

AISLAMIENTO DE REOVIRUS TIPOS 1 Y 2 DE PACIENTES CON GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS

R. Mazzali de Iija*, E. Novo**, M. Gorziglia**, F. Gil**
 K. Kudriavcev*** y J. Esparza**

* *Departamento de Virología, Instituto Nacional de Higiene, Ciudad Universitaria, Caracas, Venezuela.* ** *Laboratorio de Biología de Virus, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 1827, Caracas 1010A, Venezuela.* *** *Servicio de Pediatría, Hospital Periférico de Coche, Caracas, Venezuela.*

RESUMEN

Los rotavirus son considerados actualmente como una de las causas más importantes de diarrea infantil en muchos lugares del mundo, incluyendo a Venezuela. A mediados del año 1979 (marzo-agosto, ambos inclusive) estudiamos la etiología viral en niños con gastroenteritis admitidos para rehidratación en el Hospital Periférico de Coche, Caracas. De un total de 114 muestras fecales, examinadas con el microscopio electrónico, se detectó la presencia de 31 casos positivos para rotavirus (27,2%) y 4 para adenovirus (3,5%), probablemente de tipo no cultivable. La frecuencia de identificación de rotavirus varió desde un 7,7% durante el mes de abril, hasta un 45% en agosto. Esa alta positividad observada durante el mes de agosto no es lo usual, ya que este virus circula preferentemente durante los meses más fríos del año. Catorce de las muestras positivas para rotavirus fueron utilizadas para ser inoculadas en células LLC-MK2, con objeto de tratar de establecer los parámetros de infecti-

vidad de rotavirus humanos en cultivos celulares. Un resultado inesperado fué el aislamiento de 9 cepas de reovirus. La primera se obtuvo de muestras tomadas durante el mes de mayo y el virus aislado fué identificado por técnicas de inhibición de la hemaglutinación y neutralización con antisueros específicos, como reovirus tipo 2. Dicho serotipo fué también hallado en muestras obtenidas hasta el mes de agosto, período en el cual la población circulante de reovirus tipo 2 fué sustituida por el tipo 1, del cual se aislaron 4 cepas. Las posibles implicaciones de una infección mixta por rota y reovirus no son conocidas. En todo caso debe mencionarse que ambos son miembros de la familia *reoviridae*, poseyendo partículas virales de morfología muy parecida, que podrían dar lugar a equívocos en su identificación por microscopía electrónica. Sin embargo dichos virus poseen genomas de ARN de doble cadena segmentados, que por técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida dan patrones característicos para cada género viral.

INTRODUCCION

Los rotavirus son considerados actualmente como una de las causas más importantes de diarrea infantil en animales y humanos (9, 14). Los rotavirus humanos han sido identificados en varias partes del mundo, y nosotros lo hemos encontrado asociado a más del 40% de las gastroenteritis en pacientes ingresados al Hospital de Niños "J. M. De Los Ríos", en Caracas (3, 22). Por otra parte, cerca del 70% de niños venezolanos mayores de 1 año de edad poseen anticuerpos contra rotavirus (16). Esta virosis es más frecuente en niños entre seis y veinticuatro meses de edad, donde ocasiona diarreas que se instalan en forma abrupta, acompañada de fiebre, vómitos y en ocasiones signos respiratorios. El cuadro diarréico tiene una duración promedio de 4 a 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, patogénesis y clínica, puede encontrarse en la referencia 5. Aspectos más básicos sobre rotavirus están descritos en la referencia 7).

Debido a que los rotavirus se excretan en grandes cantidades en las heces de los niños infectados, se han realizado muchos estudios sobre la caracterización básica de las partículas virales. Es así como conocemos que dichas partículas están formadas por una doble cubierta protéica (4) en cuyo interior se encuentra el genoma viral constituido por once segmentos

de ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) (17). Asociadas a las partículas virales también se han detectado actividades enzimáticas de polimerasa del ARN (2) y sintetasa de oligoadenilatos (Gorziglia M. Esparza J: Poly(A) polymerase activity in human rotavirus. J Gen Virol, en prensa). Todas estas características estructurales y bioquímicas colocan a los rotavirus dentro de la familia viral *reoviridae* (11), conjuntamente con los reovirus clásicos y con los orbivirus, con los cuales no parecen poseer antígenos comunes.

