

ROTAVIRUS Y GASTROENTERITIS: UN NUEVO ENFOQUE A UN VIEJO PROBLEMA

**José Esparza, Francisco Gil, Mario Gorziglia, Ernesto Novo
y Virginia Urquidí**

*Laboratorio de Biología de Virus, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
(IVIC), Apartado 1827, Caracas 1010A, Venezuela.*

RESUMEN

La gastroenteritis es uno de los más importantes problemas de salud pública en el mundo, tanto por el número de muertes que ocasiona, como por las secuelas físicas y mentales que determina en niños de países en subdesarrollo. En los últimos años ha habido avances importantes en el conocimiento de la etiopatogenia de la diarrea que hacen ver el futuro con optimismo. Por un lado, el desarrollo de procedimientos de rehidratación oral ha contribuido a disminuir la mortalidad por diarrea. Por otro lado, la identificación de nuevos agentes etiológicos permitirá diseñar métodos de control y prevención más eficaces, incluyendo la utilización de vacunas.

Entre los nuevos patógenos descubiertos, los rotavirus han surgido como una de las causas más importantes de gastroenteritis. Ellos son virus complejos que poseen un genoma formado por once segmentos de ARN de doble cadena, rodeado por una doble cubierta proteica. La identificación de los polipéptidos presentes en la cápside externa, y su papel en la neutralización de la infectividad viral, aportará información para el mejor diseño de inmunógenos.

Los datos obtenidos del estudio de la biología molecular del virus permitirán enfocar el problema de las diarreas virales con enfoques más imaginativos.

INTRODUCCION

A pesar de que la investigación biomédica moderna ha contribuído con avances sorprendentes en muchas de las áreas de la medicina práctica, otras han permanecido al margen de dichos adelantos, quizás por carecer del atractivo académico necesario, o por no constituir problemas importantes en los países donde mayoritariamente se desarrolla dicha actividad científica. La gastroenteritis ha sido uno de esos problemas.

La diarrea aguda infantil no sólo constituye un problema de salud pública por el número de casos y muertes que ocasiona, sino también por el retardo en la maduración física y psíquica que determina en los individuos afectados, con la consiguiente disminución de la calidad de vida en grandes masas de población en los países subdesarrollados. En ese mundo subdesarrollado ocurren más de 500 millones de episodios diarreicos al año originando cerca de 12 millones de muertes (32). Las enfermedades diarreicas constituyen la primera o segunda causa de muerte en la mayoría de los países latinoamericanos, siendo en Venezuela la primera causa en el grupo de niños de 1 a 4 años de edad, donde ocasiona alrededor de 3.000 muertes al año. Para 1971 se calculó que en Venezuela ocurrían mensualmente más de 200.000 episodios diarreicos en niños menores de un año, representando más de un millón de días-enfermo por mes en ese grupo etáreo. El daño económico causado, por gastos de atención hospitalaria, fué calculado en el orden de los 20 millones de bolívares (46).

Los factores que han limitado el estudio y establecimiento de medidas racionales de control de la gastroenteritis pueden ubicarse a dos niveles: uno de comunidad y otro de individuo enfermo. A nivel de comunidad el problema ha radicado en las dificultades que se encontraron para definir el o los agentes etiológicos responsables del síndrome (9). Aunque ciertos patógenos bacterianos, tales como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* enteropatógena, han sido involucrados por muchos años en la etiología de la diarrea, éstos solamente se aíslan en un porcentaje relativamente bajo de los casos (20 a 30%). El otro problema, a nivel individual, y estrechamente relacionado con el anterior, era un desconocimiento de la fisiopatología de la diarrea con ausencia de medidas terapéuticas realmente efectivas.

Es precisamente en esos dos aspectos en que recientemente han ocurrido algunos desarrollos importantes que nos hacen ver el futuro con optimismo, y que permiten, hoy mejor que nunca, la planificación de un ataque global a la diarrea infantil en todo el mundo. En primer lugar, y en base a un mejor conocimiento de la patogénesis de la diarrea aguda, se ha podido diseñar un esquema de tratamiento consistente en una modali-

dad única de rehidratación oral, que ha resultado segura y efectiva para diarreas de cualquier etiología (30). Por otra parte, se han identificado nuevos agentes etiológicos, tanto bacterianos como virales, responsables de cuadros de diarrea aguda. Es así como a los patógenos bacterianos clásicos se le suman hoy las *E. coli* enterotoxigénicas e invasivas, *Yersinia*, *Campylobacter*, etc. A éstos hay que añadirle todo un grupo de agentes virales, particularmente los rotavirus que parecen ser la causa más frecuente de gastroenteritis en todo el mundo.

ROTAVIRUS Y DIARREA INFANTIL

En vista del alto porcentaje de casos de gastroenteritis de los cuales no se lograba aislar ninguno de los patógenos bacterianos reconocidos como agentes causales de diarrea, muchos investigadores supusieron que la mayoría de las gastroenteritis eran en efecto debidas a agentes virales. Sin embargo, las numerosas investigaciones realizadas para estudiar la asociación de los virus entéricos conocidos con diarrea fueron infructuosas. Esa imposibilidad de relacionar enterovirus con diarrea asentó el concepto de que los virus no estaban asociados con gastroenteritis, y paralizó esas investigaciones por varios años.

A principios de la década pasada se introdujo un nuevo concepto en diagnóstico viral rápido, como fué la búsqueda directa de partículas virales con la ayuda del microscopio electrónico. Cuando esa metodología se utilizó para observar concentrados de heces de pacientes con gastroenteritis, se abrió todo un mundo viral, no sospechado hasta entonces, el cual había pasado desapercibido debido a que dichos agentes virales no son cultivables en ninguno de los sistemas celulares comúnmente hasta ahora.

Es así como se llegó al descubrimiento de los rotavirus, los cuales parecen ser los agentes virales de la gastroenteritis que tanto se buscaron. La microscopía electrónica también demostró la existencia de una gran variedad de virus presentes en heces, tales como los Coronavirus (5), Adenovirus (15), y una gran variedad de pequeños virus isométricos (20, 23).

El descubrimiento de los rotavirus humanos se lo debemos a un grupo de investigadores australianos, quienes en 1973 descubrieron la presencia de dichas partículas virales en células epiteliales de la mucosa duodenal de niños con gastroenteritis no bacteriana (2). Esos estudios fueron extendidos por los mismos autores (8) por medio del examen directo de las heces, encontrándose presentes los virus en un alto porcentaje de los niños con gastroenteritis esporádica. La confirmación de las observaciones de los australianos por diversos autores establecieron con mucha certeza que este grupo de virus, los rotavirus, están efectivamente asociados etiológicamente con gastroenteritis. Los rotavirus han sido identificados en todas

las partes del mundo donde han sido buscados, y nosotros los detectamos en Venezuela en 1975, en un estudio piloto realizado en el Hospital de Niños "J.M. de los Ríos", en Caracas (12).

Este virus presenta variaciones estacionales importantes, siendo un virus típico de invierno. En nuestro país el virus puede encontrarse durante todo el año, aunque es más frecuente entre los meses de Noviembre a Marzo (45). La diarrea por rotavirus es más frecuente en niños entre 6 y 24 meses de edad, instaurándose en forma abrupta, acompañada por fiebre y vómitos. El cuadro diarreico generalmente es precedido o acompañado por signos respiratorios (faringitis), lo cual sugiere multiplicación del virus a ese nivel. La diarrea tiene una duración promedio de 4-5 días, y frecuentemente cursa con moderada deshidratación isotónica (una revisión actualizada de los aspectos etiológicos de las diarreas virales, así como de su epidemiología y clínica, puede encontrarse en la referencia 11).

ROTAVIRUS EN OTRAS ESPECIES ANIMALES

Aunque el descubrimiento de los rotavirus fué recibido con gran sorpresa por los investigadores en medicina humana, virus relacionados eran conocidos con anterioridad como causantes de diarrea en animales jóvenes. Entre ellos deben mencionarse el virus de la diarrea epizootica del ratón infante (conocido con las siglas de "EDIM", o virus de la "Epizootic Diarrhea of Infant Mice") (21) y el virus de la diarrea de terneras recién nacidas (conocido con las siglas de "NCDV", o "Nebraska Calf Diarrhea Virus") (28).

Con el hallazgo de rotavirus en humanos se estimuló la búsqueda de virus semejantes en cuadros diarreicos de otras especies animales. Esa búsqueda ha llevado en los últimos años el descubrimiento de rotavirus en una gran variedad de especies, incluyendo cerdos (3), potros (42), venados (43), monos (24), cabras (36) e incluso aves domésticas (22). Tal como se presenta la situación, parece ser que los rotavirus están ampliamente deseminados en la naturaleza, quizás produciendo infecciones en prácticamente todas las especies de vertebrados, al menos en aves y mamíferos.

Todos esos virus animales son morfológica, bioquímica y antigénicamente relacionados con los rotavirus humanos, estando hoy agrupados en el género *Rotavirus* de la familia *Reoviridae*. La antigenicidad cruzada que se ha observado entre rotavirus de diferentes especies parece residir en componentes internos de las partículas virales, mientras que las proteínas más expuestas al exterior parecen poseer los antígenos específicos de especie (27, 35, 48). Más aún, se han descrito diferentes serotipos de rotavirus humanos (53) y probablemente simios (41) y bovinos (39). Es entonces

concebible que puedan existir toda una variedad de subtipos antigénicos entre los muchos rotavirus animales existentes.

Como ya hemos mencionado, y a lo cual volveremos en mas detalla en la próxima sección, los rotavirus humanos son muy difíciles de cultivar *in vitro*, por lo cual la fuente de antígenos para estudios de inmunización y producción de una posible vacuna están muy limitados. Es por eso que algunos autores han centrado sus investigaciones en rotavirus animales, con la esperanza de que ellos constituyan un buen modelo para el estudio del virus humano. En este sentido es interesante mencionar que experimentos preliminares realizados en terneras gnotobióticas, parecen indicar un cierto grado de protección cruzada entre rotavirus bovinos y humanos (47, 49).

BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS ROTAVIRUS

Habiéndose establecido sin lugar a dudas el importante papel etiológico de los rotavirus en gastroenteritis, se hace necesario entonces profundizar los conocimientos sobre este recién descubierto grupo de agentes virales. Son muchas las interrogantes que están planteadas en ese sentido, y nuestro laboratorio decidió explorar algunas de las características moleculares de rotavirus humanos y animales en la seguridad de que los conocimientos obtenidos del estudio básico del virus redundarán en el futuro en mejores medidas de control de la enfermedad.

La información que presentamos a continuación se deriva de experiencias realizadas en nuestro laboratorio en los últimos dos años (10, 13, 32, Gorziglia M, Esparza J: *Purification of structural proteins from cells infected with bovine rotavirus: evidences for a trimeric structure of the major polipeptide of the inner capsid (45K)*. Gorziglia M, Esparza J: *Poly (A) polymerase in human rotavirus*. Urquidi V, Novo E, Esparza J: *Protein synthesis in cell infected with bovine rotavirus*. Enviados a publicación), y reflejan nuestra visión actual del campo. Es indudable que investigaciones futuras corregirán los entuertos y ofrecerán, quizás, una visión mas fiel de la realidad.

Ultraestructura del rotavirión.

La microscopía electrónica, juntamente con la prueba de ELISA (52), es uno de los métodos más frecuentemente utilizados para el diagnóstico de infección por rotavirus. Para eso, la muestra de heces se homogeniza en un buffer apropiado (PBS, por ejemplo), se extrae con triclorotrifluoroetano (Freón 113) y se concentra por ultracentrifugación (100.000 x g x 1 hora). El virus se resuspende en un pequeño volumen de agua bi-

destilada, y se observa con el microscopio electrónico, previa tinción negativa, generalmente utilizando ácido fosfotúngstico (12, 45). Sin embargo, el método de tinción negativa sobre película de carbón, utilizando molibdato de amonio y acetato de uranilo como colorantes, aunque mucho más laborioso, ofrece mejores detalles de la estructura viral (10).

La apariencia general de una preparación típica de rotavirus humanos se muestra en la Fig. 1. Se pueden observar diferentes tipos morfológicos de partículas, todas ellas correspondiendo a rotavirus. Las partículas más abundantes tienen un diámetro de 75 nm, con un borde o perfil claramente definido (Fig. 1 D). Hay otras partículas, de menor tamaño (65 nm de diámetro), con un borde rugoso (Fig. 1 S). Las partículas más grandes son los virus completos, que poseen dos cubiertas proteicas, denominadas

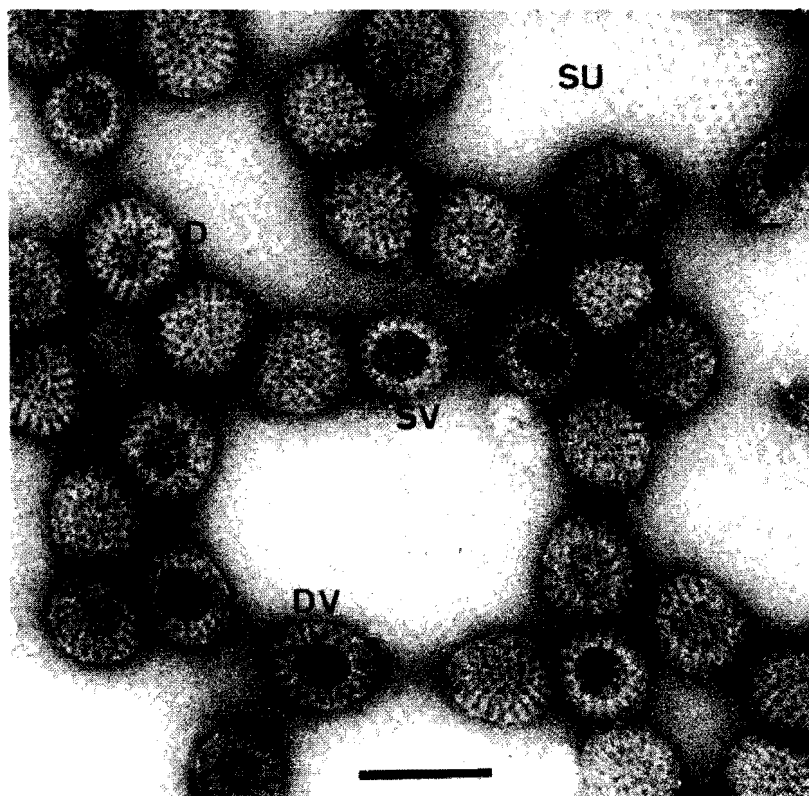


Fig. 1.— Micrografía electrónica de una preparación típica de rotavirus humanos. En ella se muestran partículas de doble cápside (D) y de simple cápside (S), algunas de ellas vacías (DV, SV), es decir, carentes de ácido nucléico viral. También se observan arreglos hexagonales formados por subunidades virales (SU). Barra: 100 nm.

cápsides interna y externa. Las partículas menores son aquellas que han perdido la cápside externa, y probablemente no son infecciosas. En ambos casos pueden observarse partículas con el centro electrón-denso, debido a la penetración del colorante, e indicativo de la ausencia del genoma o ácido nucleico viral. Estas partículas, que denominamos vacías (Fig. 1 DV y SV), naturalmente tampoco son infecciosas.

En las partículas de doble cápside es fácil notar la apariencia de rueda dentada que le dió el nombre a este grupo de virus (Rota, en latín Rueda).

Si se examina con cuidado la estructura superficial del virión (o partícula viral completa) se observa la existencia de un patrón regular en la distribución de cavidades o huecos que son penetrados por el colorante negativo. Ese patrón de huecos resulta del arreglo icosaédrico de subunidades morfológicas que se agrupan en el virión formando una estructura en malla abierta. En ocasiones, y debido a la desintegración de algunos virus en su preparación para la microscopía electrónica, las subunidades morfológicas virales se encuentran formando redes con patrón hexagonal (Fig. 1 SU).

Un gran número de familias virales poseen viriones con estructura icosaédrica. El icosaedro es un sólido geométrico regular que posee 20 caras triangulares equiláteras, 12 vértices y 30 aristas. En general, en cada uno de los 12 vértices de los icosaedros virales, se localiza una unidad morfológica denominada pentón, por encontrarse rodeada de otras cinco unidades morfológicas. El resto de dichas unidades, aquellas que se localizan en las caras o aristas, se denominan hexones, por estar siempre rodeadas de seis unidades morfológicas vecinas.

El caso de los rotavirus difiere del modelo tradicional de los icosaedros virales en el sentido de que las subunidades pentones y hexones están sustituidas por huecos 5- y 6-coordinados, que hacen sus veces. Las subunidades morfológicas, que son las que limitan los huecos 5- y 6-coordinados, son a su vez estructuras 3-coordinadas, esto es, están rodeadas de sólo tres unidades vecinas semejantes.

La Fig. 2 muestra una vista por el eje de rotación 5 de una partícula viral tal como se observa en el microscopio electrónico (Fig. 2A), de su imagen reforzada por rotación (Fig. 2B) y del modelo propuesto para su arquitectura (Fig. 2C). En este modelo proponemos que 320 subunidades morfológicas se agrupan alrededor de 162 huecos en la superficie del virión, con un patrón característico de icosaedros con un número de triangulación (T) igual a 16 (10). Cada una de las subunidades morfológicas, las cuales como ya dijimos son 3-coordinadas, muestran con el

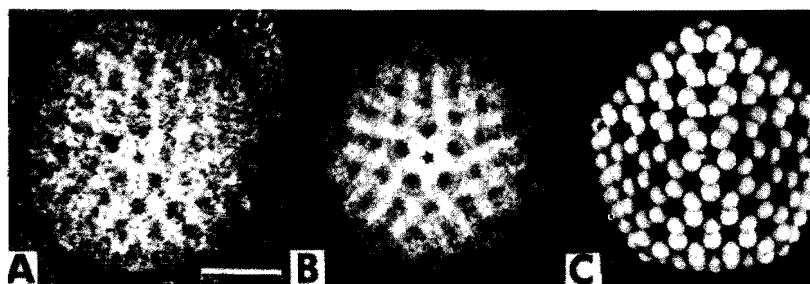


Fig. 2.— Estructura icosaédrica de rotavirus humano, visualizado por el eje de simetría 5. Se muestra una partícula tal como se observa en el microscopio electrónico (A), su imagen reforzada por rotación (B) y el modelo propuesto para su arquitectura (C). Barra: 25 nm. (Adaptada de la referencia 10).

microscopio electrónico una estructura trimérica (Fig. 12, inserto), lo que daría un gran total de 960 unidades estructurales por virión. Como veremos más adelante, este modelo ultraestructural ha conseguido apoyo en resultados obtenidos en el estudio de la bioquímica del virus.

El genoma viral.

En el interior de la cápside se localiza el material genético del virus o genoma viral. Este está formado por ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena segmentado (34), características únicas de virus pertenecientes a la familia *Reoviridae* (18).

El patrón de segmentación del ARN genómico de los rotavirus puede ser fácilmente examinado por electroforesis en geles de poliacrilamida de muestras virales previamente disociadas, y visualizadas después de la corrida, por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta. La Fig. 3 muestra el patrón electroforético obtenido con una preparación de rotavirus humano. El ARN genómico de los rotavirus está formado por once segmentos de doble cadena, con pesos moleculares que van desde 0.2 a 2.2×10^6 daltons (14, 19, 33, 44). Esos segmentos se encuentran en cantidades equimolares, indicando que cada virión posee uno de cada uno de ellos. El patrón de segmentación es real y no artefactual y existen muchas evidencias, obtenidas con otros miembros de la familia *Reoviridae*, indicando que cada segmento funciona como un gen individual y completo (18).

