

Características clínicas de la gastroenteritis por rotavirus y su asociación con distintos electroferotipos

Clinical Features of Rotavirus Gastroenteritis and Their Association With Different Electropherotypes

**Sulbarán, María Z.¹; Maldonado, Antonio J.²;
Rojas, Yacqueline ³ y Bastardo, Jesús W.²**

Resumen

Desde junio de 1993 a junio de 1995 se obtuvieron 377 muestras fecales de niños con diarrea aguda admitidos en el hospital Antonio Patricio de Alcalá de Cumaná, Venezuela. Se detectaron patrones electroforéticos de rotavirus en 27,85 por ciento (105/377) de las muestras, observándose que los patrones largos (80%) prevalecieron sobre los cortos (18,09%) y 2 especímenes (1,91%) exhibieron mezclas de electroferotipos. Por coelectroforesis se identificaron 6 patrones electroforéticos diferentes, 4 de patrón largo y 2 de patrón corto. Se encontró asociación entre los electroferotipos detectados y las características clínicas de la enfermedad, notándose una duración de la diarrea de 3 a 6 días (73,8%), la evacuación mínima diaria fue 1 a 2 veces (85,4%) y la evacuación máxima diaria fue 5 a 8 veces (58,1%). La mayoría de los niños mostraron una deshidratación moderada (79,0%), no tuvieron fiebre (78,1%) y la duración de los vómitos fue de 1 a 4 días (74,2%). Estos resultados sugieren que todos los electroferotipos se comportaron de manera similar y por lo tanto no proporcionaron información para establecer la severidad de la infección, por lo que parece improbable que los electroferotipos puedan ser usados para identificar cepas más virulentas de rotavirus.

Palabras clave: Rotavirus, electroforesis, electroferotipos, características clínicas, diarrea, niños.

Recibido: 28-05-02 / Aceptado: 17-07-02

Abstract

From June 1993 to June 1995 stool samples were obtained from 377 children with acute diarrhea admitted to the Antonio Patricio de Alcalá Hospital in Cumaná, Venezuela. Electrophoretic patterns of rotaviruses were detected in 27.85 per cent (105/377) of fecal samples. The long pattern (80%) prevailed over the short pattern (18.09%) and 2 specimens (1.91%) exhibited mixtures of electropherotypes. Viral RNA coelectrophoresis showed 6 distinct patterns, 4 electropherotypes of long profiles and 2 of short profiles. Association was found among the distinct electropherotypes detected and the clinical features of the illness. It was observed that the duration of diarrhea ranged from 3 to 6 days (73.8%), minimum daily evacuation was 1 to 2 times (85.4%), maximum daily evacuation was 5 to 8 times (58.1%). Most of the children showed a moderate dehydration (79.0%), did not have fever (78.1%), and the duration of vomiting ranged from 1 to 4 days (74.2%). These results suggest that all electropherotypes behaved in a similar way and therefore did not provide information to establish the severity of the infection. Consequently it seems unlikely that the electropherotypes can be used to identify more virulent strains of rotavirus.

Key words: Rotavirus, electrophoresis, electropherotypes, clinical features, diarrhea, children.

Introducción

Los rotavirus son los principales agentes etiológicos de la diarrea en infantes humanos (19,27) pueden causar diarrea deshidratante resultando en una significativa morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas (11, 28, 38, 42). Se ha estimado en el mundo que 800.000 o más muertes humanas, en un año, son directamente atribuidas a la gastroenteritis rotaviral (13).

Los rotavirus son clasificados como un género dentro de la familia *Reoviridae*, la cual contiene nueve géneros distintos según el Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses en el 2.000 (7).

Se ha observado la presencia de tres tipos de partículas de diferentes tamaños: partículas de triple, doble y simple, cubierta proteica (11). Dentro de esta última se encuentra el genoma rotaviral formado por once segmentos de RNA bicatenario. La electroforesis en geles de poliacrilamida permite resolver el genoma en sus once seg-

mentos, formando así patrones de migración característicos para cada tipo de rotavirus. Estos patrones pueden compararse unos con otros para la identificación de las diferentes cepas virales (16).

Diferentes proteínas son codificadas por cada uno de los 11 segmentos genómicos y sólo seis de ellas (Vp1, Vp2, Vp3, Vp4, Vp6 y Vp7) forman parte de la estructura viral (6, 19).

