, M.M., Wyatt, R.G., Chanock, R.M., and Kapi-  
kian, A.Z. (1979): Enhancement of antigen incorporation  
and infectivity of cell culture by human rotavirus. J.  
Clin. Microbiol. 9:488-492.
- 87.- Theil, K.W., Bohl, E.H. and Agnes, A.G. (1977): Cell cul-  
ture propagation of porcine rotavirus (reovirus-like a -  
gent). Am. J. Vet. Res. 38:1765-1768.
- 88.- Theil, K.W., Bihl, E.H. and Sail, L.J. (1978): Techni---  
ques for rotaviral propagation. J. Am. Vet. Med. Assoc.  
173: 548-551.
- 89.- Totterdell, B.M., Chrystie, I.L., and Banatvala, J.E.  
(1976): Rotavirus infections in a maternity unit. Arch.  
Dis. Child. 51:924-928.
- 90 Tzipori, S., Caple, I.W., and Butler, R. (1976): Isola-  
tion of a rotavirus from deer. Vet. Rec. 99:398.
- 91.- Urasawa, T., Urasawa, S., and Taniguchi, K. (1981):  
Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells.  
Microbiol. Immunol. 25:1025-1035.

- 92.- Wyatt, R.G., Gill, V.W., Sereno, M.M., Kalica, A.R., Van Kirk, D.H., Chanock, R.M., and Kapikian, A.Z. (1976): Probable in vitro cultivation of human reovirus-like agent of infantile diarrhea. Lancet. 1:98.
- 93.- Wyatt, R.G., and James, W.D. (1982): Methods of gastroenteritis virus culture in vivo and in vitro. In: Virus Infections of the Gastrointestinal Tract, edited by D.A.J. Tyrrell and A.Z. Kapikian, Marcell Dekker. New York, - - 13-35.
- 94.- Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z., Thornhill, T.S., Sereno, M. M., Kim, H.W., and Chanock, R.M. (1974): In vitro cultivation in human fetal intestinal organ culture of a reovirus-like agent associated with nonbacterial gastroenteritis in infants and children. J. Infect. Dis. 130:523-528.
- 95.- Wyatt, R.G., James, W.D., Bohl, E.H., Theil, K.W., Saif, L.W., Kalica, A.R., Greenberg, H.B., Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M. (1980): Human rotavirus type 2: cultivation in vitro. Science. 207:189-191.
- 96.- Greenberg, H.B., Kalica, A.R., Wyatt, R.G., Jones, R.W., Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M. (1981): Rescue of noncultivable human rotaviruses by gene reassortment during mixed infection with ts mutants of a cultivable bovine rotavirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:420-424.

- 97.- Greenberg, H.B., Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z., Kalica, --  
A.R., Flores, J., and Jones, R. (1982): Rescue and sero-  
typic characterization of noncultivable human rotavirus  
by genereassortment. Infect. Immun. 37:104-109.
- 98.- Hasegawa, A., Matsuno, S., Inouye, S., Kono, R., Tsuru  
Kubo, Y., Mukoyama, A., and Saito, Y. (1982): Isolation  
of human rotaviruses in primary cultures of monkey Kid-  
ney cells. J. Clin. Microbiol. 16:387-390.
- 99.- Naguib, T., Wyatt, R.G., Mohieldin, M.S., Zaki, A.M., -  
Imam, I.Z., and DuPont, H.L. (1984): Cultivation and --  
subgroup determination of human rotaviruses from Egyp--  
tian infants and young children. J. Clin. Microbiol. -  
19:210-212.
- 100.- Ward, R.L., Knowlton, D.R., and Pierce, M.J. (1984):  
Effiviency of human rotavirus propagation in cell cul-  
ture. J. Clin. Microbiol. 19:748-753.
- 101.- Editorial (Agarwal, A.) (1979): A cure for a killer-but  
how to deliver it. Nature. 278:398-391.
- 102.- Sack, D.A. (1982): Treatment of acute diarrhoea with  
oral rehydration solution. Drugs. 23:150-157.