La expresión funcional de cada uno de esos genes ocurre en el momento de la infección de una célula por el virus, y determina las características biológicas del mismo. De manera que una de las metas de nuestro laboratorio ha sido la de investigar la naturaleza de los productos genéticos de cada uno de los segmentos del ARN viral, así como su función.

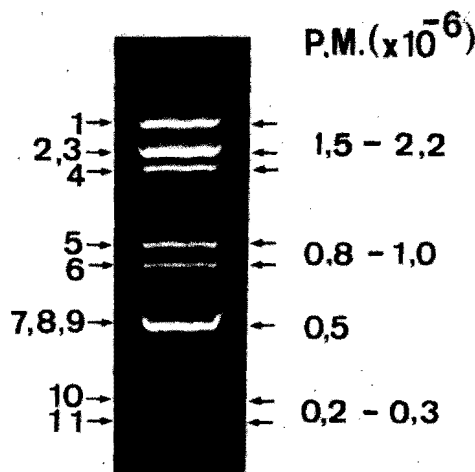


Fig. 3.— Patrón electroforético del ARN genómico de rotavirus humano, visualizado por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta. Se muestran los 11 segmentos genómicos y su peso molecular aproximado.

Multiplicación en cultivos celulares.

Quizás uno de los principales escollos que se han encontrado en el estudio de los rotavirus humanos es su dificultad para obtener su multiplicación eficiente en cultivo de tejidos. De hecho, los rotavirus humanos parecen comportarse en cultivos celulares como virus defectivos, determinando infecciones abortivas. Recientemente hemos podido investigar un poco ese aspecto, mediante la inoculación de células LLC-MK₂, originadas de riñón de mono rhesus, con rotavirus humanos (13). Dichos virus fueron capaces de iniciar la infección cuando fueron pretratados con 100 μ g/ml de tripsina, centrifugados (1200 x g x 30 min) sobre la monocapa celular y mantenidos en un medio conteniendo 10 μ g/ml de tripsina. El mecanismo de acción de la tripsina en este sistema no se conoce, pero por analogía con otros virus (tales como los paramixovirus) se podría suponer que determina el clivaje de alguna proteína estructural, con la aparición de polipéptidos de menor peso molecular con capacidad para reconocer receptores específicos en la superficie de la célula. La centrifugación, por otra parte, podría actuar modificando estructuras en la membrana celular, que la harían más apta para la adsorción y/o penetración de la partícula viral.

La habilidad de los rotavirus humanos para multiplicarse en los cultivos celulares se estudió por observación directa del virus por microscopía electrónica, por marcaje radioactivo con Uridina-H³ del virus neo-sintetizado y, principalmente, por examen ultraestructural de cortes finos de células

infectadas. Se observó que no todas las células examinadas presentaban evidencias de infección viral, sino que, dependiendo de los especímenes virales utilizados, tan sólo entre el 5 y el 60% de las células eran afectadas. Eso explicaría el hecho de que dicha infección no determina la aparición de efecto citopático evidente con el microscopio de luz.

Sin embargo, al examinar las células infectadas se observaron una variedad de tipos de partículas, siendo muy abundantes estructuras incompletas, carentes de ácido nucleico, frecuentemente agrupadas dentro de estructuras vesiculares (Fig. 4A). La presencia de esas partículas aberrantes o incompletas parece representar una manifestación de la defectividad de estos rotavirus humanos, y puede explicar las dificultades que se han encontrado para lograr su pasaje seriado *in vitro*. Es interesante mencionar aquí que tuvimos además la oportunidad de estudiar con el microscopio electrónico biopsias duodenales de uno de los pacientes de donde se obtuvieron rotavirus para los estudios *in vitro*. En contraste con lo que ocurre en cultivos celulares, las células de la mucosa duodenal presentaban evidencias de infección viral normal, sin acúmulo de partículas defectivas. De manera pues, que la defectividad *in vitro* de dicho especimen viral no es una característica del virus mismo, sino un fenómeno relacionado con la célula huésped. Es posible, y existen algunas evidencias que así lo indican (50), que tras un proceso de selección o adaptación pueda lograrse la multiplicación eficiente de cepas de rotavirus humano en cultivos celulares.

En general, el mismo tipo de problemas se ha observado al intentar el cultivo *in vitro* de rotavirus de otras especies animales. Sin embargo, hay algunas cepas de rotavirus animales que han sido adaptadas para su multiplicación de cultivos celulares. La cepa de rotavirus bovino obtenida por el profesor Mebus, en Nebraska (28), es una de las más conocidas. Este virus es capaz de multiplicarse en varias líneas celulares, donde determina una infección productiva, con aparición de efecto citopático evidente. De nuevo, la presencia de tripsina en el inóculo es un requisito indispensable para obtener el pasaje seriado del virus, al menos en algunas líneas celulares.

La Fig. 4B es una micrografía electrónica que muestra algunas características ultraestructurales de la multiplicación del rotavirus bovino en células LLC-MK₂. Puede notarse la presencia de una "fábrica viral", que es donde coalescen el ARN genómico y algunas de las proteínas virales estructurales para iniciar la morfogénesis del virus. Esas partículas parecen gemar de dichas "fábricas" para caer en vesículas constituidas por dilataciones del retículo endoplásmico rugoso, que es donde se completa la morfogénesis viral. Pueden notarse en esas vesículas la presencia de algunas

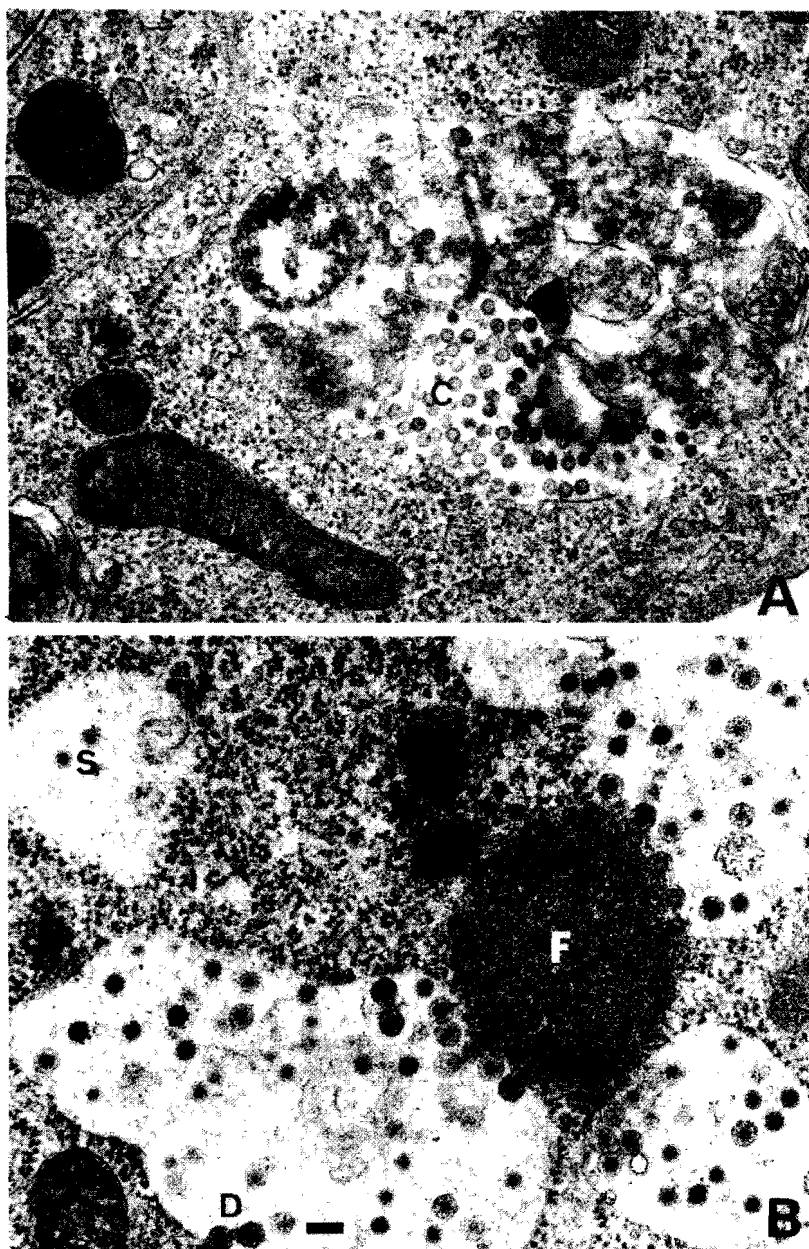


Fig. 4.— Micrografías electrónicas de células de riñón de mono (LLC-MK₂) infectadas con rotavirus humanos (A) o bovinos (B). Se muestran partículas de simple cápside (S), de doble cápside (D) y "cores" (C) muy abundantes estos últimos en el caso de rotavirus humanos; también puede observarse una "fábrica" viral (F). Barra: 100 nm.

partículas de simple cápside, probablemente en un paso previo a la adquisición de la cápside externa y formación del virión maduro, con su doble cápside. Sin embargo, la secuencia morfogenética del virus permanece por ser establecida en forma definitiva, con estudios ultraestructurales y bioquímicos más detallados.

Síntesis de proteínas virales.

Debido a las dificultades encontradas para cultivar rotavirus humano *in vitro*, y a la relativa facilidad con que eso puede hacerse con rotavirus bovino, decidimos profundizar nuestros estudios de replicación viral con éste último (Urquidí V, y cols.: *Protein synthesis in cell infected with bovine rotavirus*. Enviado a publicación). Las similitudes morfológicas y bioquímicas entre ambos rotavirus sugiere que la cepa bovina constituye un buen modelo para el mejor entendimiento del virus humano.