Los rotavirus tienen tres importantes especificidades antigénicas: grupo, subgrupo (determinado por la proteína de la cubierta intermedia Vp6), y serotipo (determinado por las proteínas de la cubierta externa: Vp4 y Vp7). La designación de subgrupo y serotipo ha sido delineada hasta el presente solamente para el grupo A de los rotavirus (11).

La enfermedad sintomática ocurre más frecuentemente en niños con edades comprendidas entre 6 meses y 3 años. Los neonatos pueden excretar rotavirus pero son usualmente asintomáticos (8).

Los rotavirus del grupo A producen un síndrome clínico, conocido como gastroenteritis viral (9). La infección produce un espec-

tro de respuestas que varía de infección subclínica, diarrea leve a severa y ocasionalmente una enfermedad deshidratante fatal (17, 19), con un período de incubación de uno a tres días (9, 18). Los vómitos se han reportado como un prominente síntoma con una duración media aproximada de 2,6 días. Con frecuencia los vómitos aparecen primero que la diarrea, pero esta última se mantiene por más tiempo (30). La diarrea tiene una duración aproximada de 2 a 5 días, también se presenta fiebre generalmente de 39°C o más, dolor abdominal (5), algunos presentan manifestaciones respiratorias de las vías superiores (21, 2). También se reportan manifestaciones sistémicas como dolor de cabeza y dolores musculares (31).

Debido a que la diarrea por rotavirus representa un problema de salud pública, sobre todo en países en desarrollo, se consideró necesario determinar la posible asociación de las características clínicas de la enfermedad con diferentes electroferotipos de rotavirus.

Materiales y Métodos

Muestras Fecales

Durante el período comprendido entre junio de 1993 y junio de 1995, se recolectaron 377 muestras fecales, mediante el muestreo al azar simple de niños con diarrea aguda, menores de 5 años y sin distinción de sexo, recluidos en la sala de rehidratación del hospital Antonio Patricio de Alcalá (H.U.A.P.A.) de Cumaná, Venezuela. Las muestras se mantuvieron a -70°C hasta el momento de su análisis.

Datos Clínicos

Los datos clínicos: diarrea, fiebre, vómitos, deshidratación, evacuación mínima por día, evacuación máxima por día, fueron suministrados por el personal médico adscrito a la sección de pediatría del H.U.A.P.A.

Métodos

Para la determinación de los electroferotipos de rotavirus humanos (RVH) se siguió el método de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), descrito por Sulbarán *et al.* (36), que utiliza la separación en geles de poliacrilamida al 5% a una corriente constante de 30mA por 5 a 7 horas a temperatura ambiente y tinción con nitrato de plata 12mM.

Los electroferotipos que a simple vista parecieron distintos, se les hizo coelectroforesis (39), la cual consiste en correr simultáneamente en un mismo pozo del gel, una mezcla de dos muestras que presentan electroferotipos presuntamente diferentes, y a cada lado de este se corren las mismas muestras individualmente, para precisar los segmentos del genoma rotaviral que presenten diferencias en su movilidad electroforética.

Análisis Estadístico

Para establecer la asociación de las características clínicas de la enfermedad rotaviral con los electroferotipos encontrados en el estudio, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates por Tabla de contingencia, con un nivel de confiabilidad de un 99% (34).

Resultados

Trescientos setenta y siete (377) muestras de heces provenientes de niños con diarrea aguda, con edades comprendidas entre 0 a 5 años, fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% para evidenciar la presencia de rotavirus. Del total de muestras analizadas, sólo 107 (28,38%) revelaron bandas de RNA rotaviral.

De las 107 muestras positivas a RVH, a dos (2) no pudo determinárseles el patrón electroforético, por lo cual se consideraron de patrón indeterminado, y otras dos (2) presentaron mezclas electroforéticas. Estas últi-

mas incluyeron un patrón de migración corto con un patrón largo Figura 1. Todos los patrones de las 103 muestras restantes se agruparon en electroferotipos largos y cortos. Para determinar con precisión las variaciones en las movilidades electroforéticas de los segmentos de RNA viral, se aplicó coelectroforesis y se obtuvieron seis (6) patrones electroforéticos distintos Figura 1, de los cuales cuatro (4) eran del patrón largo (L1, L2, L3, L4) y dos (2) del patrón corto (C1, C2).

