

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN

ROTAVIRUS: PROTECCIÓN HOMOTÍPICA O HETEROTÍPICA DESPUÉS DE
UNA INFECCIÓN NATURAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA:

DR. FERNANDO VIDEGARAY ORTEGA

ASESOR: DR. GUILLERMO MIGUEL RUIZ-PALACIOS Y SANTOS

México D. F. 25 de marzo de 2014

Rotavirus: Protección homotípica o heterotípica después de una infección natural.

Introducción

Epidemiología

En el mundo entero las enfermedades diarreicas son una causa importante de morbilidad y mortalidad. Se calcula que cada año en Asia, África y América Latina hay tres a cinco billones de casos de gastroenteritis y que éstos son responsables de cinco a 10 millones de muertes (1).

En un estudio reciente, se calculó que las enfermedades diarreicas producen 10.8 millones de muertes al año en el mundo, 13 a 21 % de todas las muertes en niños menores de cinco años. Los grupos con mayor mortalidad son aquellos que tienen un nivel socioeconómico menor (2). Los rotavirus han sido identificados como los agentes etiológicos más importantes de enfermedad diarreica en niños tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados (18). Son los responsables de 440,000 muertes, dos millones de hospitalizaciones, 25 millones de consultas y 111 millones de episodios domiciliarios al año en el mundo (2).

En México, en el año 2000, las infecciones gastrointestinales fueron la cuarta causa de mortalidad infantil. Durante ese año fueron responsables de 1,812

muertes infantiles, lo que representó el 4.7 % del total. Es importante mencionar que el número de muertes por infecciones gastrointestinales en México ha disminuido en los últimos años, a pesar de esto sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad (Tabla 1) (3). Estudios previos han mostrado que esta reducción se debe a mejoras en la higiene y sanidad ambiental, al uso de rehidratación oral, a la inmunización para sarampión y a un mejor nivel de instrucción en las mujeres (4, 5). Sin embargo, estas prácticas han tenido un impacto mínimo en la disminución de las infecciones gastrointestinales producidas por rotavirus, a diferencia de las producidas por otros agentes. La reducción en la mortalidad se debe en gran parte a las prácticas de rehidratación oral. Estas prácticas son efectivas para prevenir las muertes por deshidratación, sin embargo la rehidratación oral no es un mecanismo para la prevención primaria de la enfermedad asociada a rotavirus (6).

En México entre 1970 y 1990 ocurrían mas muertes atribuibles a enfermedades diarreicas durante el verano, desde 1990 estas muertes han tenido una distribución mas uniforme durante el año. Algunos estudios han encontrado mayor proporción de muertes durante el invierno, lo cual se ha atribuido al aumento en la prevalencia de infección por rotavirus (7). En un estudio epidemiológico realizado en México y publicado en 1999, se encontró que hay una mayor proporción de muertes asociadas a enfermedades diarreicas en invierno (8). Lo anterior sugiere que rotavirus se está convirtiendo en el agente etiológico más importante de las enfermedades diarreicas en nuestro país, como ya lo es de otros países. A pesar de que la mortalidad asociada a diarrea ha disminuido, es fundamental implementar medidas que específicamente prevengan la infección o que

disminuyan la severidad de la diarrea cuando ocurre una infección por rotavirus. Como se mencionó anteriormente, muchas de las medidas que disminuyen la incidencia de otros agentes que producen enfermedades diarreicas, no son tan efectivas con rotavirus. Desde hace varios años los esfuerzos han estado orientados al desarrollo de una vacuna efectiva.

Rotavirus

Diferentes virus, incluyendo a los calicivirus, adenovirus, el virus Norwalk, los astrovirus y otros virus redondos pequeños no clasificados, se asocian a enfermedades diarreicas. Desde los años 40, se ha sospechado que los virus son agentes etiológicos importantes de enfermedades diarreicas, sin embargo en la mayoría de los casos no se podían identificar (9, 10). No fue hasta 1972 cuando Kapikian et al. identificaron en heces, un virus (virus Norwalk) como causa de un brote de diarrea (11). Un año después, Bishop et al. detectaron la presencia de un virus, llamado después rotavirus, en la mucosa duodenal de niños con enfermedad diarreica (12). En 1975 fueron identificados los astrovirus y los adenovirus entéricos en heces de niños con diarrea aguda (13, 14). Desde entonces, el número de virus que se ha asociado a enfermedades diarreicas ha aumentado. Así, los coronavirus, los picobirnavirus, los pestivirus y los torovirus (que producen diarrea en animales) están emergiendo como causa de gastroenteritis viral en seres humanos (15).

Desde la identificación de los rotavirus como patógenos humanos en 1973, éstos se han convertido en la causa más importante de gastroenteritis infecciosa en niños, tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados (16, 17, 7).

Los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae. Por microscopía electrónica, los virus miden cerca de 70 NM. Se les llamó rotavirus por que parecen ruedas (el “rota” se deriva de la palabra latina para nombrar la rueda) con rayos cortos que se irradian de un cubo central ancho. El genoma viral consiste en 11 segmentos separados, de RNA de doble cadena. Los rotavirus no tienen envoltura, tienen una doble cápside externa y un núcleo “core” que contiene el genoma. La cápside externa está formada por dos proteínas, la proteína VP4 y VP7. VP4 es una proteína de 88-kD, es una hemaglutina, tiene unas proyecciones externas en forma de picos y representa aproximadamente el 2.5 % de la masa total del virus. VP7 es una glucoproteína de 37-kD y representa aproximadamente el 30 % de la masa total del virus. Cuatro proteínas (vp1, vp2, vp3 y vp6) forman el núcleo del virus, vp6 representa el 50 % de la masa viral total y el 80% de la masa viral del núcleo. Cinco proteínas no estructurales (NSP1 a NSP5) están codificadas en el genoma viral y se producen durante la infección por rotavirus (18).

Hay tres grupos de rotavirus que causan infección en el humano (A, B y C). Estos grupos se pueden distinguir en base a diferencias antigénicas en el núcleo del virus y a diferencias que presentan en la migración de segmentos de RNA. A pesar de que los rotavirus pertenecientes al grupo B y C producen enfermedad en niños y en adultos, la mayoría son producidas por rotavirus del grupo A (19, 20, 21). A su vez, los rotavirus del grupo A se clasifican, en especificidad, de acuerdo

a un subgrupo, el cual está mediado por VP6. La mayoría de las cepas pertenecen al subgrupo I ó II, aunque algunos aislados tienen especificidad para ambos grupos y otros no pertenecen a estos subgrupos (22). Las proteínas de la cápside externa son las responsables de la serotipificación del virus, la proteína VP4 corresponde al serotipo P, y la proteína VP7 al serotipo G. Estas proteínas se encuentran codificadas en diferentes segmentos de RNA , VP4 en el segmento 4 y VP7 en el segmento 7, 8 ó 9 dependiendo de la cepa (23). Por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden amplificar estos segmentos de RNA y obtener los genotipos correspondientes (24). Los genotipos más comunes en el mundo son G1P[8], G2P[4], G3P[8] y G4P[8].

La infección por rotavirus induce anticuerpos tanto séricos como intestinales, esto confiere protección contra diarrea severa en niños que se reinfectan (25, 26, 27). Los anticuerpos que se producen están dirigidos contra una gran variedad de antígenos de rotavirus. VP4 y VP7 inducen anticuerpos neutralizantes en el suero y en las heces de pacientes infectados, estos anticuerpos intervienen en la protección contra infecciones subsecuentes por rotavirus (28, 29, 30, 31). A pesar de que la mayoría de las infecciones por rotavirus (95%) son producidas por los serotipos comunes mencionados anteriormente, tanto el serotipo G como el serotipo P tienen una amplia diversidad. Se han descrito 14 serotipos G, diez de los cuales han sido aislados de humanos y 20 serotipos P, de los cuales 11 han sido aislados en humanos (32). Se han reportado en humanos algunas cepas de rotavirus con combinaciones de genotipos poco comunes, algunas de éstas se

asocian con infecciones en animales y otras, como G9, representan serotipos nuevos que se han ido incrementando rápidamente en el mundo (33, 34, 35).

Patogénesis

Rotavirus infecta los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado y la infección parece estar limitada a estas células altamente diferenciadas, en huéspedes inmunocompetentes. Rotavirus generalmente produce una enfermedad diarreica aguda que puede ser severa y poner en peligro la vida. La enfermedad en general se resuelve entre dos a cinco días después de la infección. En humanos la infección por rotavirus se presenta de forma repetida durante toda la vida. La mayoría de las infecciones después de los dos años de edad son asintomáticas o se asocian a síntomas gastrointestinales leves. La resistencia a la infección por rotavirus relacionada a la edad se cree que está mediada por inmunidad adquirida. Esta resistencia podría estar relacionada también a otros factores como la maduración del intestino (32, 36).

El resultado de la infección depende de factores tanto del huésped como del virus y estos factores afectan diferentes etapas de la patogénesis (Tabla 2) (37).

Los rotavirus producen destrucción de los enterocitos y malabsorción. Se pueden encontrar cambios histopatológicos característicos entre 24 y 46 horas después de la infección (38). La malabsorción no es el único mecanismo de patogénesis, ya que no explica la diarrea temprana que se observa antes de los cambios histopatológicos. Además se ha observado que algunos animales presentan

diarrea sin tener cambios histopatológicos, mientras que otros tienen cambios histopatológicos sin presentar diarrea (39, 40, 41). De acuerdo a lo anterior, no se ha encontrado una asociación clara entre los cambios histopatológicos y la enfermedad. Por otro lado se han descrito algunos factores virales que intervienen en la patogénesis. Entre estos factores se encuentran algunas proteínas estructurales y otras no estructurales como NSP4, ésta proteína funciona como una enterotoxina (39, 42, 43). Por otro lado, recientemente se ha descrito que NSP4 induce anticuerpos heterotípicos en niños infectados (44).