El virus bovino multiplica en células LLC-MK₂ muy eficientemente, con un aumento exponencial del virus infeccioso entre 5 y 8 horas después de la infección, alcanzando entonces un plateau (Fig. 5, panel superior). La síntesis de proteínas en los cultivos infectados fue estudiada por marcaje radioactivo con Leucina-H³. Después de la infección ocurre una disminución neta en dicha síntesis, indicativa de una inhibición ejercida por el virus en la síntesis de proteínas celulares.

Las proteínas sintetizadas a diferentes horas después de la infección fueron entonces estudiadas por electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio. Para esto, las proteínas intracelulares fueron disociadas, corridas en el gel, y detectadas por fluorografía sobre placas de rayos X (4). El patrón de polipéptidos de las células infectadas fue modificado por la infección viral (Fig. 5, panel inferior). Los polipéptidos sintetizados por el virus fueron claramente definidos después de las 8 horas de infección, identificándose al menos ocho polipéptidos virales. La evidencia para la especificidad viral de dichos polipéptidos se basa en la comparación con aquellos sintetizados en las células no infectadas, tanto en su migración electroforética como en su rata de síntesis.

Los pesos moleculares de los polipéptidos inducidos por el virus se estimaron por comparación con la movilidad electroforética de proteínas estandard, encontrándose en el rango de 29.000 hasta 102.000 daltons (el peso molecular es utilizado de ahora en adelante para identificar cada polipéptido viral. Ej: 29.000 = p29K).

Experimentos de pulso y persecución han demostrado la ausencia de modificaciones importantes post-traduccionales, tales como procesamiento

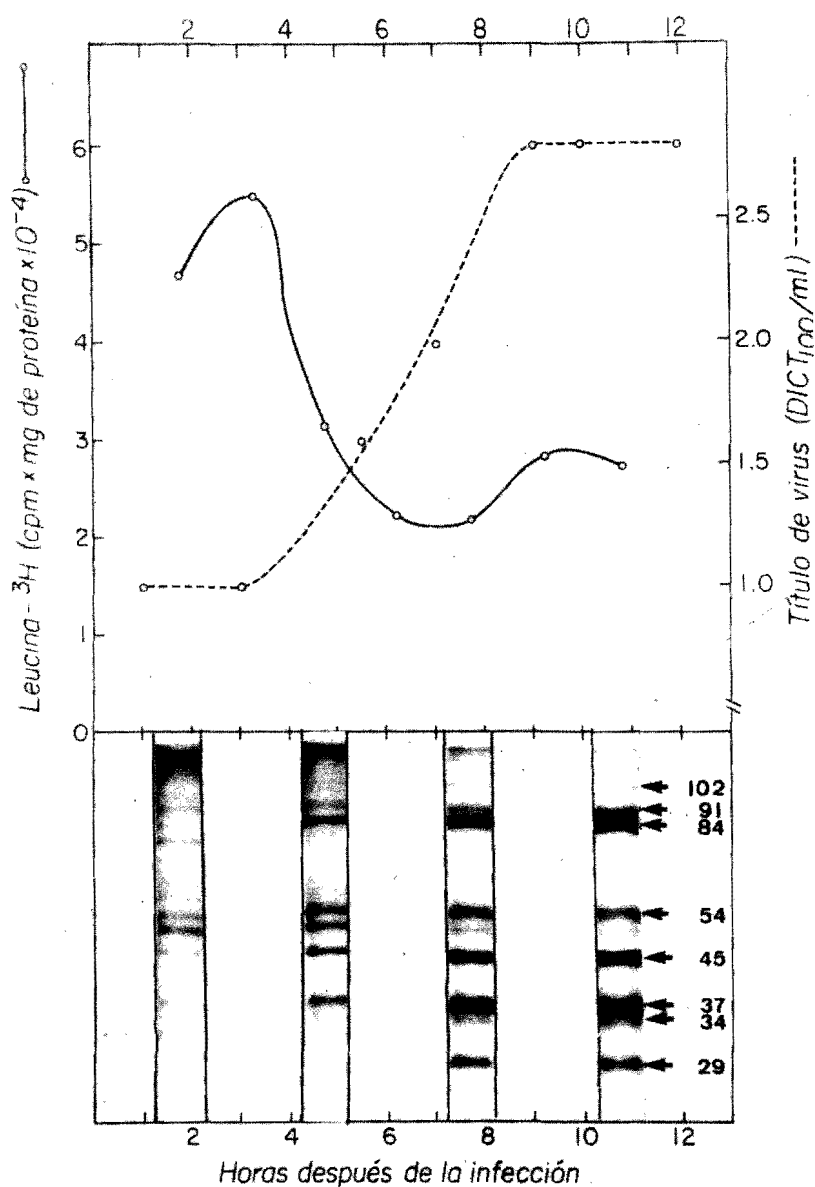


Fig. 5.— Síntesis de proteínas en células LLC-MK₂ infectadas en rotavirus bovino. Panel superior: Curva de crecimiento (.....) e incorporación de Leucina- H^3 (—) a diferentes horas después de la infección. Panel inferior: Electroforesis en gels de poliacrilamida de los polipéptidos sintetizados a diferentes horas después de la infección.

proteolítico, de los polipéptidos virales. Es así como entonces se hace posible comparar los pesos moleculares de cada polipéptido con los pesos moleculares de cada uno de los segmentos del ARN viral. La Tabla I muestra una clara correspondencia entre el tamaño de los polipéptidos teóricos codificables por cada uno de los segmentos de ARN genómico, y al menos 6 de los 8 polipéptidos virales detectados (los otros dos polipéptidos parecen ser glicosilados, lo que resultaría en una movilidad electroforética anormal).

TABLA I

CONCORDANCIA ENTRE EL TAMAÑO DE LOS SEGMENTOS
DE ARN GENOMICO Y EL DE LOS POLIPEPTIDOS SINTETIZADOS
POR ROTAVIRUS

Segmento	P.M. del producto genético ($\times 10^{-3}$)		
	P.M. ($\times 10^{-6}$)	Estimado ^{a)}	Observado
1	2.20	122	---
2	1.85	103	102
3	1.70	94	91
4	1.55	86	84
5	1.00	55	54
6	0.85	47	45
7	0.51	28	37
8	0.51	28	34
9	0.51	28	29
10	0.26	14	---
11	0.20	11	---

a) El peso molecular del polipéptido que teóricamente puede ser codificado por cada segmento, se calcula dividiendo por 18 el peso molecular de cada segmento de ARN de doble cadena.

Esa concordancia sugiere que cada uno de los polipéptidos virales está codificado por ARN mensajeros transcritos de fragmentos genómicos completos. En la actualidad estamos iniciando experimentos de síntesis de proteínas *in vitro*, utilizando extractos de germen de trigo, para corroborar la identificación del producto de traducción de cada segmento del genoma.

Polipéptidos virales estructurales.

En general, las proteínas codificadas por los virus pueden subdividirse en dos grupos: Las estructurales, que son aquellas que van a formar parte del virión, y las no estructurales, que generalmente cumplen funciones enzimáticas y/o de regulación.

Luego de haber identificado al menos 8 polipéptidos codificados por el virus, se consideró importante identificar cuáles de ellos estaban destinados a formar parte de la estructura del virión. Para ello se marcó radioactivamente el virus con Leucina- H^3 , la cual estaba presente en el medio de cultivo durante la multiplicación viral. A continuación, el virus producido fue purificado por extracción con Freón-113, sedimentación a través de un colchón de sacarosa al 45%, y finalmente por centrifugación isopícnica en Cloruro de Cesio (CICs.).

Este último paso separa a las partículas virales en base a su densidad de flotación, la cual es un reflejo de la proporción de ácido nucleico y proteínas presentes en dichas partículas.

La Fig. 6 muestra una separación típica de rotavirus en CICs. Se notan dos picos bien definidos, ubicados en las densidades de 1.36 y 1.38 g/ml.

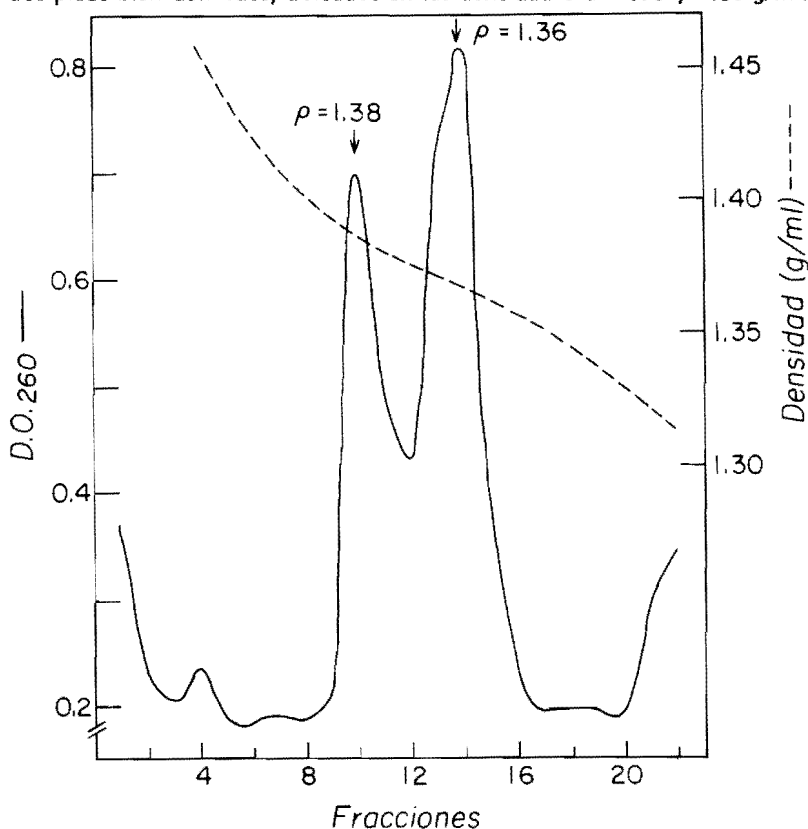


Fig. 6.— Gradiente isopícnico en Cloruro de Cesio, para la separación de rotavirus de simple (ρ :1.38 g/ml) y de doble ($\rho = 1.36$ g/ml) cápside.