Uno de los problemas más importantes que ha surgido en el estudio de los rotavirus, han sido las dificultades encontradas para obtener su cultivo *in vitro*, aunque recientemente se han logrado algunos avances significativos en ese aspecto (6, 23). En el curso de nuestras investigaciones para establecer los parámetros de infectividad de rotavirus humanos en cultivo de tejidos, obtuvimos el aislamiento múltiple de cepas de reovirus 1 y 2, que se encontraban coinfectando pacientes con gastroenteritis por rotavirus. La presente comunicación describe esos hallazgos, conjuntamente con información sobre la frecuencia de identificación de rotavirus en el Hospital Periférico de Coche, en Caracas, sitio donde fueron ingresados todos los casos incluidos en el estudio.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes y muestras. Los pacientes incluidos en el presente estudio fueron 114 niños con diarrea aguda febril, menores de dos años de edad, y hospitalizados para rehidratación en el Hospital Periférico de Coche, en Caracas. Se tomaron muestras de heces dentro de las primeras 48 horas de hospitalización, generalmente el día del ingreso. Las muestras fecales (2-20g) se transportaron al laboratorio donde una pequeña cantidad fue diluída en solución amortiguadora de fosfato-salino (PBS) para su futuro procesamiento para inoculación en cultivos celulares. El resto de la muestra fue utilizada para la detección de partículas virales por medio del microscopio electrónico (M.E.).

Detección de virus por M.E. De 1 a 5 g de heces se resuspendieron en 10 ml de PBS y se homogeneizaron en un homogeneizador Virtis-45 (Virtis Research Equipment, Gardiner, New York). Los homogenatos fueron clarificados por centrifugación a 4.000 x g, por 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron utilizados directamente para su observación al M.E., o previamente concentrados. Para eso, dichos sobrenadantes fueron ultracentrifugados a 100.000 x g por 60 minutos a 4°C, en una ultracentrífuga Beckman L5-65. El virus centrifugado al fondo del tubo fue entonces resuspendido en 0.2 ml de agua bidestilada. Las muestras se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2%, pH 7.2, y se examinaron en un microscopio electrónico JEM 100B, usando un aumento de 33.000 X (3, 4).

Inoculación de cultivos celulares. Se preparó una suspensión de heces al 5% en PBS conteniendo antibiótico en altas concentraciones (1.000 U de penicilina por ml, 1.000 μ g de estreptomycin por ml, y 25 μ g de anfotericina B por ml). La suspensión se clarificó por centrifugación a 4.000 x g por 30 minutos a 4°C, y el sobrenadante se utilizó para inocular cultivos de células LLC-MK2, una línea continua de riñón de mono Rhesus. Las células fueron inoculadas con 0.1 ml de la suspensión viral (aproximadamente 10^{10} partículas físicas) de rotavirus humanos, los cuales habían sido previamente tratados por una hora a 37°C con 100 μ g por ml de tripsina. Inmediatamente después de la inoculación, el virus fué centrifugado sobre la monocapa celular a 1.200 x g por 30 minutos a temperatura ambiente (6). Después de la centrifugación, se añadieron 2 ml de medio nutritivo de Eagle, conteniendo 10 μ g por ml de tripsina, y en ausencia de suero fetal. Los cultivos se incubaron a 37°C y se observaron diariamente por la aparición de efecto citopático (ECP). Cuando éste era evidente, los cultivos se congelaban y descongelaban una vez, se clarificaban por centrifugación a baja velocidad, y el sobrenadante se guardaba a -90°C, en cantidades de 1 ml, para identificación de virus por microscopía electrónica y serotipificación de los aislamientos.