Protección

Infección natural:

En 1983, por primera vez se documentó que la infección natural por rotavirus induce protección contra enfermedad (no contra infección), en infecciones subsecuentes (45). En 1991, David Bernstein y colaboradores realizaron un estudio en niños de 2 a 12 meses de edad que fueron seguidos por dos años. Encontraron que la protección natural podía ser adquirida durante todo el primer año y que la protección ocurría independientemente de la severidad de la infección. El porcentaje de niños con reinfección sintomática después de una infección sintomática o asintomática fue similar (0% y 5% respectivamente) (46). En 1996 Velázquez y colaboradores estudiaron 200 niños mexicanos desde el nacimiento hasta los dos años de edad. Al igual que en los estudios previos encontraron que una primera infección, independientemente de la severidad,

confería protección contra una infección subsecuente. Una infección protegía contra enfermedad moderada a severa (87% de eficacia) y en menor grado contra enfermedad leve (73% de eficacia) o reinfección asintomática (38% de eficacia) (27). A pesar de que se ha demostrado claramente que hay protección después de una infección natural, ésta es incompleta y el grado de protección que confieren las infecciones previas es variable. Los niños comúnmente desarrollan infección sintomática por rotavirus del mismo serotipo un año después de la infección primaria. Es poco común que desarrollen infección sintomática por rotavirus del mismo serotipo en la misma temporada (47). Lo anterior indica que la protección completa es efímera. Una de las razones puede ser que la concentración de IgA específica que se encuentra en la superficie intestinal disminuye con el paso del tiempo, generalmente no se detecta en heces un año después de la infección (48). En un estudio publicado en 1993 se correlacionaron los niveles de IgA con severidad de la enfermedad y reinfección. Los niños con niveles más altos de IgA en heces tuvieron un riesgo menor de infección que los que tuvieron niveles más bajos y los que tuvieron niveles aún más bajos, tuvieron más riesgo de presentar enfermedad sintomática (49).

El tipo de protección que se presenta en la infección por rotavirus es similar a la de otros virus que afectan mucosas, como el virus de la influenza. La protección es comúnmente efímera (menos de un año) e incompleta (protege contra enfermedad moderada a severa pero no contra enfermedad leve). Esto contrasta con el tipo de protección completa y duradera que se presenta después de una infección con virus "sistémicos". Los virus que afectan sólo mucosas se replican en la superficie de éstas, los períodos de incubación son cortos y la viremia no es tan importante.

Por otro lado, los virus que afectan mucosas producen síntomas antes de que se establezca una respuesta inmunológica adecuada, por lo que ésta en ocasiones no previene la enfermedad pero si modifica el curso, como se ha observado con rotavirus (50).

Se han diseñado algunos estudios para determinar el papel que tienen los anticuerpos específicos para rotavirus, en comparación con el papel que tienen los linfocitos T citotóxicos específicos, en relación a la protección. En éstos se utilizan ratones sin células B y ratones sin células T. Se ha observado que aquellos que no tienen células B no desarrollaron protección, mientras que los que no tienen células T desarrollan protección total (51, 52, 53). Por lo tanto la protección está mediada por anticuerpos y no por linfocitos T citotóxicos específicos para rotavirus.

Después de una primera infección por rotavirus, los niños desarrollan anticuerpos neutralizantes dirigidos específicamente contra el serotipo G de la cepa de rotavirus que infecta y anticuerpos contra cepas de diferente serotipo (54, 55, 56). Por lo tanto la respuesta con anticuerpos neutralizantes es tanto homotípica como heterotípica. Sin embargo después de la infección los títulos de anticuerpos homotípicos se encuentran más elevados.

El papel que juegan los anticuerpos séricos en la infección natural por rotavirus ha sido ampliamente estudiado. Se ha encontrado que los niveles de anticuerpos IgA e IgG correlacionan con protección en mayor o menor medida (57, 58, 59).

El tipo de protección (ya sea homotípica o heterotípica) que se produce después de una infección natural también ha sido motivo de múltiples estudios. Chiba y colaboradores en 1986 estudiaron la relación de anticuerpos neutralizantes en

múltiples brotes de gastroenteritis por rotavirus. Encontraron que la presencia de títulos ≥ 128 de anticuerpos neutralizantes homotípicos preexistentes, protegía a los niños para infección subsecuente por el mismo serotipo, sin embargo sugieren que puede inducirse inmunidad heterotípica (60). En otros estudios llevados a cabo tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, la presencia de anticuerpos neutralizantes homotípicos se ha asociado con protección (58, 61). Esta protección depende de los niveles de anticuerpos. Por otro lado Ward y colaboradores en 1992 no demostraron este tipo de protección homotípica en un estudio de casos y controles, pero encontraron correlación entre anticuerpos heterotípicos y protección (62).

Vacunas:

Se han desarrollado varias vacunas de rotavirus y por lo menos seis han sido probadas en niños, incluyendo cepas animales (bovina RIT 4237 y WC3 y Rhesus RRV), humanas (M37, RV3, y 89-12), y recombinantes animal-humano (tetavalente rhesus-humano [RRV-TV] y cuadrivalente bovina-humano [WC3-QV]) (63).

Las primeras vacunas fueron desarrolladas a partir de cepas animales, éstas vacunas eran monovalentes. La eficacia de tales vacunas era sumamente variable, ya que había una respuesta predominante homotípica. En un esfuerzo por inducir una respuesta heterotípica, se desarrollaron vacunas con combinaciones de virus animales y combinaciones de virus animales-humanos (64). Las primeras vacunas probadas a principios de los años 80 fueron vacunas bovinas monovalentes (RIT 4237 y WC3). Las primeras pruebas se realizaron en

Finlandia, la vacuna parecía efectiva para prevenir tanto enfermedad leve como enfermedad severa. Después de este éxito inicial, la vacuna se probó en países con menor nivel de desarrollo y la efectividad fue mucho menor. La explicación fue que en estos países los serotipos circulantes eran diferentes y no estaban incluidos en la vacuna (64, 65, 66).

Después fueron probadas las vacunas rhesus monovalente (RRV) y una humana atenuada (M37). Estas vacunas parecían prometedoras, sin embargo su efectividad fue variable entre diferentes países. Nuevamente esta variabilidad se atribuyó a la protección específica (homotípica) de la vacuna.

Para aumentar el espectro antigénico, se desarrollaron vacunas polivalentes que contenían los cuatro serotipos más frecuentes en el mundo (G1, G2, G3 y G4) (67). Se creó una vacuna recombinante rhesus-humano que fue efectiva para prevenir diarrea severa en 80% de las infecciones, protección similar a la obtenida por infecciones naturales. En agosto de 1998 la vacuna rhesus tetravalente (RRV-TV, RotaShield, Wyeth-Lederle Vaccines and Pediatrics, Philadelphia, PA) fue aprobada por la FDA para la administración oral a niños a los 2, 4 y 6 meses de edad. Esta es una vacuna de virus vivo atenuado, derivada de un rotavirus del grupo A. Tres de los serotipos (G1, G2 y G4) son recombinaciones del gen VP7 de un virus de origen humano y el cuarto (G3) es de virus rhesus. No existen datos para determinar si la vacuna es efectiva contra serotipos no contenidos en ella (65, 66). Varios estudios en EEUU, Finlandia y Venezuela encontraron que la vacuna era efectiva (66, 67), sin embargo, otros estudios en Perú y Brasil tuvieron resultados contradictorios con menor eficacia de la vacuna (68, 69, 70). En julio de 1999 el centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) en los EEUU

recomendó la suspensión de la vacuna después de que se presentaron al menos 20 casos de invaginación intestinal en la semana posterior a la aplicación de la vacuna. En octubre de 1999 el fabricante decidió retirarla del mercado (71, 72). Desde entonces otras vacunas se han estado desarrollando ya sea monovalentes (Rotarix®) o polivalentes (ROTATEQ®). En julio de 2004 se aprobó Rotarix® para su comercialización en México (73). Rotarix® es una vacuna monovalente de virus humano que contiene la cepa RIX4414 con especificidad G1P1A P[8]. La vacuna ha sido bien tolerada y tiene una eficacia hasta del 90% para enfermedad grave, incluyendo serotipos diferentes a G1 (74). En Japón se probó una vacuna parenteral y en corea se han utilizado partículas virales como vacunas, las cuales en estudios con ratones han probado inducir inmunidad heterotípica (75, 76).

De todos los estudios que se han realizado con vacunas queda claro lo siguiente: Las tasas de seroconversión se incrementan en los niños que recibieron múltiples dosis y títulos elevados de vacunas. La mayoría de los niños que recibieron RRV-TV y WC3 desarrollaron anticuerpos neutralizantes para los antígenos de los virus originales con que fueron vacunados, mientras que menos niños respondieron a los antígenos G o P de los virus recombinantes. En general se observó protección (en algunos estudios no se encontraron correlaciones de protección), aunque de diferente grado, en la mayoría de los estudios. Esta protección correlacionó bien con la respuesta inmune en general, pero correlacionó pobremente con los anticuerpos neutralizantes específicos G o P de la vacuna (63).