El pico menos denso (1.36 g/ml) corresponde a rotavirus de doble cápside (Fig. 7A), mientras que el más denso (1.38 g/ml) corresponde a partículas de simple cápside, o sea a aquellas que han perdido (o que no han adquirido) la cápside externa (Fig. 7B). Las partículas de simple cápside tienen un diámetro de 65 nm, mientras que los viriones completos miden 72 nm. Un hecho interesante es que los viriones bovinos de doble cápside no presentan el perfil externo tan perfectamente definido como sucede con los rotavirus humanos.

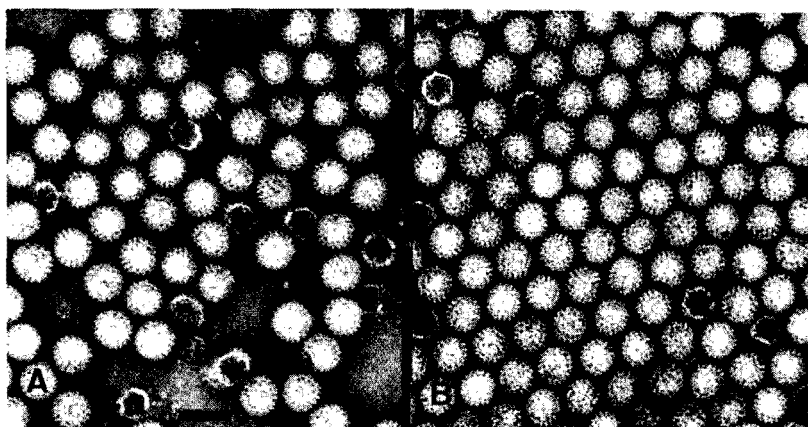


Fig. 7.— Micrográficas electrónicas de partículas de rotavirus bovino con doble (A) y simple (B) cápside, después de su purificación por centrifugación isopícnica.

Las proteínas presentes de los virus purificados fueron entonces analizadas en geles de poliacrilamida. La Fig. 8 muestra los resultados. Seis de los ocho polipéptidos codificados por el virus se encuentran formando parte del virus de doble cápside (Fig. 8B) (Los polipéptidos 102K y 34K se encuentran en una proporción muy baja, por lo cual son difíciles de visualizar en la fotografía). Las partículas de simple cápside (Fig. 8C) sólo poseen tres de los seis polipéptidos estructurales (*Novo E, Esparza J: Composition and topography of structural polypeptides of bovine rotavirus. Enviado a publicación*).

De manera pues, que eso nos indica que hemos identificado dos polipéptidos no estructurales (54K y 29K), tres estructurales presentes en la cápside interna (102K, 91K y 45K) y tres propios de la cápside externa (84K, 37K y 34K). Se ha reportado además que dos de los polipéptidos de la cápside externa (probablemente los correspondientes a p37K y p34K) son glicosilados (?).

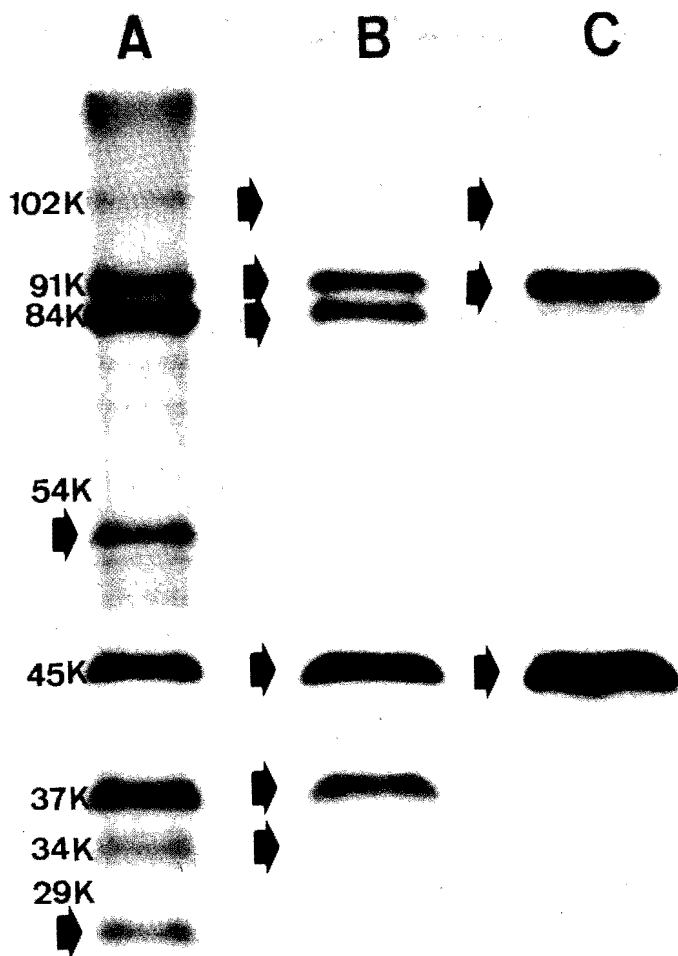


Fig. 8.— Electroforesis en geles de poliacrilamida de los polipéptidos totales sintetizados en células infectadas con rotavirus bovinos (A), y de los polipéptidos estructurales presentes en partículas de doble (B) y de simple (C) cápside.

Topografía de los polipéptidos estructurales.

Una vez establecidas las especies polipéptidas presentes en el virión, quisimos conocer con más detalle su localización dentro de la partícula viral. Los estudios de topografía de polipéptidos virales estructurales se basan en: (a) Determinación de la arquitectura del virión por microscopía electrónica y/o difracción de rayos X, (b) Determinación de la estequiometría de cada uno de los polipéptidos estructurales, (c) Grado de exposición de cada polipéptido al exterior de la partícula y (d) Relaciones de

vecindad de polipéptidos entre sí, y de polipéptidos con el ácido nucleico genómico.

Los resultados que hemos obtenido hasta ahora nos permiten tener una idea bastante aproximada de la topografía polipeptídica de las partículas de simple cápside. Sin embargo, los resultados no son tan claros en referencia a las partículas de doble cápside, por lo cual los mismos deben ser considerados provisionales.

El polipéptido más abundante de la cápside interna es p45K, el cual representa cerca del 80% de las proteínas totales presentes en partículas de simple cápside. Los otros dos polipéptidos de cápside interna, p91K y p102K, se encuentran en una proporción de 21% y 1%, respectivamente. Al calcular las relaciones molares de cada especie polipeptídica, y relacionarlas al total de proteínas en las partículas de simple cápside (estimado en $\sim 60 \times 10^6$ daltons), se llegan a las siguientes cifras de número de moléculas por virión: 1071 de p45K, 170 de p91K y 8 de p102K (*Novo E, Esparza J: Composition and topography of structural polypeptides of bovine rotavirus. Enviado a publicación*). Con el conocimiento que se tiene de la arquitectura del virión, obtenido por microscopía electrónica, esos números reales se ajustan a los números teóricos que sugieren la existencia de 960 moléculas de p45K, 162 de p91K y cerca de 12 para p102K.

Siendo p45K la especie más abundante, ésta debe formar parte de las estructuras morfológicas más frecuentes: es así como ellas deben corresponder a las 320 subunidades morfológicas triméricas detectadas en el virión, para dar un gran total de 960 unidades estructurales (*Novo E, Esparza J: Composition... enviado a publicación*). Una predicción de esa suposición es que el polipéptido p45K, en su forma nativa, se comporte como un trímero. Como veremos más tarde, esa predicción pudo ser demostrada.

El número de moléculas de p91K presentes, sugiere que ellas deben estar localizadas a nivel de cada uno de los 162 huecos que son limitados por las 320 subunidades morfológicas del virión. La proteína 102K, que se encuentra en cantidades muy pequeñas en el virión, no debe tener una función estructural muy importante, y posiblemente, como veremos mas adelante, pudiese tener una función enzimática. Debido a que se ha reportado que los ARN mensajeros de los reovirus salen de la partícula por cada uno de los doce vértices del icosaedro viral (1), sería lógico pensar que polipéptidos responsables de la actividad de polimerasa del ARN deben estar localizados en esa vecindad. La figura 9 muestra un esquema de nuestra idea actual sobre la organización de los polipéptidos en el virión.

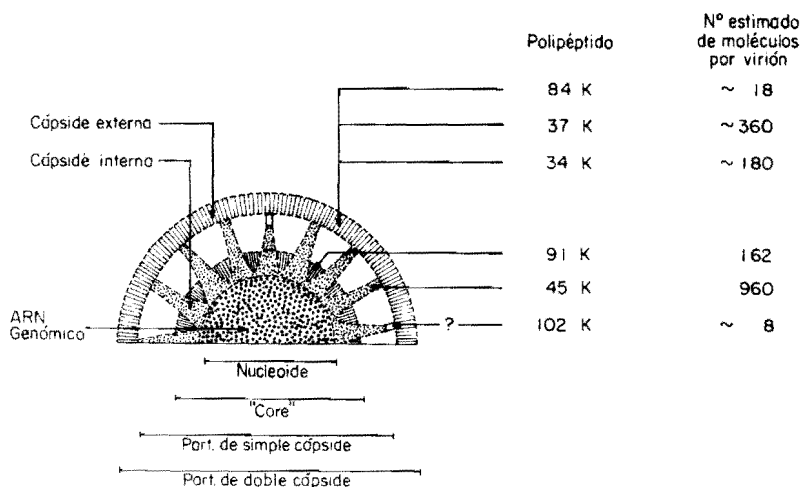


Fig. 9.— Esquema de un modelo estructural de rotavirus y de la topografía de sus polipéptidos estructurales (Basado en las referencias 10 y 12).