Electroforesis del ARN viral en geles de poliacrilamida. La separación de los segmentos del ARN viral se hizo en planchas de gel de poliacrilamida, siguiendo el método de alta resolución descrito por Laemmli (15), utilizando el gel de "Stacking" al 3% y el de corrida al 10%. Antes de la electroforesis, las muestras (heces líquidas) fueron disociadas de la siguiente forma: a 0,2 ml de cada muestra se le añadieron 0,04 ml de la mezcla de disociación (6% SDS, 0,6% mercaptoetanol y 36 m μ EDTA, pH 7.0) y se calentaron a 55°C durante una hora. La electroforesis se realizó a 40 mA (150 V) por 3 a 4 horas, en la presencia de SDS al 0,1%; al final de la corrida de los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, a una concentración final de 2 μ g/ml, y fotografiados bajo iluminación con luz ultravioleta (8).

Serotipificación de los reovirus aislados. Se utilizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación (21) para tipificar aquellos aislamientos de reovirus que presentaron títulos hemaglutinantes iguales o mayores de 1/16 (como fué el caso de las muestras P4 a P8, presentadas en la tabla II). Para ello se utilizaron anticuerpos específicos contra cada uno de los 3 serotipos de reovirus, preparados en pollos (obtenidos del "Center for Disease Control", Atlanta, U.S.A.). Como antígeno se utilizó el sobrenadante clarificado (700 g x 5 min) proveniente de pasajes virales que mostraban un buen efecto citopático en células LLC-MK2.

Aquellos aislamientos que mostraron títulos hemaglutinantes inferiores a 1/16 (P10 al P12 en la tabla II) se tipificaron por pruebas de neutralización (1) en células LLC-MK2, utilizando los mismos antisueros de referencia usados para la técnica de inhibición de la hemaglutinación.

RESULTADOS

Identificación de rotavirus por microscopía electrónica. Se examinaron un total de 114 pacientes, seleccionados entre los meses de marzo a agosto de 1979, encontrándose una positividad global para rotavirus del 27%. La tabla I muestra dichos resultados. Se observa que la frecuencia de identificación de rotavirus varió grandemente entre pacientes examinados durante los diferentes meses del período. Es particularmente llamativo el alto porcentaje de positividad observado en el mes de agosto (45%), muy poco frecuente para un virus como éste que circula preferentemente en los meses más fríos del año (13, 22). Además, se identificaron 4 pacientes que excretaban adenovirus, probablemente pertenecientes a los tipos no cultivables (10). La figura 1 muestra fotografías de microscopía electrónica de rotavirus y adenovirus detectados en heces, conjuntamente con la de reovirus obtenidos de cultivos celulares inoculados.

TABLA I
IDENTIFICACION POR MICROSCOPIA ELECTRONICA
DE PARTICULAS VIRALES EN HECES DE NIÑOS
CON GASTROENTERITIS*

| Meses | N° de pacientes | Positividad para rotavirus | | Otros virus |
|---------|-----------------|----------------------------|--------|----------------|
| | | N° | (%) | |
| Marzo | 31 | 11 | (35,5) | Adenovirus (1) |
| Abril | 13 | 1 | (7,7) | |
| Mayo | 21 | 5 | (23,8) | |
| Junio | 0 | — | — | |
| Julio | 27 | 4 | (14,8) | |
| Agosto | 22 | 10 | (45,5) | Adenovirus (3) |
| Totales | 144 | 31 | (27,2) | |

* Hospital Periférico de Coche, Caracas (1979).

Intento de cultivo de rotavirus humanos. Aislamiento de reovirus tipos 1 y 2. En vista de que con anterioridad habíamos tenido cierto éxito en ensayos de cultivo de rotavirus humanos *in vitro* (6), deseamos extender nuestros intentos utilizando 14 especímenes ricos en partículas virales, los cuales contenían entre 10^6 y 10^9 rotavirus por ml de suspensión. Previa