Inmunidad específica:

Los niños infectados o vacunados con rotavirus desarrollan una respuesta homotípica y heterotípica con anticuerpos. La infección primaria induce la

producción principalmente de anticuerpos específicos (serotipo) mientras que la reinfección induce una respuesta inmune más amplia que incluye la producción de anticuerpos heterotípicos (54, 58, 60, 77). Algunos estudios, pero no todos, han encontrado correlaciones de protección contra infección por rotavirus y títulos de anticuerpos neutralizantes homotípicos o heterotípicos. Esta correlación ha sido (en general) mayor con infecciones naturales que con vacunas. La falta de correlación entre protección y aplicación de diferentes vacunas, no permite tener un marcador confiable de protección para evaluar las vacunas (la medición de IgA fecal podría ser un mejor marcador). Por lo anterior es necesario evaluar cada vacuna en estudios de campo muy grandes y costosos (78).

Los blancos específicos para lograr una inmunidad completa aún no están bien definidos. Los esfuerzos para lograr cada vez una mejor inmunidad han estado dirigidos a las proteínas de superficie del virus. Si la inmunidad es independiente del serotipo, es probable que otras proteínas tanto estructurales como no estructurales, tengan un papel más importante del que se les ha dado, en el desarrollo de protección. En algunos estudios se ha encontrado que estas proteínas como VP2, VP6, VP8 y NSP4, intervienen de forma importante en el desarrollo de protección (79, 80, 81, 82, 83, 84).

La importancia de la inmunidad homotípica y heterotípica en la protección no ha quedado del todo clara. Los estudios experimentales con modelos animales, diseñados específicamente para aclarar esto, han mostrado diversos resultados. Después de un desafío inmunológico algunos presentan inmunidad heterotípica y otros han desarrollado mejor inmunidad homotípica (85, 86, 87, 88, 89).

Por todo lo anterior, es importante definir en que medida la inmunidad depende del serotipo.

Hipótesis

El grado de protección que confiere una infección natural por rotavirus no depende del serotipo.

Material y métodos

Diseño del estudio:

Para el estudio se utilizaron dos cohortes de la comunidad de San Pedro Mártir en la Ciudad de México. La primera cohorte incluyó a 200 niños que fueron enrolados desde el nacimiento, de octubre de 1987 a octubre de 1988 y fueron seguidos por un período de dos años. La segunda cohorte fue de marzo 1998 a marzo de 2002, incluyó 300 niños de los cuales 158 tuvieron un seguimiento de dos años, 52 tuvieron un seguimiento mayor de un año pero menor de dos años y 90 niños tuvieron un seguimiento menor a un año. Fueron enrolados alrededor de 15 niños

cada mes. Después de ser enrolado una trabajadora de campo lo visitaba cada semana para tomar muestras, independientemente de si el niño tenía o no síntomas. Además de tomar muestras la trabajadora de campo hacía una entrevista, en ésta preguntaba sobre cambios en el hábito intestinal y consistencia de las evacuaciones. Si sospechaba que el niño tenía un episodio de diarrea, contactaba a un médico que se encontraba disponible a toda hora. El médico iba en ese momento a interrogar a la madre, examinaba al niño y en caso de confirmar un episodio de diarrea le asignaba un “score” de severidad. Se recolectaban muestras de heces cada semana y durante los episodios de diarrea. Las muestras se ponían en hielo y se transportaban en aproximadamente tres horas al laboratorio donde se almacenaban a -20°C .

Definiciones:

Un episodio de diarrea se definió como la presencia de tres o más evacuaciones acuosas en un período de 24 horas o evacuaciones acuosas que excedían por dos o más el número de evacuaciones diarias en las cuatro semanas previas. Un episodio se consideraba que había terminado el día en que el número de evacuaciones recobraba su patrón diario normal. Esta definición ha sido previamente validada (90, 91, 92). Se consideró infección por rotavirus cuando se detectaba rotavirus en muestras fecales. Una infección se consideró asintomática si el niño no presentaba diarrea durante los primeros cinco días antes y cinco días después de que se detectaba rotavirus. Una infección se consideró sintomática si el niño presentaba diarrea cinco días antes o cinco días después de que se detectaba el virus (93).

Determinación de la severidad de la diarrea: La severidad de cada episodio de diarrea fue evaluada por un médico dentro de las primeras 24 horas después de la notificación del episodio y cada día subsecuente que duró el episodio. Para la evaluación de severidad se utilizó un “score” de 20 puntos descrito previamente (94). Un “score” de uno a nueve se definió como enfermedad leve y un “score” de 10 o más se definió como enfermedad moderada a severa (94).

Para determinar protección después de un primer evento se tomó en cuenta lo siguiente: Si el “score” de severidad no aumentaba cinco o más puntos o si el “score” disminuía por abajo de cinco en el segundo evento, se consideraba protección.

Determinación de rotavirus: Todas las muestras de heces fueron sometidas a una prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) (95), para algunas muestras de la cohorte 1998-2001 se utilizó un ensayo comercial (Rotaclone, Cambridge Biotech Co.). El serotipo G de las muestras positivas para rotavirus se estableció con un inmunoensayo enzimático basado en anticuerpos monoclonales (96) o por transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR) (97). El serotipo P se estableció con rt-PCR (97).

Para la extracción de RNA se utilizó el “Kit” de NucliSens. Se tomó aproximadamente 0.1 g de muestra y se colocó en 1ml de vertrel con 1ml de agua desionizada, se mezcló y se centrifugó durante 10 minutos a 4° C. Después se tomaron 200 µl del sobrenadante y se mezclaron con 9 ml de buffer de lisis al cual se le agregaron 50 µl de sílica. La mezcla se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se volvió a agitar. Después de agitar, se centrífugo

30 segundos a 10,000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se lavó secuencialmente dos veces con buffer de lavado, dos veces con etanol al 70% y una vez con acetona. Después de remover la acetona, se secó el sedimento a 56° C durante 10 minutos, se agregaron 50 µl de buffer de elusión, se mezcló y se incubó cinco minutos dos veces. Por último se centrifugó dos minutos a 10,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. El sobrenadante se almacenó a -70° C. Para el rt-PCR se utilizaron 8 µl del sobrenadante obtenido.

Análisis estadístico

Para comparar la diferencia de severidades entre primero y segundo evento se utilizó la prueba *t* de Student y para el análisis de protección de acuerdo al tipo G, se utilizó la prueba exacta de Fisher.

Resultados

Cohorte 1987-1991: En la cohorte 1987-1991 se encontraron 291 eventos de rotavirus. De éstos fueron serotipificados 230 y fueron genotipificados 61. Se encontraron siete serotipos mixtos y seis Genotipos mixtos. Contando los serotipos y genotipos mixtos se obtuvieron 326 tipos G. La distribución total de serotipos y genotipos G, de acuerdo al mes y al año en que se detectaron, se muestra en la gráfica 1.

De los eventos que están genotipificados en esta cohorte, los resultados del genotipo incluyendo P se presentan en la tabla 3.

Cohorte 1998-2002: En la cohorte 1998-2002 se encontraron 115 eventos de rotavirus. De éstos fueron genotipificados 70 (no se realizaron serotipos en esta cohorte). Se encontraron nueve genotipos mixtos. Contando los genotipos mixtos se obtuvieron 83 genotipos G. La distribución total de genotipos de acuerdo al mes y al año en que se detectaron se muestra en la gráfica 2. Los genotipos de esta cohorte se presentan en la tabla 4.

Tomando en cuenta las dos cohortes, fueron en total 406 eventos de rotavirus. De éstos eventos fueron serotipificados y/o genotipificados 361. Se encontraron 22 infecciones mixtas. Tomando cada uno de los tipos G de las infecciones mixtas se obtuvieron en total 409 tipos G.

Eventos repetidos:

De los niños que se incluyeron en el estudio, 47 tuvieron dos o más eventos de infección por rotavirus en períodos separados. De éstos 47, uno tuvo cuatro eventos, tres tuvieron tres eventos y los otros 43 tuvieron dos eventos. En total fueron 99 eventos, de éstos se serotipificaron 64 y se genotipificaron 58. La forma en que se distribuyeron los genotipos para este grupo se muestra en la tabla 5.

Los diferentes tipos G (genotipos y/o serotipos) de los eventos repetidos se muestran en la tabla 6.

Para el análisis se tomaron en cuenta únicamente los primeros y segundos eventos, los terceros y cuarto eventos se excluyeron ya que sólo fueron cuatro.

De los 47 niños con eventos repetidos, en el primer evento 21 fueron asintomáticos (severidad 0), tres tuvieron una severidad menor a cinco y 23 tuvieron una severidad igual o mayor a cinco. En el segundo evento 25 fueron

asintomáticos, ocho tuvieron una severidad menor a cinco y 14 tuvieron una severidad igual o mayor a cinco.

Tomando en cuenta sólo los eventos sintomáticos, se compararon las severidades del primero y segundo eventos. La media de severidad en el primer evento fue de 8.69 y en el segundo 5.50, la diferencia fue estadísticamente significativa (Gráfica 3 y 4, tabla 7).

Protección:

Para el análisis de protección, se tomó en cuenta como evento separado cada tipo G de cada infección mixta, por lo que se incluyeron 118 tipos G y se analizaron 59 eventos.

La distribución de los tipos G en el primero y segundo evento se muestra en las tablas 8 y 9. G1 y G2 se presentaron con mayor frecuencia en el segundo evento (18 VS 24 y 8 VS 18 respectivamente). G3 y G4 se presentaron con mayor frecuencia en el primer evento (14 VS 5 y 8 VS 1 respectivamente). Ocho eventos se repitieron con el mismo tipo G. G1 fue el que mas frecuentemente se repitió con el mismo tipo G. G1 se presentó repetido en cinco eventos, G3 en dos eventos y G2 en un solo evento. No se encontraron diferencias entre las medias de severidad de los eventos repetidos por el mismo tipo G y los eventos repetidos por cualquier otro tipo G (media de 4.60 para mismo genotipo y 4.63 para diferente genotipo). En la figura 1 se muestran los tipos G y la forma en que se presentaron en el primero y segundo eventos.