Algunos detalles adicionales para el modelo se han obtenido de experimentos diseñados para determinar el grado de exposición de los polipéptidos al exterior del virión (*Novo E, Esparza J: Composition... enviado a publicación*). En dichos experimentos, el grado de exposición se determina por la accesibilidad de los polipéptidos presentes en el virión a la radioiodinación catalizada por la lactoperoxidasa (25, 26), de manera que cuanto más expuesto el polipéptido, mayor cantidad de I^{125} incorpora. Luego de la iodinación, el virus se disocia y se analiza en geles de poliácridamida, comparando las cantidades relativas de cada proteína y la cantidad de I^{125} que captó.

Naturalmente, cuando se iodina virus de doble cápside, son las proteínas de cápside externa las que más I^{125} captan, aunque ha sido difícil determinar con exactitud la proporción de iodinación de cada una de ellas. Resultados interesantes se obtienen al iodinar partículas de simple cápside (Fig. 10). A pesar de que p45K es el polipéptido más abundante, su grado de exposición es limitado, probablemente debido a que gran parte de su superficie está protegida por especies semejantes (como sería el caso de un trímero) o por otras especies, tales como p91K, que es el polipéptido más expuesto. El polipéptido 102K, que no es accesible a iodinación en partículas de doble cápside, se hace accesible al remover la cápside externa, una característica, que como veremos más tarde, es de interés para tratar de entender su función.

En la actualidad realizamos experimentos de entrecruzamiento de polipéptidos, utilizando agentes bifuncionales tales como el dimetilsuberimido, y de entrecruzamiento con ARN utilizando formaldehído y luz

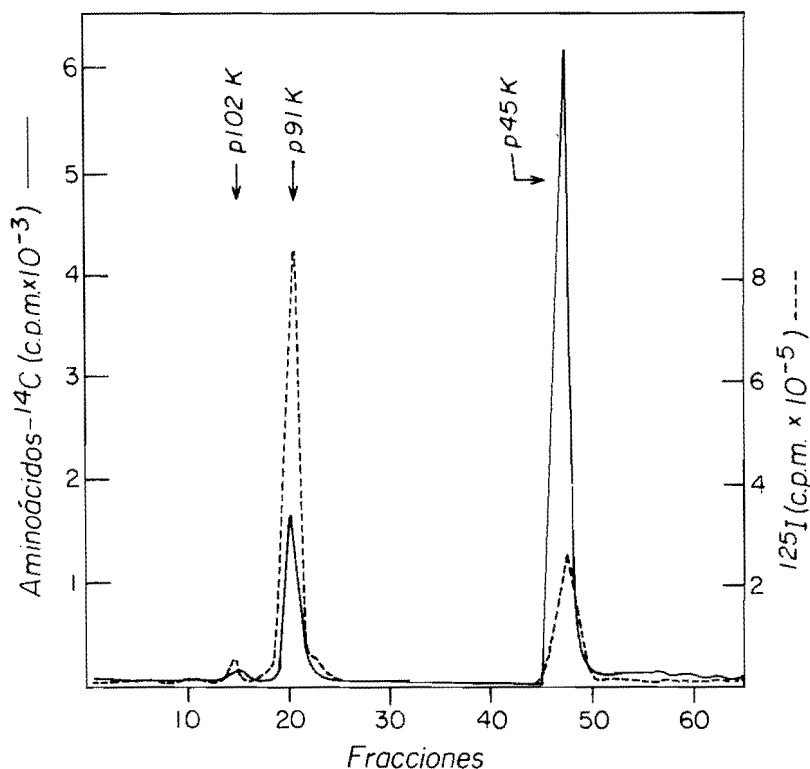


Fig. 10.— Determinación por radioiodinación del grado de exposición de los polipéptidos virales estructurales en partículas de simple cápside. La cantidad total de cada polipéptido se estima en base a la radioactividad debida al C^{14} , mientras que el grado de exposición se refleja en la captación de I^{125} .

ultravioleta, para tratar de entender mejor las relaciones de vecindad de cada uno de los componentes estructurales del virión.

Enzimas asociadas al virión.

En los reovirus, prototipos de la familia *Reoviridae*, se han identificado una variedad de enzimas asociadas al virión, todas ellas involucradas en la síntesis o procesamiento de los ácidos nucleicos virales (29, 37, 38). Las más estudiadas de esas enzimas es una polimerasa de ARN, la cual cataliza la síntesis de ARN mensajeros virales transcritos de una de las cadenas de cada segmento del genoma viral.

Como era de esperar, recientemente se describió la presencia de dicha enzima en rotavirus bovinos (6) y humanos (17). La enzima sólo se activa al remover la cápside externa (7), lo cual indica que son los polipéptidos

de cápside interna los responsables de dicha actividad. Es interesante recordar aquí que p102K es el único polipéptido no expuesto a iodación en partículas de doble cápside, y que su exposición es paralela a la activación de la enzima. Además, como ya mencionamos, su estequimetría sugiere una función más enzimática que estructural.

La polimerasa del ARN de los rotavirus posee condiciones óptimas semejantes a las de los reovirus (incubación a 45°C a pH 8, en la presencia de iones magnesio a una concentración de 10mM), pero a diferencia de éstos, la activación de la enzima no ocurre por digestión quimotríptica del virión, sino más bien por quelación del calcio, que también resulta en la remoción de su cápside externa (7).

Otra actividad enzimática que hemos detectado recientemente (Gorziglia M, Esparza J: *Poly (A) polymerase in human rotavirus*. Enviado a publicación), asociada a rotavirus humano es una polimerasa de Poli-A (o sintetasa de oligoadenilatos), la cual también había sido descrita en reovirus (40). A diferencia de la polimerasa del ARN, esta actividad enzimática se encuentra asociada sólo a partículas de doble cápside, indicando que alguno(s) de los polipéptidos de cápside externa es, al menos parcialmente, responsable de esa actividad. Dicha reacción tiene un requerimiento de Mn^{++} y su producto (identificado por filtración en gel y cromatografía en DEAE-celulosa) son oligonucleótidos de adenosina. La función de dicha enzima y de su producto en la replicación viral no está bien entendida. Sin embargo, puede especularse que en realidad, la actividad de sintetasa de oligoadenilatos no es más que una actividad alterna de la polimerasa del ARN (40).

Purificación de proteínas nativas.

Una de las metas deseables para el estudio y caracterización de proteínas virales es su aislamiento y purificación en estado nativo, es decir, sin que su estructura haya sido alterada por dodecil sulfato de sodio u otro agente denaturalizante. Las proteínas nativas conservan más fielmente las propiedades bioquímicas y antigénicas de los componentes virales.

Para el aislamiento de proteínas nativas se parte generalmente de aquellas especies que permanecen solubles, en extractos de células infectadas, después de ultracentrifugación a 100.000 xg por una hora. En los rotavirus, todos los polipéptidos virales pueden encontrarse en ese citosol, lo cual nos permitiría intentar la purificación de cada uno de ellos.

Uno de los esquemas de purificación recientemente empleado por nosotros (Gorziglia M, Esparza J: *Purification of structural proteins...* envia-

do a publicación), utilizó cromatografía de afinidad en Sepharosa - Concanavalina A. La fracción no adsorbida, cuando se analizó en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, demostró la presencia de los polipéptidos 84K, 45K y 37K. Cada uno de esos polipéptidos pudieron entonces ser separados por cromatografía en DEAE-celulosa, eluyendo con un gradiente de KCl con una concentración de 0 a 0.5 M (31). La Fig. 11 muestra el perfil de elución (panel superior) y la especie polipéptidica presente en cada pico, analizada en geles de poliacrilamida (panel inferior). Recordamos aquí que p84K y p37K son los componentes más abundantes

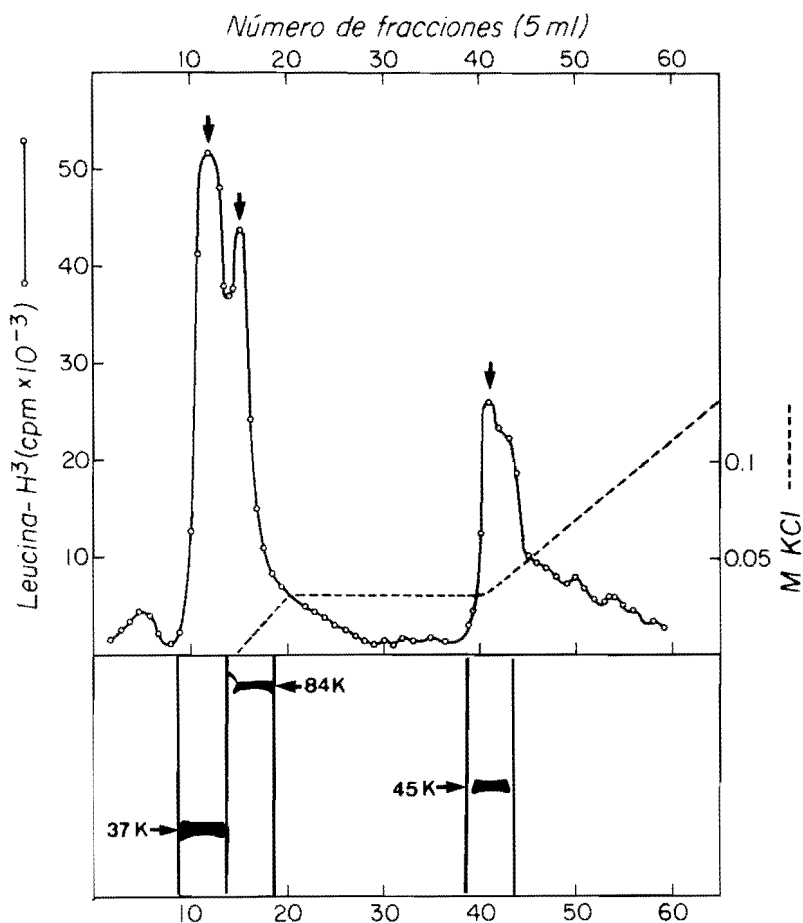


Fig. 11.— Purificación de proteínas nativas a partir de células infectadas con rotavirus bovinos. Perfil de elución de polipéptidos virales en una columna de DEAE-celulosa (panel superior) y electroforesis en geles de poliacrilamida de algunas fracciones seleccionadas (panel inferior).

de la cápside externa y que p45K es el más abundante en la cápside interna. Ya mencionamos que, por consideraciones ultraestructurales y estequiométricas, el polipéptido 45K en su forma nativa debería poseer una configuración trimérica. Eso fué confirmado por sedimentación en gradientes de sacarosa, donde el polipéptido 45K nativo demostró poseer un coeficiente de sedimentación cercano a 7.3 (*Gorziglia M, Esparza J: Purification... enviado a publicación*), correspondiente a un peso molecular aproximado de 150K en proteínas globulares a indicativo de la existencia del complejo 45K x 3.