La comparación de los once segmentos de RNA entre los 4 patrones electroforéticos largos encontrados revelaron variaciones en la movilidad, en los segmentos 2, 3, 4, 7, 8 y 9 mientras que en los patrones cortos se observó variaciones en los segmentos 7 y 8.

De los distintos patrones de migración electroforética detectados, el patrón electroforético largo L3 fue el más frecuentemente aislado (45,63%), seguido por el electroferotipo L4 (20,39%). En los patrones electroforéticos cortos fue el C1 (12,62%) el electroferotipo más predominante, Figura 2.

Se estudió la posible asociación entre los diferentes electroferotipos del genoma rotaviral y la severidad de la infección, por comparación de los electroferotipos obtenidos con las características clínicas y se encontró una asociación significativa entre los electroferotipos y la duración de la diarrea en niños con enfermedad rotaviral, ($\chi^2= 42,53$; $p<0,001$). La diarrea tuvo una duración más frecuente entre 3 a 6 días (73,8%) para todos los electroferotipos de RVH Tabla 1.

En cuanto a los electroferotipos y el número de evacuaciones mínima y máxima por día, se encontraron asociaciones significativas ($\chi^2= 77,67$, $p<0,001$ y $\chi^2=43,66$, $p<0,001$; respectivamente). La mayor frecuencia de evacuación mínima fue entre 1 a 2 veces por día (85,4%) y para la máxima fue de 5 a 8 ve-

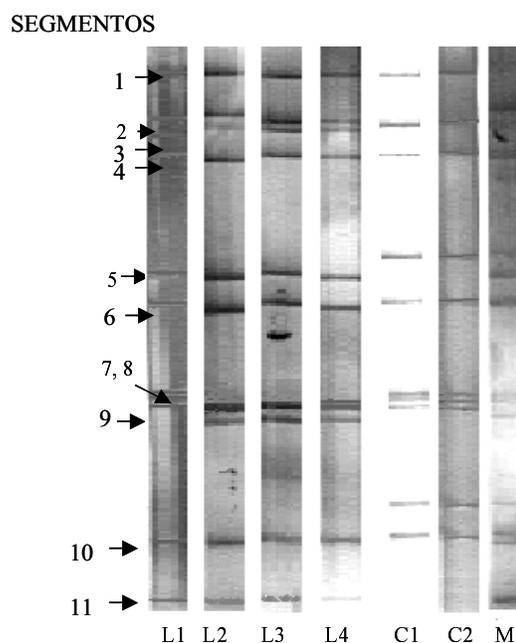


Figura 1. Electroferotipos de RVH identificados en niños con diarrea aguda recluidos en el H.U.A.P.A. Las flechas indican los once segmentos del RNA rotaviral. L1-L4: electroferotipos largos, C1-C2: electroferotipos cortos y M1: electroferotipo mezclado. Electroforesis vertical (de arriba hacia abajo) a una corriente constante de 30 mA, temperatura ambiente por 7 horas.

ces por día (58,1%), para todos los electroferotipos de RVH Tabla 2 y 3.

La asociación entre los electroferotipos y la deshidratación fue significativa ($\chi^2= 71,40$, $p<0,001$) y la intensidad de la deshidratación en el 79% de los casos fue de tipo moderada Tabla 4. Se encontró asociación significativa entre los electroferotipos y la duración de la fiebre ($\chi^2= 77,99$, $p<0,001$). Los diferentes electroferotipos por lo general no producen fiebre (78,1%) y si la producen esta tiene una duración, de 1 a 2 días (19,1%) para todos los electroferotipos de RVH, Tabla 5, y también se encontró asociación significa-