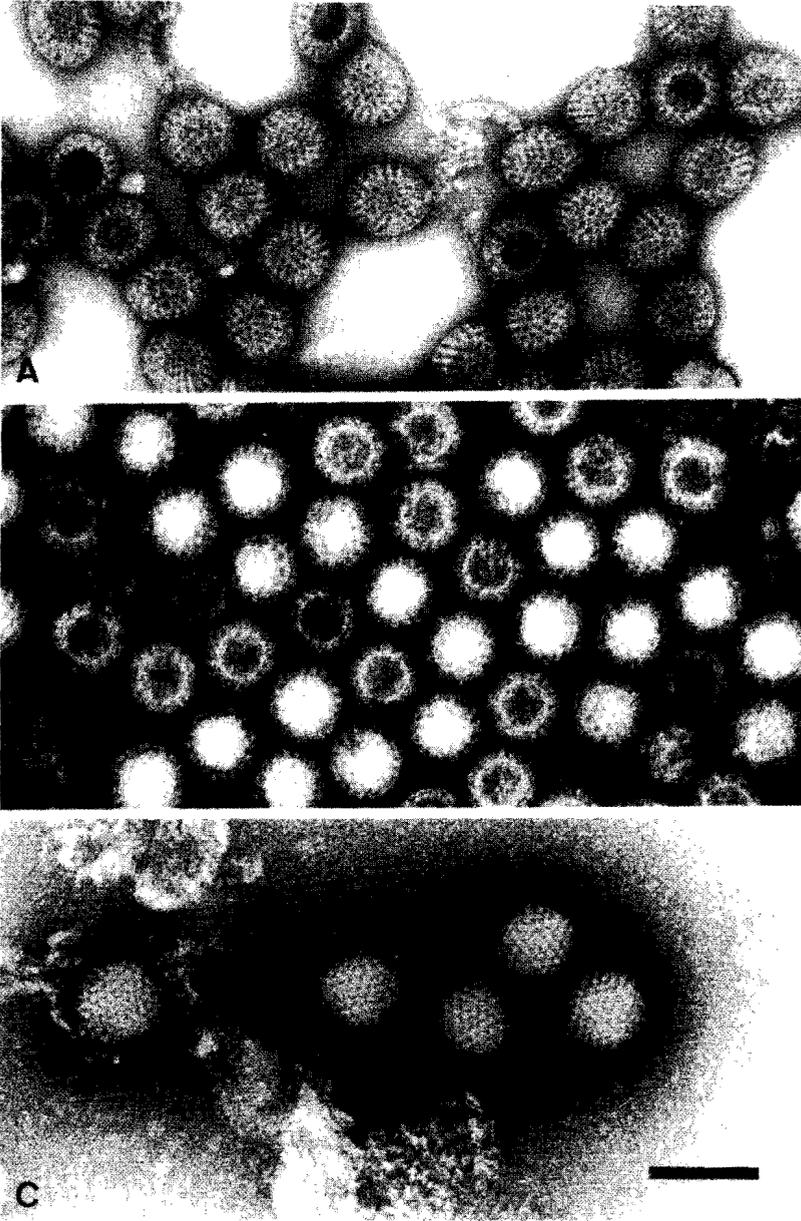


Fig. 1.— Microfotografías electrónicas de A) Rotavirus humano presentes en heces de niños con gastroenteritis. B) Reovirus tipo 2, aislado en cultivos celulares, a partir de muestras fecales de niños con gastroenteritis por rotavirus. C) Adenovirus identificados en muestras de heces. Barra = 100 nm.

a la inoculación, la identidad de los rotavirus a utilizar fué confirmada por electroforesis en geles de poliacrilamida de los ARN genómicos de los virus presentes en cada muestra. La Fig. 2 muestra los patrones obtenidos con siete de los especímenes examinados. En cinco de las siete muestras pudo observarse el patrón de rotavirus, con la migración característica para cada uno de los once segmentos del ARN-dc; las muestras P8 y P10 no mostraron las bandas correspondientes, debido al bajo número de partículas virales presentes en las mismas (menos de 10^7 partículas por ml), tal como se señala en la Tabla II. La proximidad de las bandas 5 y 6 identificó a los rotavirus como de origen humano (12).