- 103.- Sack, D.A., Chowdhury, A.M.A.K., Eusof, A., Ali, M.A., Merson, M.H., Islam, S., Black, R.E., and Brown, K.H. (1978): Oral hydration in rotavirus diarrhoea: a double blind comparison of sucrose with glucose electrolyte solution. Lancet. 2:280-283.
- 104.- Nalin, D.R., Levine, M.M., Mata, L., de Cespedes, C., Gargas, W., Lizano, C., Loria, A.R., Simhon, A., and Mohs, E. (1978): Comparison of sucrose with glucose in oral therapy of infant diarrhea. Lancet. 2:277-279.
- 105.- Santosham, M. Daum, R.S., Dillman, L., Rodríguez, J.L., Luque, S., Russell, R., Kourany, M., Ryder, R.W., Bartlett, A.V., Rosenberg, A., Benenson, A.S., and Sack, R.B. (1982): Oral rehydration therapy of infantile diarrhea: a controlled study of well-nourished children hospitalized in the United States and Panama. N. Engl. J. Med. 306:1070-1076.
- 106.- Saulsbury, F.T., Winkelstein, J.A., and Yolken, R.H. (1980): Chronic rotavirus infection in immunodeficiency J. Pediatr. 97:61-65.
- 107.- Ebina, T., Sato, A., Umezu, K., Ishida, N., Ohyma, S., Ohizumi, A., Aikawa, K., Katagiri, S., Katsushima, N., Imai, A., Kitaoka, S., Suzuki, H., and Konno, T. (1983): Prevention of rotavirus infection by cow colostrum containing antibody against human rotavirus. Lancet. 2:1029-1030.

- 108.- Cukor, G., and Blacklow, N.R. (1984): Human viral gastroenteritis. *Micribiol. Rev.* 48:157-179.
- 109.- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Greenberg, H.B., Kalica, A.R., Kim, H.W., Brandt, C.D., Rodríguez, w.J., Parrott, R.H., and Chanock, R.M. (1980): Approaches to immunization of infants and young children against gastroenteritis due to rotaviruses. *Rev. Infect. Dis.* 2:459-469.
- 110.- Chanock, R.M. (1981): Strategy for developmnet of respiratory and gastrointestinal viral vaccines in the 1980's Joseph E. Smodel memorial lecture. *J. Infect. DIS.* 143: - 364-374.
- 111.- Chanock, R.M., Wyatt, R.G. and Kapikian, A.Z. (1978): Immunization of infants and young children against rotavirus gastroenteritis-prospects and problems. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173:570-572.
- 112.- Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z., and Greenberg, H.B. (1981): Prospects for development of a vaccine against rotavirus diarrhea. In: Acute Enteric Infections in Children: New Prospects for Treatment and Prevention, edited by T. Holme, J. Holgren, M.H. Merson, and R. Molby. Elsevier/ North-Holland, New York. 505-522.

- 113.- Bishop, R.F., Barnes, G.L., Cipriani, E., and Lund, J.S. (1983): Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. N. Engl. J. Med., 309:72:76.
- 114.- Offit, P.A., Clark, H.F., and Plotkin, S.A. (1983): Response of mice to rotaviruses of bovine or primate origin assessed by radioimmunoassay, radioimmunoprecipitation, and plaque reduction neutralization. Infect. Immun. 42:2 93-300.
- 115.- Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z., and Mebus, C.A. (1983): Induction of cross-reactive serum neutralizing antibody to human rotavirus in calves after in utero administration of bovine rotavirus. J. Clin. Microbiol. 18:505-508.
- 116.- Wyatt, R.G., Mebus, C.A., Yolken, R.H., Kalica, A.R., James, H.D., Jr., Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M. - - (1975): Rotaviral immunity in gnotobiotic calves: heterologous resistance to human virus induced by bovine virus. Science. 203:548-550.
- 117.- Zissis, G., Lambert, J.P., Marbehant, P., Marissens, D., Lobmann, M., Charlier, P., Delem, A., and Zygraich, N. - (1983): Protection studies in colostrum-deprived piglets of a bovine rotavirus vaccine candidate using human rotavirus strains for challenge. J. Infect. Dis. 148:1061-1068.

- 118.- Bohl, E.H., Theit, K.W., and Saif, L.J. (1984): Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. J. Clin. Microbiol. 19:105-111.
- 119.- Gaul, S.K, Simpson, T.F., Woode, G.N., and Fulton, R.W. (1982): Antigenic relationships among some animal rotaviruses: virus neutralization in vitro and cross-protection in piglets. J. Clin. Microbiol. 16:495-503.
- 120.- Woode, G.M., Bew, M.E., and Dennis, M.J. (1978): Studies on cross protection induced in calves by rotavirus of calves, children and foals. Vet. Rec. 103:32-34.
- 121.- Woode, G.N., Kelso, N.E., Simpson, T.F., Gaul, S.K., -- Evans, L.E., and Babiuk, L. (1983): Antigenic relationships among some bovine rotavirus: serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. J. Clin. Microbiol. 18:358-364.
- 122.- Vesikari, T., Isolauri, E., Delem, A., D'Hondt, E., Andre, F.E., and Zissis, G. (1983): Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain 4237 in adults and young children. Lancet. 2:807-811.