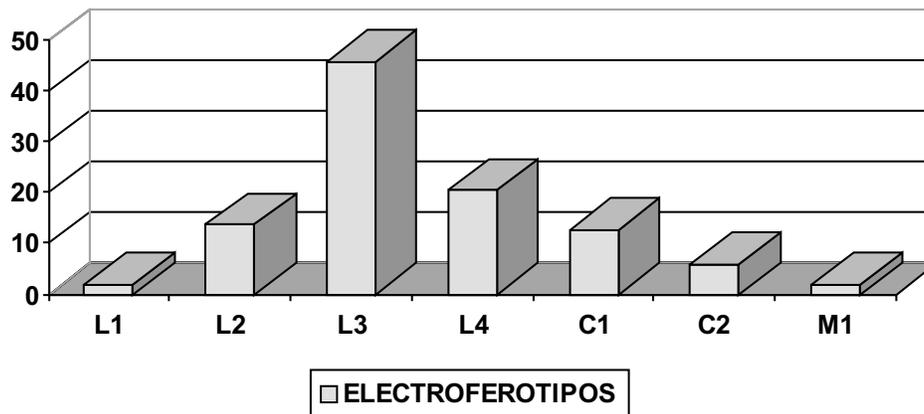


Figura 2. Distribución porcentual de electroferotipos largos: L1, L2, L3, L4 y electrferotipos cortos: C1, C2, de RVH en niños menores de 5 años con diarrea aguda, recluidos en el H.U.A.P.A. entre 1993 y 1995.

tiva entre los electroferotipos y la duración de los vómitos ($\chi^2 = 36,76$, $p < 0,05$). Los vómitos en el 74,2% de los casos tuvieron una duración frecuente de 1 a 4 días Tabla 6.

Discusión

La Organización Mundial de la Salud reporta una incidencia rotaviral de 34 a 52% en países desarrollados y de 20 a 40% en países en vías de desarrollo (42). En este estudio se detectaron 107 casos positivos de un total de 377 muestras analizadas, representando una incidencia de 28,38% de enfermedad por rotavirus en niños menores de 5 años con diarrea aguda. Similares hallazgos fueron encontrados por Mpabalwani *et al.* (26), en un grupo de niños hospitalizados por gastroenteritis aguda en Lusaka (Zambia), con una incidencia de 24% de un total de 1.069 muestras analizadas. Aithala *et al.* (2) reportaron una incidencia de 31% en un total de 217 muestras de heces de niños hospitalizados en Sultan Qaboos University Hospital, Muscat en Omán. Otros autores han reportado incidencias muy parecidas, como De la Cruz *et al.* (10) en Cuba; Pipittajan *et al.* (29) en Thai-

landia; Bern *et al.* (5) en India; Gómez *et al.* (14) en Argentina; Ludert y Liprandi, (22) en Venezuela; Kelkar *et al.* (20) en India; Visser *et al.* (41) en España; de 27,7%; 29,8%; 31,0%; 20,0%; 23,4%; 28,15% y 21,8%, respectivamente.

Dos de las 107 muestras rotapositivas, presentaron una mezcla de electroferotipos de rotavirus, sugiriendo la simultánea infección del paciente con más de una cepa de RVH. La incidencia de diferentes patrones en un mismo paciente fue baja (1,9%), sin embargo, en otros estudios hallaron un considerable número de mezclas electroforéticas (1).

Estas infecciones con mezcla de electroferotipos pueden deberse a la infección simultánea con dos o más cepas diferentes, tras la exposición de infantes a ambientes altamente contaminados (35, 12). Las condiciones epidemiológicas tales como una alta densidad de población humana y un gran grupo de individuos susceptibles, también puede facilitar la transmisión de los rotavirus y proveer grandes oportunidades para infecciones simultáneas con diferentes cepas de rotavirus (29).

Tabla 1. asociación de los electrotipos de RVH encontrados en niños con diarrea aguda recluidos en el H.U.A.P.A. entre 1993 y 1995, con la duración de la diarrea

Electroferotipos	Duración de la diarrea (días)				Chi-cuadrado (χ^2)
	1-2	3-4	5-6	≥ 7	
L1	1	0	0	1	42,53***
L2	0	2	4	8	
L3	1	22	16	6	
L4	1	11	5	4	
C1	0	2	8	3	
C2	0	1	3	2	
M1	0	1	1	1	
Total	3	39	37	24	
%	2,9	37,9	35,9	23,3	

*** significativo, $p < 0,001$ **Tabla 2.** Asociación de los electroferotipo de RVH encontrados en niños con diarrea aguda recluidos en el H.U.A.P.A. entre 1993 y 1995, con la evacuación mínima por día

Electroferotipo	Evacuación mínima por día				Chi-cuadrado (χ^2)
	1-2	3-4	5-6	≥ 7	
L1	2	0	0	0	77,67***
L2	10	4	0	0	
L3	40	3	1	1	
L4	17	3	0	1	
C1	13	0	0	0	
C2	4	2	0	0	
M1	2	0	0	0	
Total	88	12	1	2	
%	85,4	11,7	1,0	1,9	

*** significativo, $p < 0,001$

Sin embargo, la detección de mezclas electroforéticas no hizo a la infección más severa en comparación con las infecciones simples, resultados similares fueron reportados por Avendaño *et al.* (4), quienes encontraron mezclas electroforéticas en un 17% en un total de 168 muestras diarreicas.