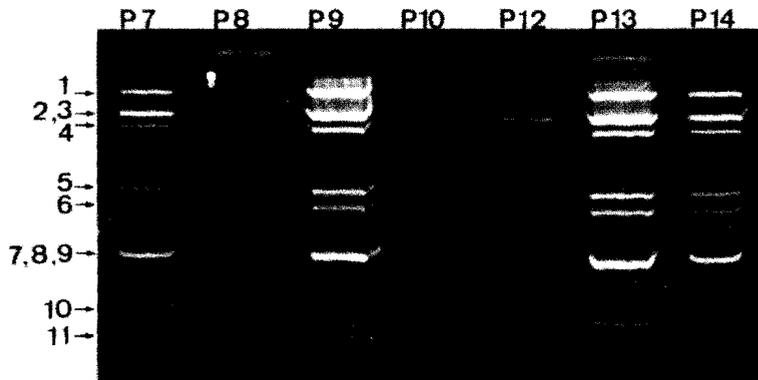


Fig. 2.— Patrón electroforético del ARN genómico de 7 muestras de rotavirus humano.

Los sobrenadantes de las células infectadas fueron inicialmente examinados con el microscopio electrónico, con objeto de detectar multiplicación viral. En 7 de las 14 muestras examinadas pudieron detectarse abundantes partículas semejantes a reovirus en dichos sobrenadantes. Debido a que la morfología de reoviriones y rotaviriones es muy parecida (Fig. 1), lo cual podría llevar a confusiones, la identidad del virus multiplicado a partir de uno de los inóculos (P4) fué confirmada por electroforesis en geles de poliacrilamida del ARN genómico. La Fig. 3 muestra que el patrón electroforético del virus aislado es diferente al del rotavirus inoculado y semejante al descrito para los reovirus (11).

La identificación serológica de los virus aislados se realizó entonces por medio de pruebas de inhibición de la hemaglutinación y de neutralización, las cuales diagnosticaron además la presencia de reovirus en dos especímenes adicionales, en los cuales no se habían identificado por microscopía electrónica (P7 y P10). Los resultados de la identificación serológica se muestran en la Tabla II. El primer aislamiento de reovirus se obtuvo de unas muestras tomadas durante el mes de mayo, y el virus aislado se iden-

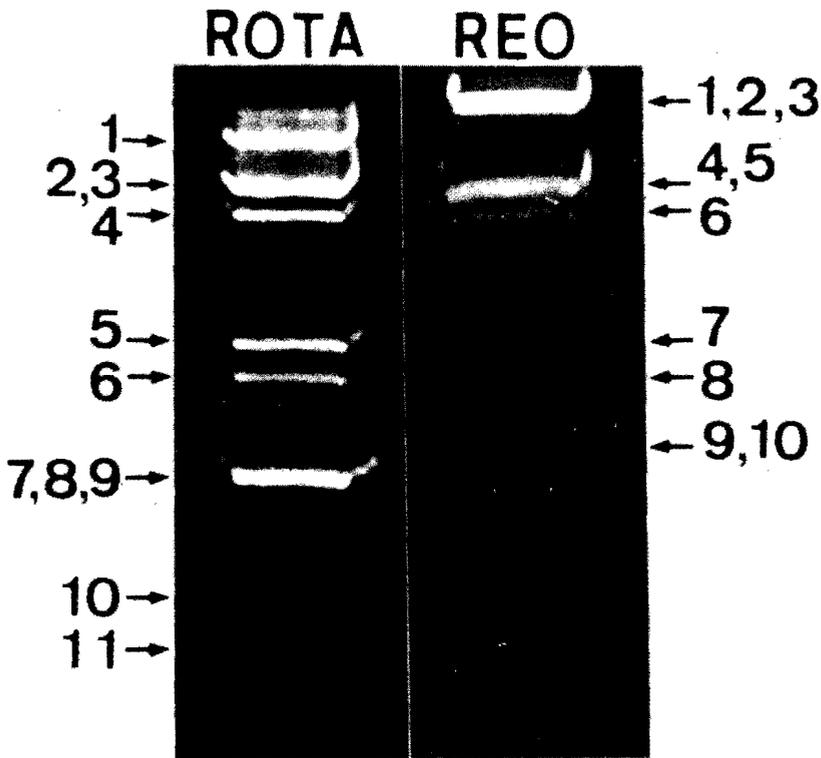


Fig. 3.— Comparación del patrón electroforético del ARN genómico de rotavirus humano y reovirus tipo 2.