Tomando en cuenta la definición de protección antes mencionada, de los ocho eventos repetidos por el mismo tipo G, siete tuvieron protección y uno (G3) no tuvo protección contra enfermedad en eventos subsecuentes. De los 51 eventos

repetidos por diferente genotipo, 14 no tuvieron protección en el evento subsecuente. Al comparar la protección entre eventos con el mismo tipo G (protección homotípica) y con diferente tipo G (protección heterotípica), se encontró una diferencia (87% y 72% respectivamente), ésta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.367$).

En total se encontró que en 44 eventos hubo protección y en 15 eventos no hubo protección (figura 2). En la gráfica 5 se muestran los tipos G del primer evento con relación a si existió protección o no para el siguiente evento. De acuerdo a lo anterior, si el niño tiene una primera infección por G1, G2, G3 ó G4 adquiere una protección estadísticamente significativa ($p = 0.001$) contra una segunda infección por cualquier genotipo. La protección para G1 es de 88%, para G2 de 87%, para G3 de 71% y para G4 de 100%. Si la primera infección es por un genotipo no tipificable, esta protección es de 27% (tabla 10).

Discusión

En la actualidad, el reto más importante para combatir las infecciones por rotavirus, es el desarrollo de una vacuna efectiva que dé protección duradera. Los mecanismos por los cuales las infecciones naturales o las vacunas confieren protección, aún no están claramente definidos.

En múltiples reportes sobre el tema se han establecido dos perspectivas que difieren en un punto, la importancia que tienen los anticuerpos neutralizantes específicos de cada serotipo. Por un lado, hay quienes favorecen el concepto de que la inmunidad depende, principalmente, de anticuerpos que reconocen epítopes específicos de antígenos de la cápside externa del virus (VP4 y VP7). Ellos proponen el desarrollo de vacunas que contengan múltiples serotipos, como RotaShield. Por otro lado, hay quienes favorecen el concepto de que la inmunidad se puede lograr por otros factores, los cuales son independientes de anticuerpos neutralizantes específicos. Ellos proponen el desarrollo de vacunas que contengan un solo serotipo.

En la actualidad se están llevando a cabo diferentes estudios con vacunas, dos de éstos se encuentran en fases avanzadas. En uno se está probando una vacuna con cinco valencias (RotaTeq) mientras que en otro se está probando una vacuna que contiene solo el serotipo G1 (Rotarix). En ambos se reporta una protección que va de 73% a 89%. En los estudios fase II con Rotarix, llevados a cabo en tres

países Latino Americanos (Brasil, México y Venezuela), se encontró una protección contra enfermedad severa para rotavirus serotipo G1 de 76.5% y para rotavirus no G1 de 76.7% (98, 99, 100). Otro estudio con Rotarix llevado a cabo en Finlandia la protección fue de 73%, independientemente de la severidad y de 90% contra enfermedad severa (74). Como se mencionó anteriormente, en julio de 2004 se aprobó Rotarix® para su comercialización en México (73).

Como se ha mencionado, hay inconsistencias en cuanto a protección y a los tipos de protección con vacunas. En algunos lugares donde se han probado son efectivas y en otros no. Estas inconsistencias son mayores cuando se utilizan virus de origen animal. Probablemente por que éstos no se replican tan eficientemente en humanos (101, 102, 103).

En cuanto a infecciones naturales, éstas confieren protección contra infecciones y contra enfermedad en infecciones subsecuentes. Sin embargo tampoco se ha establecido de forma clara cuál es el tipo de protección (26, 27, 29, 45, 46).

En este estudio se utilizaron dos cohortes grandes, con un seguimiento en la mayoría de los casos de dos años. Fueron serotipificados y/o genotipificados en total 361 eventos, de éstos para el análisis sólo 99 eventos se repitieron y correspondieron a 47 niños. Es importante mencionar que en la primera cohorte se realizó detección semanal de rotavirus a todas las muestras, durante el período de seguimiento. En la segunda cohorte, por falta de recursos, sólo se realizó detección semanal de rotavirus a las muestras de octubre a marzo y a las muestras diarreicas de todo el año. Es probable que en la segunda cohorte se perdieran algunos eventos positivos.

En ambas cohortes la frecuencia de los serotipos y/o genotipos fue similar a la reportada en la literatura, el genotipo mas frecuente fue G1 P[8]. Llama la atención que G3 en la cohorte 1998-2002 se encontró solamente en cuatro infecciones mixtas. Alrededor de 20% de los eventos no fueron tipificables en ambas cohortes. Cuando se tomaron en cuenta sólo los tipos G de los eventos repetidos, 21.2% fueron no tipificables. La frecuencia de rotavirus no tipificables es variada, de 2% en algunos estudios hasta 56.7% en un estudio en Japón (104, 105, 106, 107). Con la introducción del RT-PCR se ha observado un decremento importante de rotavirus no tipificables. En este estudio la frecuencia relativamente alta de rotavirus no tipificables puede ser explicada por la aparición de serotipos no incluidos y por la posibilidad de degradación del RNA en las muestras almacenadas.

Las infecciones mixtas, tomando en cuenta cada tipo G de los eventos repetidos, representaron el 10% de todas las infecciones. La frecuencia de infecciones mixtas es muy variable y depende del lugar o país en donde se presenten. Se han reportado frecuencias de infecciones mixtas que van de 0.6% a 30% (104, 107, 108).

Como en los estudios anteriores ya mencionados, en este estudio encontramos que las infecciones naturales protegen contra severidad de la enfermedad en infecciones subsecuentes. El número de eventos sintomáticos (26 VS 22) y el grado de severidad fueron mayores en le primer evento (Gráfica 3 y 4, tabla 7), lo anterior fue estadísticamente significativo.

Cuando se compararon los tipos G del primero y segundo eventos, encontramos que G1 y G2 se presentaron con mayor frecuencia en el segundo evento (18 VS

24 y 8 VS 18 respectivamente). G3 y G4 se presentaron con mayor frecuencia en el primer evento (14 VS 5 y 8 VS 1 respectivamente).

De todos los eventos, hubo ocho repetidos por el mismo tipo G. De acuerdo a la definición de protección, encontramos que sólo uno de los ocho eventos repetidos por el mismo genotipo no tuvo protección en el evento subsecuente. Mientras que 14 de 51 eventos repetidos por diferente genotipo no tuvieron protección en el evento subsecuente. Al comparar la protección entre eventos con el mismo tipo G (protección homotípica) y con diferente tipo G (protección heterotípica), se encontró una diferencia (87% y 72% respectivamente), sin embargo ésta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.367$). Por otro lado cuando se compararon las medias de severidades entre primero evento y segundo evento no encontramos diferencia. La media para el grupo de mismo genotipo fue de 4.60 y para diferente genotipo 4.63.

Cuando se comparó el total de eventos repetidos, el número de eventos sintomáticos y el grado de severidad disminuyeron en el segundo evento. Lo anterior se muestra en la figura 2.

Con lo que se ha mencionado anteriormente, podemos concluir que en este estudio encontramos que las infecciones naturales por rotavirus protegen contra severidad de la enfermedad en infecciones subsecuentes. Esto ya ha sido probado en estudios previos. La ventaja de este estudio es que tenemos tipificadas un número considerable de infecciones naturales primarias y subsecuentes. Con la finalidad de determinar cual es el mejor tipo de protección, se estableció un punto de corte en la escala de gravedad, este fue de cinco. El punto de corte se obtuvo al observar el comportamiento de las severidades en el

primero y segundo evento. Al poner el punto de corte en cinco, encontramos tres grupos: un grupo asintomático o con severidades menores a cinco en ambos eventos, un grupo con disminución de la severidad a menos de cinco y otro grupo en donde la severidad no disminuye o aumenta a más de cinco en el segundo evento. Figura 2. En todos los niños que tuvieron en su segundo evento una severidad menor a cinco puntos, se consideró que hubo protección. Con el análisis que se realizó, parece ser que hay protección tanto homotípica como heterotípica, sin embargo no se logró determinar que tipo de protección es mejor. Encontramos una tendencia que favorece la protección homotípica, sin embargo como ya se mencionó, esto no fue estadísticamente significativo.

Se realizó una comparación para determinar que tipo G daba mayor protección contra severidad de la enfermedad en los eventos subsecuentes. Se encontró que todos dieron protección y la protección fue similar para los cuatro tipos más frecuentes. Sin embargo la protección fue mucho menor (27%) cuando la primera infección fue producida por un virus no tipificable. Por otro lado, la protección fue mayor cuando en el primer evento se encontró G4, G1 y G2 y fue menor con G3. Lo anterior fue estadísticamente significativo ($p = 0.001$).