El análisis molecular del RNA de los RVH reveló la presencia de un 80% de elec-

troferotipos largos y un 18,09% de electroferotipos cortos. Los rotavirus de patrón largo son los de mayor prevalencia en la mayoría de los episodios diarreicos en el mundo. Muchos autores han reportado esta prevalencia de patrón largo (12, 1, 29, 43, 37, 24), sin embargo, en algunos episodios de diarrea el principal causante es un rotavirus de patrón corto (3).

Tabla 3. Asociación de los electroferotipos de RVH encontrados en niños con diarrea aguda reclusos en el H.U.A.P.A. entre 1993 y 1995, con la evacuación máxima por día

Electroferotipo	Evacuación mínima por día				Chi-cuadrado (χ^2)
	1-4	5-8	9-12	≥ 13	
L1	0	2	0	0	43,66***
L2	0	6	5	3	
L3	8	26	12	1	
L4	3	16	2	0	
C1	0	8	2	3	
C2	0	2	4	0	
M1	1	1	0	0	
Total	12	61	25	7	
%	11,4	58,1	23,8	6,7	

*** significativo, $p < 0,001$ **Tabla 4.** Asociación de los electroferotipos de RVH encontrados en niños con diarrea aguda reclusos en el H.U.A.P.A. entre 1993 y 1995, con la intensidad de la deshidratación.

Electroferotipo	Intensidad de la deshidratación				Chi-cuadrado (χ^2)
	Ausente	Leve	Moderada	Intensa	
L1	0	1	1	0	43,66***
L2	0	0	14	0	
L3	2	11	33	1	
L4	3	3	15	0	
C1	0	0	13	0	
C2	0	0	6	0	
M1	1	0	1	0	
Total	6	15	83	1	
%	5,7	14,3	79,0	1,0	

*** significativo, $p < 0,001$

Se identificaron 6 patrones distintos de migración, cuatro de ellos eran patrones electroforéticos largos (L1, L2, L3 y L4) y dos patrones electroforéticos cortos (C1 y C2). Esto evidencia que el patrón largo presentó una mayor variabilidad genética que el patrón corto. Los patrones largos L3 (45,63%) y L4 (20,39%) fueron detectados con mayor frecuencia Figura 2. Algunos autores han demostrado que un electroferotipo puede pre-

dominar en una comunidad por años sucesivos (32, 33).

Los segmentos de RNA mostraron mayor variación en la movilidad electroforética de los segmentos 2, 3, 4 (clase I); 7, 8, 9 (clase III) en los patrones largos y en los segmentos 7, 8 (clase III) en los patrones cortos Figura 1. Pipittajan *et al.* (29) reportaron resultados muy parecidos a los encontrados en esta investigación; donde la mayor diversidad de mi-

Tabla 5. Asociación de los electroferotipos de RVH encontrados en niños con diarrea aguda reclusos en el H.U.A.P.A. entre 1993 y 1995, con la duración de la fiebre.

Electroferotipo	Duración de la fiebre (días)				Chi-cuadrado (χ^2)
	Ausente	1-2	3-4	≥ 5	
L1	1	1	0	0	77,99***
L2	11	3	0	0	
L3	35	10	2	0	
L4	15	6	0	0	
C1	13	0	0	0	
C2	5	0	0	1	
M1	2	0	0	0	
Total	82	20	2	1	
%	78,1	19,1	1,9	0,9	

*** significativo, $p < 0,001$ **Tabla 6.** Asociación de los electroferotipos de RVH encontrados en niños con diarrea aguda reclusos en el H.U.A.P.A. entre 1993 y 1995, con la duración de los vómitos.