tificó como tipo 2. Dicho serotipo fué también hallado en muestras obtenidas hasta el mes de agosto, período en el cual la población circulante de reovirus tipo 2 fué substituída por el tipo 1, del cual se aislaron cuatro cepas.

DISCUSION

En la actualidad no existen dudas sobre el papel etiológico que juegan los rotavirus cuando éstos se encuentran asociados a cuadros de gastroenteritis (5). Sin embargo, con mucha frecuencia los rotavirus se aíslan conjuntamente con otros patógenos bacterianos o virales que podrían modificar, quizás agravar, el curso de la infección rotaviral.

En un estudio previo (22) encontramos que cerca del 10% de una población de niños venezolanos estudiados, que incluía pacientes con gastroenteritis y controles aparentemente sanos, estaban excretando enterovirus

para el momento del examen. Con mucha frecuencia se encontraron asociaciones entre rota- y enterovirus, pero éstas parecían debidas al azar y no modificaban el cuadro clínico. Es importante mencionar que no son raros los aislamientos virales múltiples en diarrea infantil, y que su significación permanece por ser elucidada (17).

En esta oportunidad describimos lo que parece ser un brote de gastroenteritis por rotavirus localizado en el área de Coche, en Caracas. Creemos que es un brote localizado debido a que la frecuencia de aislamiento de rotavirus se haya debido a contaminación intra-hospitalaria, ya que los pacientes fueron ingresados con el cuadro de gastroenteritis ya instalado y las muestras fueron tomadas, de preferencia, durante las primeras 24 horas después del ingreso. Esto indica que, aunque los rotavirus circulan preferentemente durante los meses más fríos (13, 22), éstos pueden ocasionar brotes en cualquier época del año, y que los resultados obtenidos en poblaciones más o menos discretas, no necesariamente pueden extrapolarse directamente para definir la epidemiología del virus en la comunidad.

TABLA II

INTENTO DE CULTIVO DE ROTAVIRUS HUMANOS
A PARTIR DE HECES = AISLAMIENTO DE REOVIRUS
TIPOS 1 Y 2

| Muestra | Fecha de recolección | Concentración de rotavirus (partículas/ml) (a) | Virus identificado por cultivo |
|---------|----------------------|--|--------------------------------|
| P4 | 16-Mayo-1979 | ++++ | Reo 2 |
| P5 | 11-Julio-1979 | ++++ | Reo 2 |
| P6 | 31-Julio-1979 | ++++ | Reo 2 |
| P7 | 7-Agosto-1979 | ++++ | Reo 1 + Reo 2 |
| P8 | 7-Agosto-1979 | ++ | Reo 2 |
| P9 | 7-Agosto-1979 | +++ | - |
| P10 | 7-Agosto-1979 | ++ | Reo 1 |
| P11 | 7-Agosto-1979 | +++ | Reo 1 |
| P12 | 9-Agosto-1979 | ++++ | Reo 1 |
| P13 | 14-Agosto-1979 | ++++ | - |
| P14 | 14-Agosto-1979 | ++++ | - |
| P15 | 16-Agosto-1979 | ++++ | - |
| P16 | 16-Agosto-1979 | ++++ | - |
| P17 | 16-Agosto-1979 | ++++ | - |

a) Estimado por Microscopía Electrónica. + = $10^5 - 10^6$ ++ = $10^6 - 10^7$; +++ = $10^7 - 10^8$; ++++ $10^8 - 10^9$ partículas físicas por ml.