El hallazgo de que los virus no tipificables, en su mayoría virus provenientes de animales, confieren un menor grado de protección no es algo nuevo. En estudios anteriores se ha visto que estos virus tienen una menor capacidad de replicación en humanos, pueden producir una respuesta menor de anticuerpos neutralizantes y una mala protección (101, 102, 103, 109). Por ejemplo, la vacuna WC3 bovina no indujo anticuerpos neutralizantes o protección hasta que se recombinó con los componentes de virus humanos G1, G2, G3 y P[8] (110). En un estudio publicado

hace un año, se realizó una caracterización por rt-PCR seguida de un análisis de secuencia y de un análisis filogenético de 78 rotavirus humanos. Sugieren que a pesar de que los tipos G y los tipo P pueden intercambiarse entre especies, los genes que codifican para la proteína no estructural 4 y para VP6 son mas específicos en la especie de origen (111). Esto sugiere que estas proteínas, si son mas específicas de cada especie podrían jugar un papel mas importante en la protección. La importancia que tienen en la protección, sobre todo VP6, ya se ha mencionado. Si la protección es heterotípica probablemente dependa en mayor grado de antígenos comunes (VP6). El hecho de que estas proteínas tienen mayor especificidad para cada especie, podría explicar parte de los hallazgos de este estudio, en el que encontramos que los virus no tipificables son los que inducen menor protección.

Bibliografía:

1. Walsh J, Warren K. Selective primary health care: An interim strategy for disease control in developing countries. *N Engl J Med.* 1979;301:967-974.
2. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003 May;9(5):565-72.
3. Dirección General de Estadística e Informática S.S.A. 2000.
4. [Boletín de información N. 10]. Ciudad de México. Oficina del director general de estadística, información y evaluación. Secretaría de Salud 1990. Koster FT, Curlin GC, Aziz KM, Haque A.
5. Synergistic impact of measles and diarrhoea on nutrition and mortality in Bangladesh. *Bull World Health Organ* 1981;59(6):901-8.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). March 19;1999. *MMWR Morb Mortal Weekly Rep.* 1999;48:1-2.
7. Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Cline WL, Arrobio JO, Brandt CD, Rodriguez WJ, Sack DA, Chanock RM, Parrott RH. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med* 1976 Apr 29;294(18):965-72.
8. Villa S, Guiscafre H, Martinez H, Munoz O, Gutierrez G. Seasonal diarrhoeal mortality among Mexican children. *Bull World Health Organ* 1999;77(5):375-80.
9. Kapikian AZ. Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 7-19.
10. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 561-70.
11. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10: 1075-81.
12. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; 2: 1281-3.
13. Madeley CR, Cosgrove BP. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; 2: 451-2.
14. Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Morris CA. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* 1975; 1: 4-5.
15. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003 Apr;9(4):247-62.
16. Bishop R, Davidson G, Holmes I, et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973;2:1281-1283.

17. Black R, Merson M, Rahman A, et al. A two-year study of bacterial, viral, and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. *J Infect Dis.* 1980;142:660-664.
18. Mandell: Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. 2000. Churchill Livingstone, Inc.
19. Estes M, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 1989;53:410-449.
20. Fang Z, Ye Q, Ho M, et al. Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. *J Infect Dis.* 1989;160:948-953.
21. Penaranda M, Cubitt W, Sinarachatanant P, et al. Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal and England. *J Infect Dis.* 1989;160:392-397.
22. Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus antigens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;185:179-227.
23. Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8701-8704.
24. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990 Feb;28(2):276-82.
25. Davidson GP, Hogg RJ, Kirubakaran CP. Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect Immun.* 1983 May;40(2):447-52.
26. Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass RI. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *J Infect Dis.* 1993 Aug;168(2):282-7.
27. Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996 Oct 3;335(14):1022-8.
28. Greenberg, H. B., J. Valdesuso, K. van Wyke, K. Midthun, M. Walsh, V. McAuliffe, R. G. Wyatt, A. R. Kalica, J. Flores, and Y. Hoshino. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47:267-275.
29. Hoshino, Y., L. J. Saif, M. M. Sereno, R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian. 1988. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J. Virol.* 62:744-748.
30. Taniguchi, K., Y. Hoshino, K. Nishikawa, K. Y. Green, W. L. Maloy, Y. Morita, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and M. Gorziglia. 1988. Cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus: nucleotide sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 62:1870-1874.
31. Taniguchi, K., W. L. Maloy, K. Nishikawa, K. Y. Green, Y. Hoshino, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and M. Gorziglia. 1988.

- Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J Virol.* 1988 Jun;62(6):1870-4.
32. Kapikian AZ, Hocino Y, Chanock RM. Rotaviruses. *Fields virology*, 4th ed. Lippincott/The Williams & Wilkins Co., Philadelphia; 1787-1834.
 33. Jain, V., B. K. Das, M. K. Bhan, R. I. Glass, J. R. Gentsch, and The Indian Strain Surveillance Collaborating Laboratories. 2001. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *J. Clin. Microbiol.* 39:3524-3529.
 34. Griffin, D. D., T. Nakagomi, Y. Hoshino, O. Nakagomi, C. D. Kirkwood, U. D. Parashar, R. I. Glass, and J. R. Gentsch. 2002. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6], G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. *Virology* 294:256-269.
 35. Laird AR, Ibarra V, Ruiz-Palacios G, Guerrero ML, Glass RI, Gentsch JR. Unexpected detection of animal VP7 genes among common rotavirus strains isolated from children in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep;41(9):4400-3.
 36. Desselberger U. Gastroenteritis viruses: research update and perspectives. *Gastroenteritis viruses, Novartis Foundation Symposium 238, London, UK, 16-18 May 2000. Mol Med Today.* 2000 Oct;6(10):383-4.
 37. Estes MK, Kang G, Zeng CQ, Crawford SE, Ciarlet M. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp.* 2001;238:82-96; discussion 96-100.
 38. Graham DY, Sackman JW, Estes MK. Pathogenesis of rotavirus-induced diarrhea. Preliminary studies in miniature swine piglet. *Dig Dis Sci.* 1984 Nov;29(11):1028-35.
 39. Tian P, Ball JM, Zeng CQ, Estes MK. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol.* 1996 Oct;70(10):6973-81.
 40. Estes MK, Morris AP. A viral enterotoxin. A new mechanism of virus-induced pathogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 1999;473:73-82.
 41. Ciarlet M, Gilger MA, Barone C, McArthur M, Estes MK, Conner ME. Rotavirus disease, but not infection and development of intestinal histopathological lesions, is age restricted in rabbits. *Virology.* 1998 Nov 25;251(2):343-60.
 42. Mori Y, Borgan MA, Takayama M, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N. Roles of outer capsid proteins as determinants of pathogenicity and host range restriction of avian rotaviruses in a suckling mouse model. *Virology.* 2003 Nov 10;316(1):126-34.
 43. Sasaki S, Horie Y, Nakagomi T, Oseto M, Nakagomi O. Group C rotavirus NSP4 induces diarrhea in neonatal mice. *Arch Virol.* 2001;146(4):801-6.
 44. Ray P, Malik J, Singh RK, Bhatnagar S, Bahl R, Kumar R, Bhan MK. Rotavirus nonstructural protein NSP4 induces heterotypic antibody responses during natural infection in children. *J Infect Dis.* 2003 Jun 1;187(11):1786-93. Epub 2003 May 15.

45. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med*. 1983 Jul 14;309(2):72-6.
46. Bernstein DI, Sander DS, Smith VE, Schiff GM, Ward RL. Protection from rotavirus reinfection: 2-year prospective study. *J Infect Dis*. 1991 Aug;164(2):277-83.
47. Offit PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. *J Infect Dis*. 1996 Sep;174 Suppl 1:S59-64.
48. Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol*. 1992 Jul;30(7):1678-84.
49. Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis*. 1993 Mar;167(3):577-83.
50. Offit PA. Correlates of protection against rotavirus infection and disease. *Novartis Found Symp*. 2001;238:106-13; discussion 114-24.
51. McNeal MM, Barone KS, Rae MN, Ward RL. Effector functions of antibody and CD8+ cells in resolution of rotavirus infection and protection against reinfection in mice. *Virology*. 1995 Dec 20;214(2):387-97.
52. McNeal MM, Ward RL. Long-term production of rotavirus antibody and protection against reinfection following a single infection of neonatal mice with murine rotavirus. *Virology*. 1995 Aug 20;211(2):474-80.
53. Franco MA, Greenberg HB. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol*. 1995 Dec;69(12):7800-6.
54. Matson DO, O'Ryan ML, Pickering LK, Chiba S, Nakata S, Raj P, Estes MK. Characterization of serum antibody responses to natural rotavirus infections in children by VP7-specific epitope-blocking assays. *J Clin Microbiol*. 1992 May;30(5):1056-61.
55. Zheng BJ, Han SX, Yan YK, Liang XR, Ma GZ, Yang Y, Ng MH. Development of neutralizing antibodies and group A common antibodies against natural infections with human rotavirus. *J Clin Microbiol*. 1988 Aug;26(8):1506-12.
56. Gerna G, Sarasini A, Torsellini M, Torre D, Parea M, Battaglia M. Group- and type-specific serologic response in infants and children with primary rotavirus infections and gastroenteritis caused by a strain of known serotype. *J Infect Dis*. 1990 Jun;161(6):1105-11.
57. Clemens JD, Ward RL, Rao MR, Sack DA, Knowlton DR, van Loon FP, Huda S, McNeal M, Ahmed F, Schiff G. Seroepidemiologic evaluation of antibodies to rotavirus as correlates of the risk of clinically significant rotavirus diarrhea in rural Bangladesh. *J Infect Dis*. 1992 Jan;165(1):161-5.
58. O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis*. 1994 Mar;169(3):504-11.
59. Velazquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Serum antibody as a marker of

- protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis.* 2000 Dec;182(6):1602-9. Epub 2000 Oct 23.
60. Chiba S, Yokoyama T, Nakata S, Morita Y, Urasawa T, Taniguchi K, Urasawa S, Nakao T. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet.* 1986 Aug 23;2(8504):417-21.
 61. Rojas AM, Boher Y, Guntinas MJ, Perez-Schael I. Homotypic immune response to primary infection with rotavirus serotype G1. *J Med Virol.* 1995 Dec;47(4):404-9.
 62. Ward RL, Clemens JD, Knowlton DR, Rao MR, van Loon FP, Huda N, Ahmed F, Schiff GM, Sack DA. Evidence that protection against rotavirus diarrhea after natural infection is not dependent on serotype-specific neutralizing antibody. *J Infect Dis.* 1992 Dec;166(6):1251-7.
 63. Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis.* 2002 May 15;34(10):1351-61. Epub 2002 Apr 22.
 64. Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsch JR. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. *Vaccine.* 1999 May 4;17(18):2207-22.
 65. Soares-Weiser, K. Goldberg, E. Tamimi, G. Pitan, OC. Leibovici, L. Rotavirus vaccine for preventing diarrhoea. [Systematic Review] *Cochrane Infectious Diseases Group Cochrane Database of Systematic Reviews.* 1, 2004.
 66. Vesikari T. Rotavirus vaccines against diarrhoeal disease. *Lancet.* 1997 Nov 22;350(9090):1538-41.
 67. Flores J, Perez-Schael I, Blanco M, White L, Garcia D, Vilar M, Cunto W, Gonzalez R, Urbina C, Boher J, et al. Comparison of reactogenicity and antigenicity of M37 rotavirus vaccine and rhesus-rotavirus-based quadrivalent vaccine. *Lancet.* 1990 Aug 11;336(8711):330-4.
 68. Lanata CF, Midthun K, Black RE, Butron B, Huapaya A, Penny ME, Ventura G, Gil A, Jett-Goheen M, Davidson BL. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of one and three doses of the tetravalent rhesus rotavirus vaccine in infants in Lima, Peru. *J Infect Dis.* 1996 Aug;174(2):268-75.
 69. Lanata CF, Black RE, Flores J, Lazo F, Butron B, Linares A, Huapaya A, Ventura G, Gil A, Kapikian AZ. Immunogenicity, safety and protective efficacy of one dose of the rhesus rotavirus vaccine and serotype 1 and 2 human-rhesus rotavirus reassortants in children from Lima, Peru. *Vaccine.* 1996 Feb;14(3):237-43.
 70. Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, de Freitas RB, Oliveira CS, Bellesi N, Monteiro TA, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Valente SA. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. *Bull World Health Organ.* 1996;74(5):491-500.
 71. Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1999 Nov 5;48(43):1007.
 72. Miller JL. CDC says upcoming doses of rotavirus vaccine should be delayed. *Am J Health Syst Pharm.* 1999 Aug 15;56(16):1589.

73. MEXICAN AUTHORITIES APPROVE NEW ROTAVIRUS VACCINE, ROTARIX™ TO PREVENT ROTAVIRUS GASTROENTERITIS IN INFANTS. Issued – Thursday 15 July 2004, London, UK.
74. De Vos B, Vesikari T, Linhares AC, Salinas B, Perez-Schael I, Ruiz-Palacios GM, Guerrero Mde L, Phua KB, Delem A, Hardt K. A rotavirus vaccine for prophylaxis of infants against rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Oct;23(10 Suppl):S179-82.
75. Cunliffe NA, Bresee JS, Hart CA. Rotavirus vaccines: development, current issues and future prospects. *J Infect*. 2002 Jul;45(1):1-9.
76. Jiang B, Estes MK, Barone C, Barniak V, O'Neal CM, Ottaiano A, Madore HP, Conner ME. Heterotypic protection from rotavirus infection in mice vaccinated with virus-like particles. *Vaccine*. 1999 Feb 26;17(7-8):1005-13.
77. Shaw AL, Rothnagel R, Chen D, Ramig RF, Chiu W, Prasad BV. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell*. 1993 Aug 27;74(4):693-701.
78. Franco MA, Greenberg HB. Challenges for rotavirus vaccines. *Virology*. 2001 Mar 15;281(2):153-5.
79. Bertolotti-Ciarlet A, Ciarlet M, Crawford SE, Conner ME, Estes MK. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine*. 2003 Sep 8;21(25-26):3885-900.
80. Choi AH, McNeal MM, Basu M, Flint JA, Stone SC, Clements JD, Bean JA, Poe SA, VanCott JL, Ward RL. Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses. *Vaccine*. 2002 Sep 10;20(27-28):3310-21.
81. Schwartz-Cornil I, Benureau Y, Greenberg H, Hendrickson BA, Cohen J. Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins. *J Virol*. 2002 Aug;76(16):8110-7.
82. Feng N, Lawton JA, Gilbert J, Kuklin N, Vo P, Prasad BV, Greenberg HB. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1203-13.
83. Iosef C, Chang KO, Azevedo MS, Saif LJ. Systemic and intestinal antibody responses to NSP4 enterotoxin of Wa human rotavirus in a gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *J Med Virol*. 2002 Sep;68(1):119-28.
84. Yang K, Wang S, Chang KO, Lu S, Saif LJ, Greenberg HB, Brinker JP, Herrmann JE. Immune responses and protection obtained with rotavirus VP6 DNA vaccines given by intramuscular injection. *Vaccine*. 2001 Apr 30;19(23-24):3285-91.
85. Feng N, Vo PT, Chung D, Vo TV, Hoshino Y, Greenberg HB. Heterotypic protection following oral immunization with live heterologous rotaviruses in a mouse model. *J Infect Dis*. 1997 Feb;175(2):330-41.
86. Feng N, Vo PT, Chung D, Vo TV, Hoshino Y, Greenberg HB. Heterotypic protection following oral immunization with live heterologous rotaviruses in a mouse model. *J Infect Dis*. 1997 Feb;175(2):330-41.

87. Crawford SE, Estes MK, Ciarlet M, Barone C, O'Neal CM, Cohen J, Conner ME. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4813-22.
88. Herrmann JE, Chen SC, Fynan EF, Santoro JC, Greenberg HB, Wang S, Robinson HL. Protection against rotavirus infections by DNA vaccination. *J Infect Dis.* 1996 Sep;174 Suppl 1:S93-7.
89. Gil MT, de Souza CO, Asensi M, Buesa J. Homotypic protection against rotavirus-induced diarrhea in infant mice breast-fed by dams immunized with the recombinant VP8* subunit of the VP4 capsid protein. *Viral Immunol.* 2000;13(2):187-200.
90. Raul Velázquez F, Calva JJ, Guerrero ML, et al. Cohort study of rotavirus serotype patterns in symptomatic and asymptomatic infections in Mexican children. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:54-61.
91. Calva JJ, Ruiz-Palacios GM, Lopez-Vidal AB, Ramos A, Bojalil R. Cohort study of intestinal infection with *Campylobacter* in Mexican children. *Lancet* 1988;1:503-506.
92. López-Vidal Y, Calva JJ, Trujillo A, et al. Enterotoxins and adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*: are they risk factors for acute diarrhea in the community? *J Infect Dis* 1990;162:442-447.
93. Pickering LK, Bartlett AV III, Reves RR, Morrow AL. Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers. *J Pediatr* 1988;112:361-365.
94. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical "score"s for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 1990;22:259-267.
95. Raul Velázquez F, Calva JJ, Guerrero ML, et al. Cohort study of rotavirus serotype patterns in symptomatic and asymptomatic infections in Mexican children. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:54-61.
96. Matson DO, Estes MK, Burns JW, Greenberg HB, Taniguchi K, Urasawa S. Serotype variation of human group A rotaviruses in two regions of the USA. *J Infect Dis* 1990;162:605-614.
97. Gouvea V, Glass RI, Woods PA, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:276-282.
98. Bernstein DI, Sack DA, Rothstein E, Reisinger K, Smith VE, O'Sullivan D, Spriggs DR, Ward RL. Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 1999 Jul 24;354(9175):287-90.
99. Bernstein DI, Sack DA, Reisinger K, Rothstein E, Ward RL. Second-year follow-up evaluation of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12 in healthy infants. *J Infect Dis.* 2002 Nov 15;186(10):1487-9. Epub 2002 Oct 22.
100. Vesikari, T., A. Karvonen, M. Espo, et al. 2002. Evaluation of an oral human rotavirus (HRV) vaccine RIX 4414 in Europe. Presented at the Annual Meeting of Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego.

101. Bernstein DI, Smith VE, Sander DS, Pax KA, Schiff GM, Ward RL. Evaluation of WC3 rotavirus vaccine and correlates of protection in healthy infants. *J Infect Dis.* 1990 Nov;162(5):1055-62.
102. Ward RL, Dinsmore AM, Goldberg G, Sander DS, Rappaport RS, Zito ET. Shedding of rotavirus after administration of the tetravalent rhesus rotavirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 1998 May;17(5):386-90.
103. Bernstein DI, Smith VE, Sherwood JR, Schiff GM, Sander DS, DeFeudis D, Spriggs DR, Ward RL. Safety and immunogenicity of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12. *Vaccine.* 1998 Feb;16(4):381-7.
104. Zhou Y, Li L, Kim B, Kaneshi K, Nishimura S, Kuroiwa T, Nishimura T, Sugita K, Ueda Y, Nakaya S, Ushijima H. Rotavirus infection in children in Japan. *Pediatr Int.* 2000 Aug;42(4):428-39.
105. Tsai CH, Chiu HH, Abe T. Epidemiologic features of rotavirus infection in Taiwan: a review. *Pediatr Int.* 2000 Aug;42(4):411-4.
106. Seo JK, Sim JG. Overview of rotavirus infections in Korea. *Pediatr Int.* 2000 Aug;42(4):406-10.
107. Das S, Varghese V, Chaudhuri S, Barman P, Kojima K, Dutta P, Bhattacharya SK, Krishnan T, Kobayashi N, Naik TN. Genetic variability of human rotavirus strains isolated from Eastern and Northern India. *J Med Virol.* 2004 Jan;72(1):156-61.
108. Song MO, Kim KJ, Chung SI, Lim I, Kang SY, An CN, Kim W. Distribution of human group A rotavirus VP7 and VP4 types circulating in Seoul, Korea between 1998 and 2000. *J Med Virol.* 2003 Jun;70(2):324-8.
109. Ward RL, Sander DS, Schiff GM, Bernstein DI. Effect of vaccination on serotype-specific antibody responses in infants administered WC3 bovine rotavirus before or after a natural rotavirus infection. *J Infect Dis.* 1990 Dec;162(6):1298-303.
110. Clark HF, Offit PA, Ellis RW, Eiden JJ, Krah D, Shaw AR, Pichichero M, Treanor JJ, Borian FE, Bell LM, Plotkin SA. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis.* 1996 Sep;174 Suppl 1:S73-80.
111. Iturriza-Gomara M, Anderton E, Kang G, Gallimore C, Phillips W, Desselberger U, Gray J. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *J Clin Microbiol.* 2003 Aug;41(8):3566-73.