Electroferotipo	Duración de los vómitos (días)				Chi-cuadrado (χ^2)
	Ausente	1-2	3-4	≥ 5	
L1	1	1	0	0	36,76***
L2	6	5	2	1	
L3	11	26	10	0	
L4	3	12	4	2	
C1	1	9	3	0	
C2	2	3	1	0	
M1	0	0	2	0	
Total	24	56	22	3	
%	22,9	53,3	20,9	2,9	

*** significativo, $p < 0,001$

gración estaba en los segmentos de la clase I y III, y además, que la mayor variación de movilidad ocurrió en los patrones electroforéticos largos. Urquidi (40) y Maldonado y Bastardo (23) en Venezuela, encontraron 11 y 12 electroferotipos distintos, respectivamente, y una mayor variabilidad en los genes 7,8 y 9.

La posible explicación para esta diversidad de migración fue que la clase I y III poseen el mayor número de segmentos RNA vi-

ral y que el hecho de que sean los electroferotipos largos los que presenten mayor variación puede ser debido a que ellos recorren un mayor espacio en la electroforesis en geles de poliacrilamida.

El análisis molecular de los electroferotipos de rotavirus permitió estudiar la relación entre cepas virales particulares y las características clínicas asociadas a la infección rotaviral. Los resultados mostraron que exis-

te una asociación significativa entre los distintos electroferotipos y la duración de la diarrea, indicando esto que todos los electroferotipos producen diarrea y por lo general esta tiene una duración de aproximadamente 3 a 6 días. Mesa *et al.* (25) reportaron una duración media de la diarrea de 3 a 4 días, en un estudio que involucró 76 niños hospitalizados por gastroenteritis rotaviral en el Hospital La Paz (Madrid), resultados similares fueron reportados por Haffejee y Moosa (15), en infantes del sur de África, quienes presentaron una duración media de la diarrea rotaviral de 5 días.

También se encontró una asociación significativa entre los electroferotipos y la evacuación mínima por día, y con frecuencia fue de 1 a 2 veces por día. Al igual que en la anterior, se encontró una asociación significativa entre los electroferotipos y la evacuación máxima por día, produciendo evacuaciones de 5 a 8 veces diarias. Esto sugiere que cualquier electroferotipo puede producir, diarrea de diferente severidad, lo cual concuerda con lo reportado por Fernández *et al.* (12) quienes observaron que un mismo electroferotipo estuvo presente en casos leves y severos de diarrea e inclusive en casos asintomáticos.

Además todos los electroferotipos producen una deshidratación moderada y por lo general no producen fiebre, y cuando la producen tiene una duración de 1 a 2 días. También, se obtuvo asociación entre el electroferotipo y la duración del vómito, indicando esto que cada electroferotipo produce vómito con duración variable, pero por lo general los vómitos tienen una duración de 1 a 4 días.

Fernández *et al.* (12), concluyeron que un mismo electroferotipo estuvo presente en casos leves, severos y asintomáticos de la enfermedad y que ningún electroferotipo estuvo particularmente asociado con una mayor

virulencia. Además, el mismo reporte apunta que electroferotipos aislados de casos asintomáticos, fueron aislados también de pacientes con diarrea severa. Todos estos hallazgos y los encontrados en el presente trabajo nos indican que parece improbable que el electroferotipo pueda proporcionar información importante para establecer la severidad de la infección o en su defecto identificar cepas atenuadas naturalmente que puedan ser usadas en el desarrollo de vacunas.

Es claramente aparente que la infección con un electroferotipo en particular de RVH no está consistentemente asociado con la severidad de los síntomas clínicos específicos, por lo que se hace necesario establecer otros tipos de asociaciones que proporcionen información de valor en la producción de vacunas, así como también en las medidas que deban tomarse ante una epidemia con una cepa de rotavirus altamente virulenta.

Referencias Bibliográficas

- (1) Ahmed, M.; Urasawa, S.; Taniguchi, K.; Urasawa, T.; Kobayashi, N.; Wakasugi, F.; Islam, A., Sahikh, H. Analysis of human rotavirus strains prevailing in Bangladesh in relation to nationwide floods brought by the 1988 monsoon. *J. Clin. Microbiol.*, 1991; 29(10):2273-2279.
- (2) Aithala, G.; Al Dhahry, S.; Saha, A., Elbualy, M. Epidemiological and clinical features of rotavirus gastroenteritis in Oman. *J. Trop. Pediatr.*, 1996; 42(1):54-57.
- (3) Albert, M.; Bishop, R., Shann, F. Epidemiology of rotavirus diarrhea in the highlands of Papua. New Guinea, in 1979, as revealed by electrophoresis of genome RNA. *J. Clin. Microbiol.*, 1983; 17:162-164
- (4) Avendaño, L.; Spencer, E.; Calderon, A., Martinez, A. Infección por rotavirus en lactantes con diarrea aguda. Aspectos clínicos y epidemiológicos. *Rev. Med. Chile.*, 1983; 111:240-246.