La Fig. 12 muestra los resultados, conjuntamente con una micrografía electrónica de las estructuras triméricas detectadas en cristales formados

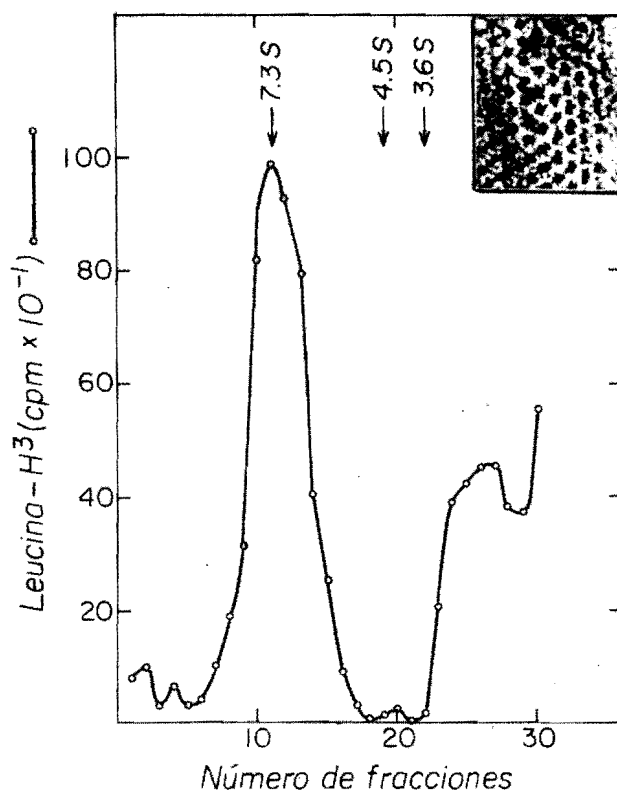


Fig. 12.— Determinación del coeficiente de sedimentación de la proteína 45K nativa, utilizando ultracentrifugación en gradientes isoquinéticos de sacarosa. Las proteínas marcadoras fueron Aldolasa (7.3S), Albúmina (4.5S) y Ovalbúmina (3.6S). La micrografía electrónica insertada muestra las estructuras triméricas posiblemente formadas por el polipéptido 45K (Adaptado de la referencia 10).

por la desintegración del virus durante su preparación para el microscopio electrónico. Dichos resultados fueron también corroborados por filtración en geles de Sephadex G-200.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO.

Es indudable que un mejor conocimiento del agente etiológico más frecuentemente asociado a gastroenteritis nos permitirá enfoques más originales y efectivos para el control de la enfermedad. Afortunadamente, el desarrollo de los métodos de hidratación oral nos va a dar el tiempo necesario para el diseño de dichas estrategias.

La única medida efectiva que contribuiría a disminuir la frecuencia de gastroenteritis por rotavirus sería el desarrollo de una vacuna. Para esto es necesario resolver primero muchas de las interrogantes planteadas: (a) Hay que determinar el grado de variabilidad antigénica en los rotavirus humanos, definir con exactitud la existencia de serotipos y el grado de protección cruzada entre ellos. (b) Debe determinarse el papel protector de la inmunidad humoral y/o local en infecciones por rotavirus, para lo cual sería de gran utilidad el desarrollo de modelos animales que contribuirán además a entender mejor la patogénesis de la enfermedad. (c) Deben definirse los mecanismos de transmisión del virus en la naturaleza y de su circulación en la comunidad. (d) Es importante implementar la tecnología necesaria para producir grandes cantidades de antígenos virales a ser utilizados como inmunógenos.

Muchos de esos aspectos están siendo estudiados en varios laboratorios, siguiendo diferentes metodologías e hipótesis de trabajo. Entre tantos enfoques, el molecular puede aportar valiosa información. Por ejemplo, el problema encontrado para obtener eficiente multiplicación de rotavirus humanos *in vitro* puede ser enfrentado a través de manejo genético con la producción de virus híbridos, bovino-humano, generados por reacomodamiento de segmentos del genoma viral. La meta sería obtener en el laboratorio un híbrido que, conservando la capacidad del virus bovino para multiplicarse en cultivos celulares, haya adquirido los genes que codifican los polipéptidos de la cápside externa, que son los que le darían características inmunogénicas de virus humano. Para ello sería importante conocer el producto de traducción de cada uno de los once segmentos del ARN genómico viral, y la función que desempeñan.

Ese último aspecto está siendo estudiado en nuestro laboratorio, donde hemos logrado producir anticuerpos contra cada uno de los polipéptidos virales estructurales, los cuales están siendo utilizados para inhibir funciones específicas del virus (tales como hemaglutinación, infectividad y actividades enzimáticas) y en esa forma conocer su función.

Una caracterización inmunoquímica de los polipéptidos de cápside externa, preferiblemente aquellos obtenidos en forma nativa, podrá aportar conocimientos importantes sobre variabilidad antigénica en rotavirus. El estudio de las modificaciones de dichos polipéptidos por la acción de la tripsina, también permitirá conocer mejor los pasos iniciales de la infección viral y el diseño de mejores métodos de cultivo.

La caracterización de funciones enzimáticas en los rotavirus, particularmente la actividad de polimerasa del ARN, ofrece también una posibilidad para el control de dicha infección. La quimioterapia antiviral, campo todavía muy poco evolucionado, se basa en la posibilidad de interferir en pasos metabólicos propios del virus y ausentes en la célula huésped. Desgraciadamente, y debido a la estrecha relación entre el metabolismo celular y la replicación viral, esos pasos metabólicos exclusivos del virus son relativamente raros. Una situación excepcional se presenta con la polimerasa del ARN de los rotavirus, la cual transcribe mensajeros de un molde de ARN de doble cadena, a diferencia de las polimerasas del ARN celulares, que lo hacen de ADN de doble cadena. Es así como se hace razonable iniciar una búsqueda de inhibidores específicos de dicha polimerasa viral. Entre las posibles drogas a ensayar, los derivados de la rifamicina parecen ser los candidatos ideales. Las rifamicinas son potentes inhibidores de la polimerasa del ARN bacteriano, con muy poco efecto sobre las enzimas de eucariotes. Sin embargo, existen cientos de derivados químicos de la rifamicina cuya especificidad inhibitoria es diferente, habiéndose incluso descrito algunas con actividad contra la transcriptasa reversa de oncornavirus (16, 51). En nuestro laboratorio se adelantan experimentos en este sentido.

Finalmente, no puede dejarse a un lado las posibilidades que ofrecen los métodos modernos de ingeniería genética, mediante los cuales, una vez identificado el gen que codifica el polipéptido responsable de la neutralización de la infectividad del virus, éste pueda ser clonado en bacterias y que inmunógenos apropiados puedan ser producidos en forma abundante y económica en esos sistemas.

Sólo esperemos que ni la imaginación de los científicos, ni la comprensión y activa colaboración de la comunidad que los rodea, se queden pequeños ante el tremendo reto que nos ofrecen los millones de muertes que todos los años causa la gastroenteritis en el mundo.

Agradecimiento

Deseamos agradecer la excelente colaboración técnica prestada por Carmen I. Piña, Aleida Sánchez de Camacho, Yolanda de Aranguren y Mirta de Romano, así como la ayuda secretarial de Isabel Gozaine.

ABSTRACT

Rotavirus and Gastroenteritis. A new Approach to an old problem. *Esparza J, Gil F, Gorziglia M, Novo E, Urquidi V. (Laboratorio de Biología de Virus, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 1827, Caracas 1010A, Venezuela) Invest Clín 21(2):108-137, 1980.*— Gastroenteritis is a major public health problem around the world, not only for the number of deaths it causes, but also for the physical and mental sequelae it produces in the chronically affected individuals, mainly in the underdeveloped countries. Several important advances have occurred in the last few years in the understanding of the etiopathogenesis of acute diarrhea, which make us to look, the future with optimism. In the first place, an oral therapy for rehydration has been developed, which is safe and effective for diarrheas of viral and bacterial etiology. On the other hand, the identification of new etiological agents will allow us to design new methods for the control of acute diarrhea, including the development of specific vaccines. Among the most recently discovered enteropathogens, Rotaviruses have emerged as a major cause of gastroenteritis. Rotaviruses are complex viruses, with a double-stranded RNA genome, composed of eleven segments which are surrounded by two protein shells. The identification of the outer shell polypeptides, and of their role on the neutralization of virus infectivity, will be important for the better design of immunogens. The information obtained from the study of the molecular biology of Rotaviruses will allow us to have more imaginative approaches to the problem of viral diarrheas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— BARTLETT NM, GILLIES SC, BULLIVANT S, BELLAMY AR: Electron microscopy study of reovirus reaction cores. *J Virol* 14: 315-326, 1974.
- 2— BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281-1283, 1973.
- 3— BOHL EH: Rotaviral diarrhea in pigs: brief review. *J Am Vet Med Ass* 174: 613-615, 1979.
- 4— BONNER WW, LASKEY RA: A film detection method for tritium labeled proteins and nucleic acids in polyacrilamide gels. *Eur J Biochem* 46: 83-88, 1974.
- 5— CAUL EO, PAVER WK, CLARKE SKR: Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis. *Lancet* 1: 1192, 1975.