- 123.- Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z., Hoshino, Y., Flores, J., Midthun, K., Greenberg, H.B., Glass, R.I., Askaa, J., Levine, M.M., Black, R.E., Clements, M.L., Potash, L., and London, W.T. (1984): Development of rotavirus vaccines. In: Conference Proceedings: Control and Eradication of Infectious Diseases in Latin America (in press).
- 124.- Vesikari, T., Isolauri, E., D'Hondt, E., Delem, A., Andre, F.E., and Zissis, G. (1984): Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. Lancet. 1:977-981.
- 125.- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Levine, M.M., Black, R.E., Greenberg, H.B., Flores, J., Kalica, A.R., Hoshino, Y., and Chanock. (1983): Studies involunteers with human rotaviruses. Dev. Biol. Standar, 53:209-218.
- 126.- Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z., Greenberg, H.B., Kalika, A.R., Flores, J., Hoshino, Y., Chanock R.M. and Levine, M.M. (1983): Development of vaccines against rotavirus disease. Prog. Food Nutr. Sci. 7:189-192.
- 127.- Greenberg, H.B., Midthun, K., Wyatt, R., Flores, J., Hoshino, Y., Chanock, R.M., and Kapikian, A. (1984): Use of reassortant rotaviruses and monoclonal antibodies to make genecoding assignments and construct ro-

- tavirus vaccine candidates. In: Modern Approaches to Vaccines: Molecular and Chemical Basis of Virus Virulence and Immunogenicity, edited by R.M. Chanock and R.A. Lerner. Cold Spring Harbor Laboratory, Col. Spring Harbor, N.Y. 319-327.
128. Midthun, K., Greenberg, H.B., Hoshino, Y., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M., and Wyatt, R.G. (1985): Reassortant rotaviruses as potential live rotavirus vaccine candidates. J. Virol. (in press).
129. Kapikian, A.Z., et al. (1985): Rhesus rotavirus: A candidate vaccine for prevention of human rotavirus disease. In: Modern Approaches to Vaccines: Molecular and Chemical Basis of Resistance to Viral, Bacterial, and Parasitic Diseases, edited by R. Lerner, F. Brown, and R. Chanock, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. (in press).
130. Wallace, R.E., Vasington, P.J., Petriccioni, J.C., Hopps H. E., Lorenz, D.E., and Kadanka, Z. (1973): Development of a diploid cell line from fetal rhesus monkey lung for virus vaccine production. In Vitro. 8:323-332.
131. Flores J., Sereno M., Lai, C.J., Boeggeman, E., Pérez, I., Purcel, R., Kalica, A., Greenberg, H., Wwatt, R., Hansen, J., Kapikian, A., and Chanock, R. (1983): Use of single-stranded rotavirus RNA transcripts for the

- diagnosis of rotavirus infection, the study of genetic diversity among rotaviruses, and the molecular cloning of rotavirus genes. In: Double-Stranded RNA Viruses, -- edited by R.W. Compans and D.H.L. Bishop. Elsevier, Amsterdam. 115-127.
- 132.- Flores J., Sereno, M., Kalica, A., Keith, J., Kapikian, A., and Chanock, R. (1983): Molecular cloning of rotavirus genes: implications for immunoprophylaxis. In: Modern Approaches to Vaccines: Molecular and Chemical Basis of Virus Virulence and Immunogenicity, edited by -- R.W. Chanock and R.A. Lerner. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 159-164.
- 133.- Arias, C.F., López, S., Bell, J.R., and Strauss, J.H. (1984): Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA-11 as deduced from cDNA sequence. J. Virol. 50:657-661.
- 134.- Both, G.W., Mattick, J.S., and Bellamy, A.R. (1983): Serotype-specific glycoprotein of simian 11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:3091-3095.
- 135.- Elemean, T.C., Hoyne, P.A., Dyall-Smith, M.L., Holmes, I.H., and Azad, A.A. (1983): Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein of UK bovine rotavirus. Nucleic Acids. Res. 11:4689-4701.