- (5) Bern, C.; Unicomb, L.; Gentsch, J.; Banul, N.; Yunus, M.; Bradley, R.; Glass, R. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J. Clin. Microbiol.*, 1992; 30(12):3234-3238.
- (6) Both, G.; Bellamy, A.; Mitchell, D. Rotavirus protein structure and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1994; 185:67-105.
- (7) Cann, A. In: Classification of Subcellular Infectious Agents. Principles of Molecular Virology. 3ra Edition. Academic Press. 2001; 339 pp.
- (8) Chrystie, I.; Totterdell, B.; Banatvala, J. Asymptomatic endemic rotavirus infection in the newborn. *Lancet.*, 1978; I:1176-1178.
- (9) Davidson, G.; Bishop, R.; Townley, R.; Holmes, I.; Ruck, B. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet.*, 1975; 1:242-246.
- (10) De la Cruz, F.; Guzman, M.; Esquivel, M.; Grandio, O.; Vazquez, S.; Bravo, J. Clinical and epidemiologic aspects of acute diarrhea caused by rotavirus in children, Cuba, 1982-1984. *Rev. Cubana. Med. Trop.*, 1990; 42(2):178-187.
- (11) Estes, M. Rotaviruses and their replication. In Fields B. N., Knipe, D.M., Howley, P.M., et al. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia. 1996; p.1625-1655.
- (12) Fernández, J.; Sandino, A.; Pizarro, J.; Avenaño, L.; Pizarro, J., Spencer, E. Characterization of rotavirus electropherotypes excreted by symptomatic and asymptomatic infants. *Epidemiol. Infect.*, 1991; 106:189-198.
- (13) Glass, R.; Bresee, J.; Parashar, U.; Miller, M. and Gentsch, J. Rotavirus vaccines at the threshold. *Nat. Med.*, 1997; 3:10-11.
- (14) Gomez, J.; Nates, S.; De Castagnaro, N.; Espul, C.; Borsa, A., Glass, R. Anticipating rotavirus vaccines: review of epidemiologic studies of rotavirus diarrhea in Argentina. *Rev. Panam. Am. J. Public Health.*, 1998; 2(3):69-78
- (15) Haffeejee, I., Moosa, A. Rotavirus studies in Indian (Asian) South african infants with acute gastroenteritis: II. Clinical aspects and outcome. *Ann. Trop. Paediatr.*, 1990; 10(3):245-254.
- (16) Kalica, A.; Sereno, M.; Wyatt, R.; Mebus, C.; Chanock, R.; Kapikian, A. Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of RNA. *Viol.*, 1978; 87:247-255.
- (17) Kapikian, A.; Greenberg, H., Wyatt, R. Viral gastroenteritis. In: A. S. Evans (ed.), *Viral infections of humans*, 2nd ed. Plenum Publishing Corp., New York. 1982; p. 283-326.
- (18) Kapikian, A.; Wyatt, R.; Levine, M.; Yolken, R.; Vankirk, D.; Dolin, R.; Greenberg, H., Chanock, R. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J. Infect. Dis.*, 1983; 147:95-106.
- (19) Kapikian, A., Chanock, R. Rotaviruses. In: Fields B. N., Knipe, D.M., Howley, P.M., et al., eds. *Field's virology*, third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996; p.1657-1707.
- (20) Kelkar, S.; Purohit, S., Simha, K. Prevalence of rotavirus diarrhoea among hospitalized children in Pune, India. *Indian. J. Med. Res.*, 1999; 109:131-135.
- (21) Lewis, H.; Parry, J.; Davies, H.; Parry, R.; Mott, A.; Dourmashkin, R.; Sanderson, P.; Tyrrel, D. and Valman, H. A year's experience of the rotavirus syndrome and its association with respiratory illness. *Archs. Dis. Child.*, 1979; 54:339-346.
- (22) Ludert, J. and Liprandi, F. Identification of viruses with bi- and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenteritis. *Res. Virol.*, 1993; 144:219-224.
- (23) Maldonado, A. y Bastardo, J. Epidemiología molecular de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Acta. Cient. Venezol.*, 1992; 43:368-372.
- (24) Maldonado, A., Bastardo, J. Prevalencia de subgrupos, serotipos y electroferotipos de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Invest. Clin.*, 1998; 39(1):39-51.
- (25) Mesa, F.; Lajo, A.; Alonso, F.; Borque, C.; Segurado, E., Ladron, C. Rotavirus infection: clinical characteristics and time of elimination of the rotavirus antigen in the feces. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 1996; 14(2):106-110.
- (26) Mpabalwani, M.; Oshitani, H.; Kasolo, F.; Mizuta, K.; Luo, N.; Matsubayashi, N.; Bhat, G.; Suzuki, H., Numazaki, Y. Rotavirus gas-