Tabla 1.

Mortalidad por enfermedades diarreicas agudas en menores de cinco años, según grupo de edad México 1990 – 1997

Año	< 1año		1 - 4 años	
	Defunciones	Tasa ¹	Defunciones	Tasa ²
1990	9886	361.4	4125	48.4
1991	7678	278.6	3175	37.3
1992	5153	184.2	2062	24.2
1993	4726	166.4	2022	23.7
1994	3925	135.1	1491	16.8
1995	3453	118.5	1411	13.6
1996	2915	107.7	1339	15.1
1997	2619	97.1	1061	12.0

1 Tasa por 100 000 nacidos vivos registrados (NVR)

2 Tasa por 100 000 habitantes del grupo de edad

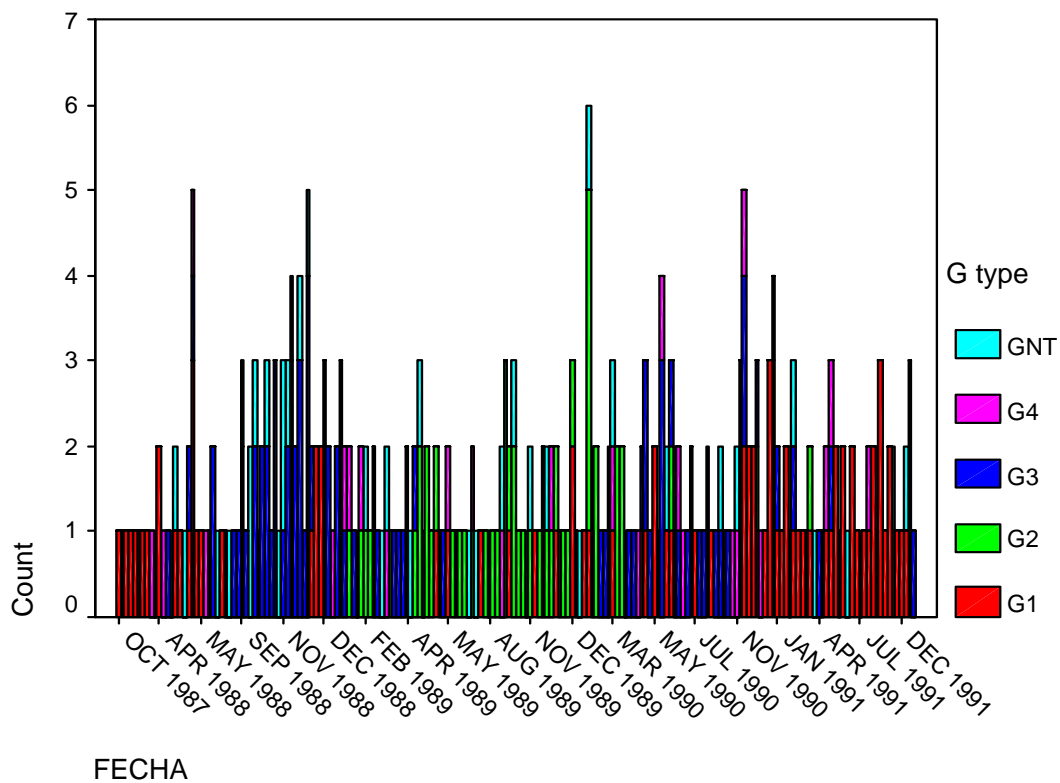
Fuente; Dirección General de Estadística e Informática S.S.A.

Tabla 2.

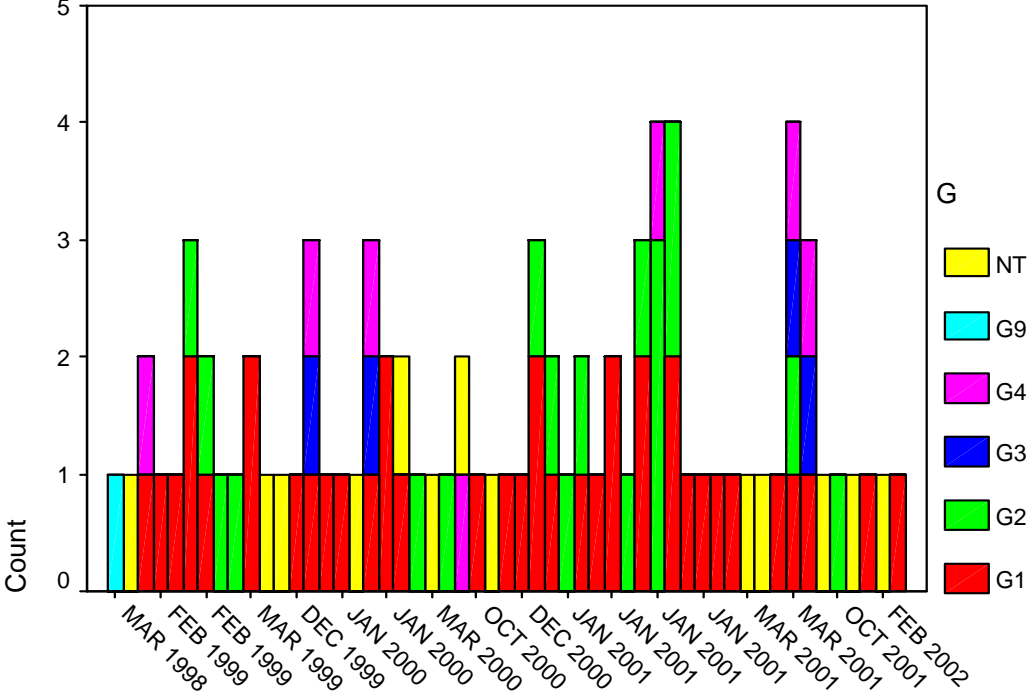
Etapas de la patogénesis

Entrada al huésped
Replicación primaria
Respuesta celular local o diseminada
Diseminación
Respuesta inmunológica
Lesión celular
Estabilización del virus en el tracto gastrointestinal
Penetración en los enterocitos (receptor)
Replicación
Efecto de las proteínas virales en la función celular (NSP4)

Gráfica 1



Gráfica 2



F

Tabla 3
 Genotipificación de la cohorte 1987-1991

Genotipo	Frecuencia	Porcentaje
GNT P[4+8]	2	2.9
G1 P[8]	23	32.9
G4 P[8]	11	15.7
G2 P[4]	4	5.7
GNT P[4+8]	1	1.4
G1 P[NT]	1	1.4
G2 P[NT]	1	1.4
GNT P[4]	2	2.9
G3+4 P[8]	1	1.4
G4 P[6]	1	1.4
GNT P[6]	2	2.9
G3 P[NT]	1	1.4
G4+2 P[4]	2	2.9
GNT P[8]	8	11.4
G3 P[8]	7	10.0
GNT P[4]	1	1.4
G3+1 P[8]	1	1.4
G4+1 P[8]	1	1.4
Total	70	100.0

Tabla 4 Genotipificación de la cohorte 1998-2002

Genotipo	Frecuencia	Porcentaje
GNT P[8+4+6]	1	1.4
GNT P[8]	8	11.4
GNT P[6]	3	4.3
GNT P[4+8]	1	1.4
G9 P[6]	1	1.4
G4 P[6]	1	1.4
G2+4 P[8]	1	1.4
G2 P[8]	1	1.4
G2 P[6+8]	1	1.4
G2 P[4+8]	6	8.6
G2 P[4+6+8]	1	1.4
G2 P[4+6]	1	1.4
G2 P[4]	6	8.6
G1+4 P[8]	1	1.4
G1+3+4 P[8]	4	5.7
G1+2 P[NT]	1	1.4
G1+2 P[8]	2	2.9
G1 P[NT]	3	4.3
G1 P[8]	25	35.7
G1 P[6+8]	1	1.4
G1 P[4+8]	1	1.4
Total	70	100.0