- 136.- Emini, E.A., Jameson, B.A., and Wimmer, E. (1984): Identification of multiple neutralization antigenic sites - in poliovirus. In: Modern Approaches to Vaccines, Molecular and Chemical Basis of Virus Virulence and Immunogenicity, edited by R.M. Chanock and R.A. Lerner, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 65-75.
- 137.- Arnon, R. (1980): Chemical defined antiviral vaccines. Annu. Rev. Microbiol. 34:593-618.
- 138.- Lerner, R.A., Green, N., Olson, A., Shinnick, T., and Sutcliffe, J.G. (1981): The development of synthetic - - vaccines. Hosp. Pract. 16(2):55-62.
- 139.- Shimick, T.M., Sutcliffe, J.G., Green, N., and Lerner, R.A. (1983): Synthetic peptide immunogens as vaccines. Annu. Rev. Microbiol. 37:425-446.
- 140.- Svennerholm, A.M., Hanson, L.A., Holmgren, J., Jall, J., Lindblad, B.S., Khan, S.R., Nilsson, A., and Svennerholm, B. (1981): Antibody responses to live and killed poliovirus vaccines in the milk of Pakistani and Swedish women. J. Infect. Dis. 143:707-711.
- 141.- Svennerholm, A.M., Holmgren, J., Hanson, L.A., Lindblad, B.S., Quereshi, F., and Rahimtoola, R.J. (1977): Boosting of secretory IgA antibody responses in man by parenteral cholera vaccination. Scand. J. Immunol. 6:1345-1349.

- 142.- Bartz, C.R., Conklin, R.H., Tunstall, C.B., and Steele, J.H. (1980): Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. J. Infect. Dis. - 142:439-441.
- 143.- Bridger, J.C., and Woode, G.N. (1975): Neonatal calf -- diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. Br. Vet. J. 131:528-535.
- 144.- Kapikian, A.Z. (1982): An update on viral gastroenteritis. In: Virus Infections of the Gastrointestinal Tract, edited by D.A.J. Tyrrel and A.Z. Kapikian, Marcel Dekker. New York. 399-409.
- 145.- Kapikian, A.Z., Greenberg, H.B., Cline, W.L., Kalica, A.R., Wyatt, R.G., James, H.D., Jr., Lloyd, N.L., Chanoock, R.M., Ryder, R.W., and Kim, H.W. (1978): Prevalence of antibody to the Norwalk agent by a newly developed immune adherence hemagglutination assay. J. Med. Virol. 2:218-294.
- 146.- Mebus, C.A., White, R.G., Bass, E.P., and Twiehaus, M.J. (1973): Immunity to neonatal calf diarrhea virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 163:880-883.

- 147.- Sheridan, J.F., Smith, C.C., Manak, M.M., and Aurelian, L. (1984): Prevention of rotavirus-induced diarrhea in neonatal mice born to dams immunized with empty capsids of simian rotavirus SA-11. J. Infect. Dis. 149:434-438.
- 148.- Snodgrass, D.R., and Wells, P.W. (1976): Rotavirus infection in lambs: studies on passive protection Arch. Virol. 52:201-205.
- 149.- Snodgrass, D.R., and Wells, R.W. (1978): Passive immunity in rotaviral infections. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173:565-568.
- 150.- Woode, G.N., Jones, J., and Bridger, J. (1975): Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhea virus. Vet. Rec. 97:148-149.
- 151.- Barnes, G.L., Doyle, L.W., Hewson, P.H., Knoches, A.M. L., Mc Clellan, J. A., Kitchen, W.H., and Bishop., R.F. (1982): A randomised trial of oral gamma globulin in low-birth weight infants infected with rotavirus. Lancet. 1:1371-1373.
- 152.- Leece, J.G., King, M.W., and Mock, R. (1976): Reovirus like agent associated with fatal diarrhea in neonatal pigs. Infect. Immun. 14:816-825.

- 153.- Shodgrass, D.R., Fahey, K.J., Wells, P.W., Campbell, I., and Whitelaw, A. (1980): Passive immunity in calf rotavirus infections: maternal vaccination prolongs immunoglobulin G, antibody secretion in milk. Infect. Immun. 28:344-349.
- 154.- Fahey, K.J., Shodgrass, D.R., Campbell, I., Dawson, A. McL. and Burells, C. (1981): IgG antibody in milk protects lambs against rotavirus diarrhea. Vet. Immunol. - Immunopathol. 2:27-33.
- 155.- Totterdell, B.M., Chrystie, I.L. ad Banatuala, J.E. -- (1980): Cord blood and breast milk antibodies in neonatal rotavirus infection. Br. Med. J. 285:820-830.
- 156.- Imai, M., Richardson, M.A., Ikegami, N., Shatkin, A.J. and Furuchi, Y. (1983): Molecular cloning of double -- standard RNA virus genomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80:373-377.
- 157.- Gorziglia, M., Cashdollar, L.W., Hudson, G.R. and Esparza, J. (1983): Molecular cloning of human rotavirus genome. J. Gen. Virol. 64:2585-2595.
- 158.- Pedley, S., Bridger, J.C., Brown, J.F., and Mc Crae, - M.A. (1983): Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. J. Gen. Virol. 64:2093- - 2101.