- 6- COHEN J: Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen Virol* 36: 395-402, 1977.
- 7- COHEN J, LAPORTE J, CHARPILIENCE A, SHERRER R: Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol* 60: 177-186, 1979.
- 8- DAVIDSON GP, BISHOP RF, TOWNLEY RRW, HOLMES IH, RUCK BJ: Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1: 242-245, 1975.
- 9- DRACHMAN RH: Acute infections gastroenteritis. *Pediat Clin N Amer* 21: 711-736, 1974.
- 10- ESPARZA J, GIL F: A study on the ultraestructure of human rotavirus. *Virology* 91: 141-150, 1978.
- 11- ESPARZA J, VIERA DE TORRES B: Avances recientes sobre la etiología viral de la gastroenteritis. *Acta Médica Venez* 26: 110-121, 1979.
- 12- ESPARZA J, VIERA DE TORRES B, PIÑERO A, CARMONA O, MAZZALI DE ILJA R: Rotaviruses in Venezuelan children with gastroenteritis. *Amer J Trop Med Hyg* 26: 148-151, 1977.
- 13- ESPARZA J, GORZIGLIA M, GIL F, ROMER H: Multiplication of human rotavirus in cultured cells: an electron microscopic study. *J Gen Virol* 47: 461-472, 1980.
- 14- ESPEJO R, MUÑOZ O, SERAFIN F, ROMERO P: Shift in the prevalent human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences. *Infect Immun* 27: 351-354, 1980.
- 15- GARY GW, HIERHOLZER JC, BLACK RE: Characteristics of non-cultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants: A new subgroup of human adenoviruses. *J Clin Microbiol* 10: 96-103, 1979.
- 16- GURGO C, RAY R, GREEN M: Rifamicin derivatives strongly inhibiting RNA $\rightarrow$ DNA polymerase (reverse transcriptase of murine sarcoma viruses. *J Nat Cancer Inst* 49: 61-79, 1972.
- 17- HRUSKA JF, NOTTER MFD, MENEGUS MA, STEINHOFF MC: RNA polymerase associated with human rotavirus in diarrhea stools. *J Virol* 20: 544-546, 1978.
- 18- JOKLIK WK: Reproduction of reoviridae. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 2. Fraenkel Conrat and Wagner, Ed., p.p. 231-334. Plenum Press, New York, 1974.

- 19- KALICA AR, SERENO MM, WYATT RG, MEBUS CA, CHANOCK RM, KAPIKIAN AZ: Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA. *Virology* 87: 247-255, 1978.
- 20- KAPIKIAN AZ, WYATT RG, DOLIN P, THORNHILL TS, KALICA AR, CHANOCK RM: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075-1081, 1972.
- 21- KRAFT LM: Epizootic diarrhea of infant mice and lethal intestinal infection of infant mice. In: *Viruses of Laboratory Rodent*. National Cancer Institute Monograph N° 20, Bethesda, 1966.
- 22- McNULTY MS, ALLAN GM, TODD D, McFERRAN JB: Isolation and cell culture propagation of rotaviruses from turkeys and chickens. *Arch Virol* 61: 13-21, 1979.
- 23- MADELEY, CR: Comparison of the features of astroviruses and caliciviruses seen in samples of faeces by electron microscopy. *J Infect Dis* 139: 519-523, 1979.
- 24- MALHERBE HH, STRICKLAND-CHOLMLEY M: Simian virus SA 11 and the related O agent. *Arch ges Virusforsch* 22: 235-245, 1967.
- 25- MARCHALONIS JJ: An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem J* 113: 299-305, 1969.
- 26- MARTIN SA, PETT DM, ZWEERINK HJ: Studies on the topography of reovirus and bluetongue virus capsid proteins. *J Virol* 12: 194-198, 1973.
- 27- MATHAN M, ALMEIDA J, COLE J: An antigenic subunit present in rotavirus infected faeces. *J Gen Virol* 34: 325-329, 1977.
- 28- MEBUS CA, UNDERDAHL NR, RHODES MB, TWIEHAUS NJ: Calf diarrhoea (scours): reproduces with a virus from a field outbreak. *Univ Nebraska Agr Exp St Res Bull* N° 233, 1969.
- 29- NAKASHIMA K, LA FIANDRA A, SHATKIN AJ: Differential dependence of reovirus associated enzyme activities on genome RNA as determined by psoralen photosensitivity. *J Biol Chem* 254: 8007-8014, 1979.
- 30- NALIN DR, LEVINE MM, MATA L, DE CESPEDES C, VARGAS W, LIZANO C, LORIA AR, SIMHON A, MOHS E. Oral rehydration and maintenance of children with rotavirus and bacterial diarrhoeas. *Bull World Health Org* 57: 453-459, 1979.

- 31- PERSON H, OBERG B, PHILIPSON L: Purification and characterization of an early protein (E14K) from adenovirus Type 2-infected cells. *J Virol* 28: 119-139, 1978.
- 32- RHODE JE, NORTHRUP RS: Taking science where the diarrhoea is. In: *Acute Diarrhoea in Childhood*. Elliot K and Knight J, ed., pp. 339-358. Ciba Foundation Symposium. 42 (new series), Elsevier Excerpta Medica North Holland, Amsterdam, 1976.
- 33- RODGER SM, HOLMES IH: Comparison of the genomes of simian, bovine and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J Virol* 30: 839-846, 1979.
- 34- RODGER SM, SCHNAGL RD, HOLMES IH: Biochemical and Biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin. *J Virol* 16: 1229-1235, 1975.
- 35- SCHOUB BD, LECATSAS G, PROZESKY OW: Antigenic relationship between human and simian rotaviruses. *J Med Microbiol* 10: 1-6, 1977.
- 36- SCOTT AC, LUDDINGTON J, LUCAS M, GILBERT FR: Rotavirus in goats. *Vet Rec* 103: -145, 1978.
- 37- SHATKIN AJ, BOTH GW: Reovirus RNA: transcription and translation. *Cell* 7: 305-313, 1976.
- 38- SILVERSTEIN SC, CHRISTMAN JK, ACS G: The reovirus replicate cycle. *Ann Rev Biochem* 45: 375-408, 1976.
- 39- SPENCE L, FAUVEL M, PETRO R, GILLANI A, BABIUK L: A preliminary study of antigenic relationships among isolates of bovine rotavirus. In: *Proc Sec Int Symp Neonatal Diarrhea*, Saskatchewan, 1978.
- 40- STOLTZFUS CM, MORGAN M, BANERJEE AK, SHATKIN AJ: Poly (A) polymerase activity in reoviruses. *J Virol* 13: 1338-1345, 1974.
- 41- STUKER G, OSHIRO LS, SCHMIDT NJ: Antigenic comparisons of two new rotaviruses from rhesus monkeys. *J Clin Microbiol* 11: 202-203, 1980.
- 42- TZIPORI S, WALKER M: Isolation of rotavirus from foals with diarrhoea. *Aust J Exp Biol Med Sci* 56: 453-457, 1978.
- 43- TZIPORI S, CAPLE IW: Isolation of a rotavirus from deer. *Vet Rec* 99: 398, 1976.

- 44- VERLY E, COHEN J: Demonstration of size variation of RNA segments between different isolates of calf rotavirus. *J Gen Virol* 35: 583-586, 1977.
- 45- VIERA DE TORRES B, MAZZALI DE ILJA R, ESPARZA J: Epidemiological aspects of rotavirus infection in hospitalized Venezuelan children with gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg* 27: 567-572, 1978.
- 46- VILLAROEL D y col: Diarrea y malnutrición en el niño. Documento de trabajo del I Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología, Caracas, 1975.
- 47- WOODE GN, BEW ME, DENNIS MJ: Studies on cross protection induced in calves by rotaviruses of calves, children and foals. *Vet Rec* 103: 32-34, 1978.
- 48- WOODE GN, BRIDGER JC, JONES JM, FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H, WHITE GBB: Morphological and antigenic relationships between viruses (Rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect Immun* 14: 804-810, 1976.
- 49- WYATT RG, MEBUS CA, YOLKEN RH, KALIKA AR, JAMES HD, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM: Rotaviral immunity in gnotobiotic calves: heterologous resistance to human virus induced by bovine virus. *Science* 203: 548-550, 1979.
- 50- WYATT RG, JAMES WD, BOHL EH, THEIL KW, SAIF L, KALIKA AR, GREEMBERG HB, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM: Human rotavirus type 2 cultivation in vitro. *Science* 207: 189-191, 1980.
- 51- YANG SS, HERRERA FM, SMITH RG, REITZ MS, LANCINI G, TING RC, GALLO RC: Rifamicin antibiotics: inhibitors of Rauscher Murine Leukemia virus reverse transcriptase and of purified DNA polymerase from human normal and leukemic lymphoblasts. *J Nat Cancer Inst* 49: 7-25, 1972.
- 52- YOLKEN RH, KIM HW, CLEM T, WYATT RG, KALIKA AR, CHANOCK RM, KAPIKIAN AZ: Enzyme linked immunoadsorbant assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 2: 263-267, 1977.
- 53- YOLKEN RH, WYATT RG, ZISSIS G, BRAND CD, RODRIGUEZ WJ, KIM HW, PARROT RH, URRUTIA JJ, MATA L, GREEMBERG HB, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM: Epidemiology of human rotaviruses types 1 and 2 as studied by enzyme linked immunosorbent assay. *N Eng J Med* 299: 1156-1161, 1978.