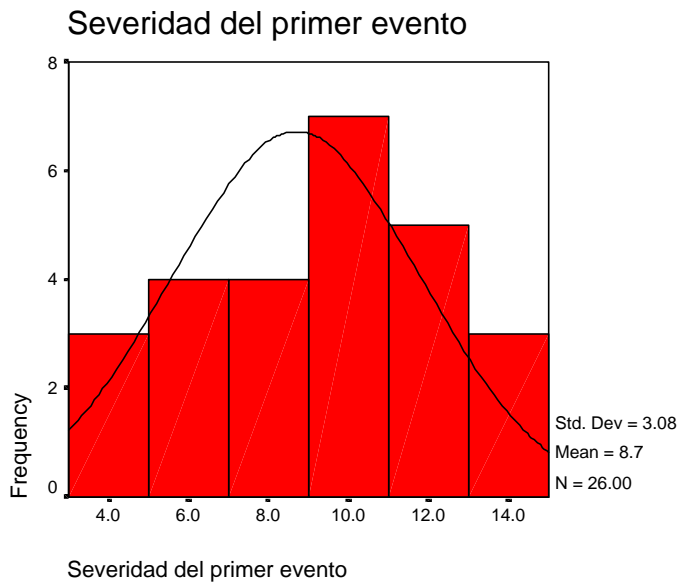
Tabla 5. Genotipos de los eventos repetidos

Genotipo	Frecuencia	Porcentaje
G1 P[8]	16	27.6
G1 P[NT]	1	1.7
G1+2 P[NT]	1	1.7
G2 P[4]	4	6.9
G2 P[4+8]	1	1.7
G2 P[6+8]	1	1.7
G2+4 P[4]	1	1.7
G3 P[8]	2	3.4
G3+4 P[8]	1	1.7
G3+4+1 P[8]	2	3.4
G4 P[4+8]	1	1.7
G4 P[8]	1	1.7
G4+1 P[8]	1	1.7
GNT P[4]	1	1.7
GNT P[4+8]	1	1.7
GNT P[6,8]	1	1.7
GNT P[6]	3	5.2
GNT P[8]	14	24.1
GNT P[8+4+6]	1	1.7
GNT P[NT]	4	6.9
Total	58	100.0

Tabla 6. Tipos G de los eventos repetidos

	Frecuencia	Porcentaje
G1	31	31.3
G1+2	1	1.0
G1+2+3	1	1.0
G1+3	1	1.0
G2	19	19.2
G2+4	2	2.0
G3	15	15.2
G3+4	2	2.0
G3+4+1	2	2.0
G4	3	3.0
G4+1	1	1.0
GNT	21	21.2
Total	99	100.0

Gráfica 3



Gráfica 4

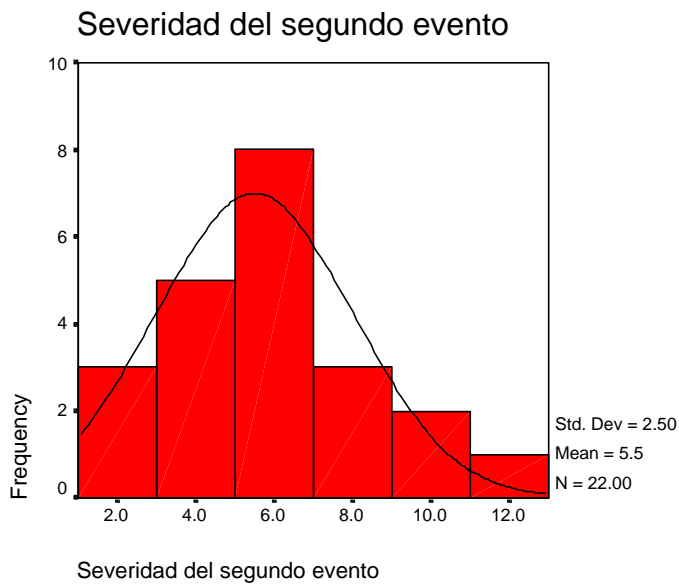


Tabla 7. Diferencia de severidades entre primero y segundo eventos.

	t	df	Sig.	Diferencia (media)	95% (Intervalo de confianza de la diferencia)	
					Inferior	Superior
Severidad del primer evento	14.379	25	.000	8.6923	7.4473	9.9373
Severidad del segundo evento	10.309	21	.000	5.5000	4.3905	6.6095

Tabla 8. Tipo G en el primer evento

	Frecuencia	Porcentaje
G1	18	30.5
G2	8	13.6
G3	14	23.7
G4	8	13.6
GNT	11	18.6
Total	59	100.0

Tabla 9. Tipo G en el segundo evento

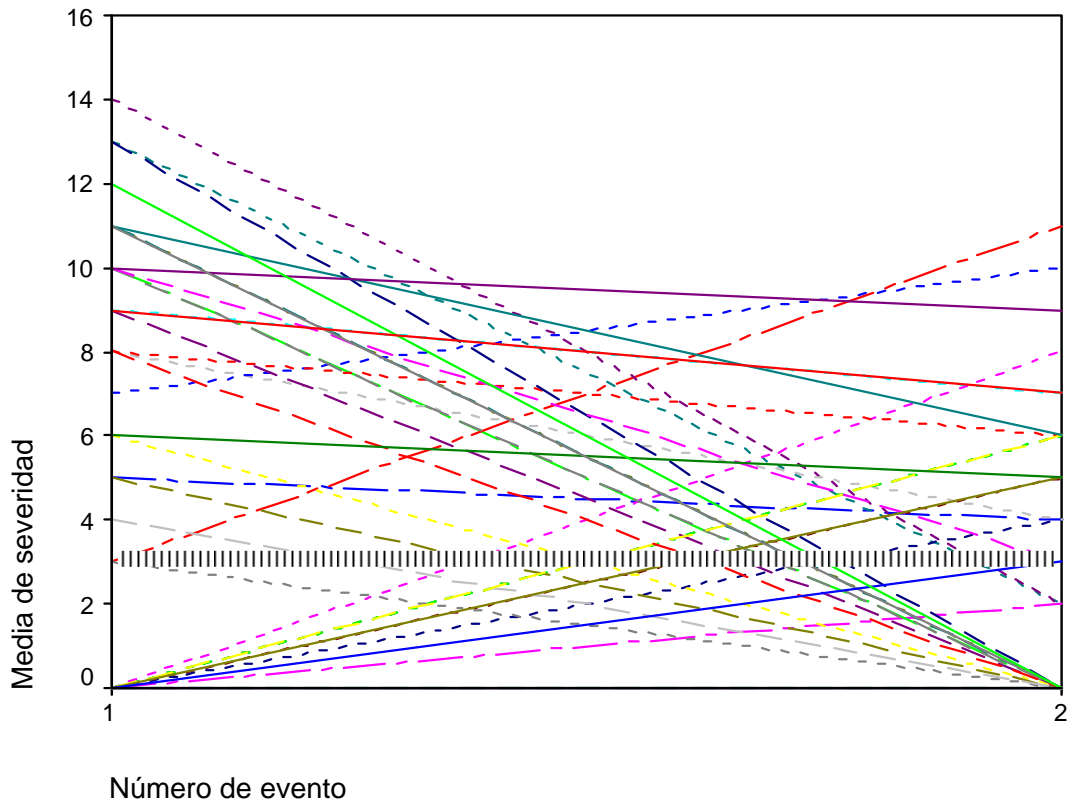
	Frecuencia	Porcentaje
G1	24	40.7
G2	18	30.5
G3	5	8.5
G4	1	1.7
GNT	11	18.6
Total	59	100.0

Figura 1. Tipos G en el primero y segundo eventos.

	Segundo evento						
		G1	G2	G3	G4	GNT	Total
Primer evento	G1	5	5	2		6	18
	G2	5	1	1	1		8
	G3	5	4	2		3	14
	G4	4	4				8
	GNT	5	4			2	11
	Total		24	18	5	1	11

Los números rojos corresponden a los tipos G que fueron iguales en el primero y segundo evento.

Figura 2. Severidad de acuerdo al primero y segundo eventos.



La línea ||||| corresponde a severidad cinco.

Gráfica 5: Número de eventos de acuerdo al tipo G y a la presencia o no de protección.

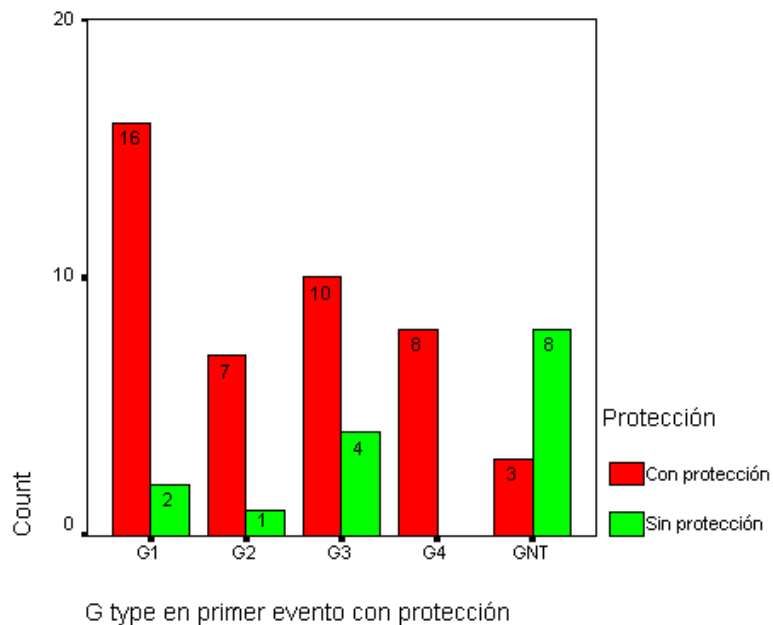


Tabla 10. Protección de acuerdo al tipo G.

	Tipo G en el primer evento de acuerdo a la protección					Total
	G1	G2	G3	G4	GNT	
Con protección	16	7	10	8	3	44
Sin protección	2	1	4	0	8	15
Total	18	8	14	8	11	59