- 159.- World Health Organization. (1984): A manual for the treatment of acute diarrhea. For use by physicians and other senior health workers. Documento WHO/SER/80.2, rev. 1. Geneve.
- 160.- World Health Organization. (1987): Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. Documento WHO/CDD/83.3, rev. 1. Geneve.
- 161.- Lennette, E.; Balouis, A.; Hausler, W. and Shadomy, H. (1985): Manual of clinical microbiology. 4a., ed., American Society for Microbiology, Washington D.C.
- 162.- Yolken, R.; Kim, H.; Clean, T. y col. (1977): Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) for detection of human Reovirus like agent of infantile gastroenteritis. Lancet; 2:263-266.
- 163.- ABBOTT laboratories, Diagnostics Division. Rotazyme II. (1985): Enzyme Immunoassay for the Detection of Rotavirus Antigens in Human.
- 164.- Muñoz, O.; Coello-Ramírez, P.; Serafin, F. y col. (1979): Gastroenteritis infecciosa aguda. Etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y el mo co fecal. Arch. Invest. Méd. (Méx.); 10:135-145.
- 165.- Henriksen, S. and Pohlenz, J. (1981): Staining of Cryptosporidina by a modified Ziehl Neehlsen thecnique. Acta Vet. Scand; 22: 594-596.

- 166.- PAI, CH.; Ahmed, N.; Lior, H.; Johson, W.; Sims, V. y Woods, D. (1988): Epidemiology of Sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two-year prospective study. J. Infect. Dis; 157:1054-1057.
- 167.- Hill, W., Payne, W.; Zon, G. y Moseley, S. (1985): Synthetic oligodeoxy ribonucleotide probes for detecting - heat-stable enterotoxin producing *Escherichia coli* by - DNA colony hibridization. Appl. Environ Microbiol; 50: 1187-1191.
- 168.- Cravioto, A.; Gross, R.; Scotland, S. y Rome, B. (1979): Adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic - serotypes. Current Microbiology: 3:95-99.
- 169.- Gutiérrez G.; Guiscafre, H.; Bronfman, M. y col. (1988): Estrategias para mejorar los patrones terapéuticos en -- diarrea aguda en unidades de atención médica primaria. I Metabólica y características de las unidades médicas y de la población estudiada. Arch. Invest. Méd. (Méx.); -- 19:335-350.
- 170.- Calva, J.; Ruíz-Palacios, G.; López-Vidal,; Ramos, A. y Bojalil, R. (1988): Cohort Study of intestinal infection with *Campylobacter* in Mexican children. Lancet. 5:503- - 506.

171. Edelman, R.; Karmali, M. y Fleming, P. (1988): Summary - of international Symposium and Work-shop on infections due to verocytotoxin (shiga-like toxin) producing Escherichia coli. J. Infect. Dis. 157:1102-1104.
172. Alvarado-Alemán, F.; Guardo-Bustillo, C.; Galindo, E. y col. (1985): Frecuencia de microorganismos enteropatógenos aislados en niños con y sin diarrea aguda. Bol. Med. Hosp. Infant. (Méx.). 42:354-359.
173. Stoll B.; Glass, R.; Huq, M.; Khan, M. Holt, J. Banu, H. (1982): Surveillance of patients attending a diarrhoeal disease hospital in Bangladesh. British Medical Journal. 285:1185-1188.
174. Lennette EH.; Schmidh NJ. and col. (1969): Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. 4a. ed. Amer Pub Health Ass, Nueva York.
175. Rubenstein AS, Miller MF. (1982): Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for detecting rotavirus. J. Clin Microbiol; 15:938-944.
176. Miotti, PG.; Eiden J. and Yolken RH. (1985): Comparative efficiency of commercial immunoassays for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis during the course of infection. J. Clin Microbiol; 22:693-698.