- troenteritis in hospitalized children with acute diarrhoea in Zambia. *Ann. Trop. Paediatr.*, 1995; 15(1):39-43
- (27) Parashar, U.; Bresee, J.; Gentsch, J. and Glass, R. Rotavirus. *Emerg. Infect. Dis.*, 1998; 4(4):561-70.
- (28) Parashar, U.; Holman, R.; Clarke, M.; Bresee, J., Glass, R. Hospitalizations associated with rotavirus diarrhea in the United States, 1993 through 1995: surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus specific diagnostic code. *J. Infect. Dis.*, 1998; 177:7-13.
- (29) Pipittajan, P.; Kasempimolporn, S.; Ikegami, N.; Akatani, K.; Wasi, C., Siriarchatanant, P. Molecular epidemiology of rotaviruses associated with pediatric diarrhea in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.*, 1991; 29(3):617-624
- (30) Rodriguez, W.; Kim, H.; Arrobio, J.; Brandt, C.; Chanock, R.; Kapikian, A.; Wyatt, R., Parrott, R. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J. Pediatr.*, 1977; 91:188-193.
- (31) Rodriguez, W. Clínica de la diarrea aguda. Síntomas y signos de los diversos cuadros diarréicos en relación a la etiología. *Gen.*, 1982; 36:5-69
- (32) Rodger, S.; Bishop, R.; Birch, C.; McLean, B., Holmes, I. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. Clin. Microbiol.*, 1981; 13:272-278.
- (33) Schnagl, R.; Rodger, S., Holmes, I. Variation in human rotavirus electropherotypes occurring between rotavirus gastroenteritis epidemic in central Australia. *Infect. Immun.*, 1981; 33:17-21.
- (34) Sokal, R., Rolf, J. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Editorial H. Blume. Madrid, España. 1981; 830 pp.
- (35) Spencer, E.; Avendaño, L., Garcia, B. Analysis of human rotavirus mixed electropherotypes. *Infect. Immun.*, 1983; 39:569-574.
- (36) Sulbarán, M.; Maldonado, A., Bastardo, J. Método Rápido de Diagnóstico de Rotavirus en Heces. *Saber.*, 2000; 12(2): 29-36.
- (37) Tietzova, J.; Petrovicova, A.; Pazdiora, P. Characterization of human rotaviruses isolated from symptomatic and asymptomatic infection. *Act. Virol.*, 1995; 39(4):211-214. Ç
- (38) Tucker, A.; Haddix, A.; Bresee, J.; Holman, R.; Parashar, U., Glass, R. Cost-effectiveness analysis of a rotavirus immunization program for the United States. *Jama.*, 1998; 279:1371-1376
- (39) Unicomb, L.; Coulson, B., Bishop, R. Experience with enzyme immunoassay for serotyping human group A rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 1989; 27:586-588.
- (40) Urquidi, V. Molecular epidemiology of human rotavirus infection in Coro, Venezuela. *Act. Cient. Venezol.*, 1989; 40:33-39.
- (41) Visser, L.; Cano, R.; Gay, N., Navarro, J. Impact of rotavirus disease in Spain: an estimate of hospital admissions due to rotavirus. *Acta Pediatr. Suppl.*, 1999; 88(426):72-76.
- (42) WHO. 1999. Rotavirus vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec.* 74:33-38 (<http://www.who.int/wer/>).
- (43) Yap, K.; Wong, Y.; Khor, C. and Ooi, Y. Rotavirus electropherotypes in Malaysian children. *Can. J. Microbiol.*, 1992; 38:996-999.