- 177.- El-Mekki A.; Al-Nakib-Al W.; Sethi SK, et al. (1984): - Pseudoreplicative electron microscopy for the detection of rotavirus: Comparison with high-speed centrifugation -- electron microscopy and ELISA. J Virol Methods; 9:79-85.
- 178.- Vesikari T.; Sarkkinen HK., and Maki M. (1981): Quantitative aspects of rotavirus excretion in childhood diarrhoea. Acta Paediatr. Scand.; 70:717-721.
- 179.- Hung T.; Guangmu C.; Changan W.; Henli Y.; Zhaoying F.; Tungxin C.; Zingli C.; Weiwei Y.; Yuejian C.; Shuasen D.; Xiaoquang L; Weicheng C. (1984): Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. Lancet; 1:1139-42.
- 180.- Eiden J.; Vonderfecht S.; Yolken RH. (1985): Evidence that a novel rotavirus-like agent of rats can cause gastroenteritis in man. Lancet; 2:8-11.
- 181.- Larson R.G.; Lindman H.K.; Fredrikzon Bo. and col. - -- (1989): Prolonged Efficacy of Rhesus Rotavirus Vaccine in Swedish Children. J. Infect Dis. 159:753-757.
- 182.- Hjelt K.; Paerregaard A.; Nielsen OH.; Grauballe PC.; Gaarslev K.; Holten Andersen W.; Tved M.; Orskov F.; - Krasilnikoff PA. (1987): Acute gastroenteritis in children attending day-care centres with special reference to rotavirus infections. I. Aetiology and epidemiologic aspects. Acta Paediatr. Scand; 76:754-62.

- 183.- Black RE.; Dykes AC.; Anderson KE. et al. (1981): Han--  
dwashing to prevent diarrhea in day-care centers. Am J.  
Epidemiol; 113:445-51.
- 184.- Chiba S.; Yokoyama T.; Nakata S. et al. (1986): Protev-  
tive effect of naturally acquired homotypic and hetero-  
typic rotavirus antibodies. Lancet; 2:417-21.
- 185.- De Mol P.; Zissis G.; Butzler J-P.; Mutwewingabo A.; --  
André FE. (1986): Failure of live, attenuated oral rota-  
virus vaccine. Lancet; 2:108.
- 186.- Heath R.; Birch C. and Gust I. (1986): Antigenic Analy--  
sis of Rotavirus Isolates using Monoclonal Antibodies -  
Specific for Human Serotypes 1,2,3 and 4, and SALL. J.  
gen. Virol; 67:2455-2466.
- 187.- Karsten Hjelt et al. (1988): Acute rotavirus gastroente-  
ritis in Children. Vol. 35. 3:222-235.
- 188.- Ogra PL.; Leibovitz EE. and Zhao-Ri G. (1989): Oral - -  
Immunization and Secretary to Viruses. Current Topics -  
in Microbiology and Immunology. Vol. 146:73-81.
- 189.- Edelman R.; Flores J. and Kapikian A.Z. (1989): Immuni-  
ty to Rotaviruses. Current Topics in Microbiology and -  
Immunology. 146:123-136.

- 190.- Vesikari T.; Isolauri E.; D'Hondt E.; Delem A.; Andréé - FE. and Zisis G. (1984): Protection of infants against rotavirus diarrhea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. Lancet; 1:977-981.
- 191.- Clark, H.F., Borian, F.E., Bell, L.M., Modestok, K., -- Gouves, V. and Plotkin, S.A. Protective effect of WC3 -- vaccine against rotavirus diarrhea in infants. during a predominantly serotype 1 rotavirus season. J. Infect Dis.: 158:570-587.
- 192.- Flores, J., Pérez-Schaell, I., González, M., García, D., Pérez, M., Daoud, N., Cunto, W., Chanock, R.M. and Kapikian, A.Z. (1987): Protection against severe rotavirus diarrhoea by rhesus vaccine in Venezuelan infants. Lancet. 1:882-884.
- 193.- Kapikian, A.Z., Flores, J., Midthum, K. et al. (1988): Development of a rotavirus vaccine by a "Jennerian" -- approach. Cold Spring Harbor. Symposium on New Vaccines. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratories; 151-159.
- 194.- Kapikian, A.Z., Flores, J., Hoshino, Y., Glass, R.I., -- Midthun, K., Gorzglia, H. and Chanock, R.M. (1986): The major etiologic agent of severe infantile diarrhea may be controllable by a "Jennerian" approach to vaccination. J. Infect. Dis. 153:815-822.