Un resultado inesperado en este estudio fué el aislamiento en cultivos celulares de 4 cepas de reovirus tipo 1 y 5 de reovirus tipo 2, de muestras procedentes de pacientes con gastroenteritis, y ricas en partículas rotavirales. Muy probablemente la infección por reovirus fué adquirida intrahospitalariamente, ya que los únicos brotes de reovirus observados en humanos han ocurrido en instituciones para niños (19, 20). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la infección haya ocurrido previa a la hospitalización, y como consecuencia de brotes secuenciales de reovirus tipo 2 y tipo 1 en la comunidad. Cabe anotar que una encuesta realizada en 100 niños venezolanos, de edades comprendidas entre 5 meses y un año, demostró la existencia de anticuerpos para reovirus tipos 1 y 2 en 61 y 60% de los casos, respectivamente (datos no publicados). Es así como también en nuestro país la infección por reovirus parece estar ampliamente diseminada en la población. Desafortunadamente, no existen evidencias de que dichos virus estén claramente asociados en humanos con algún cuadro patológico conocido.

La presencia conjunta de rotavirus y reovirus indica la ausencia de interferencia viral *in vivo*, incluso cuando ambos virus, particularmente los reovirus, son excelentes inductores de interferón. Dicha interferencia tampoco parece manifestarse *in vitro*, donde un gran exceso de partículas rotavirales permitieron la infección y multiplicación de reovirus presentes en números mucho menores. Así mismo, la existencia de dichas infecciones mixtas deben indicar cautela en intentos de cultivar rotavirus *in vitro*, donde podría dar lugar a resultados equívocos, debido a la morfología muy parecida de las partículas virales de ambos virus. La electroforesis del ARN viral en geles de poliacrilamida provee un sistema fácil para la diferenciación rápida de ambos virus. Dicho sistema también podría aportar información útil sobre los diferentes tipos de rotavirus circulantes, que parecen poder ser diferenciados en base a pequeñas modificaciones en la migración de algunos de los segmentos de doble cadena de su ARN genómico (8).

Agradecimiento

Deseamos agradecer la excelente colaboración técnica prestada por Carmen I. Piña y Mirta de Romano, así como la ayuda secretarial de Marisol de Sgambatti.

ABSTRACT

Isolation of reovirus types 1 and 2 from patients with rotavirus gastroenteritis. Mazzali de Ilja, R., Novo E., Gorziglia M., Gil F., Kudriavcev K., Esparza J. (*Laboratorio de Biología de Virus. IVIC. Apartado Postal 1827. Caracas 1010-A, Venezuela*). *Invest Clín* 22(1): 29-41, 1981.— Rotaviruses

are now considered to be a major cause of gastroenteritis in many parts of the world, including Venezuela. From march to august - 1979, we studied the viral etiology in children admitted with gastroenteritis to the "Hospital Periférico de Coche", in Caracas. From 114 specimens examined by electron microscopy, rotaviruses were identified in 31 cases (27.2%), and adenovirus, probably of the non-cultivable type, in 4 cases (3.5%). The frequency of rotavirus identification varied from 7.7% during april, up to 45% in august. Forteen of the rotavirus positive samples were further utilized in an attempt to infect LLC-MK2 cells with human rotavirus. An unexpected result was the isolation of 9 reovirus strains from those samples. The first strain was isolated from a specimen collected in may, and was identified as type 2 by means of inhibition of haemagglutination and neutralization tests. Such serotype was also identified in samples obtained up to the month of august, time at which the circulating reovirus type 2 population was substituted by reovirus type 1 serotype, from which four strains were isolated. The possible implications of a mixed infection with reo- and rotaviruses are not known. In any case, it should be mentioned that both viruses belong to the *Reoviridae* family, with virus particles showing a relatively similar morphology, which could led to equivocal results in their identification with the electron microscope. However, those viruses posses a double-stranded segmented RNA genome, which can be unequivocal identified by electrophoresis in polyacrylamide gels.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- Center for Disease Control (CDC): Neutralization test for enteroviruses in cell culture. In: Course 8241-C "Laboratory diagnosis of viral diseases". pp. 98-99. Center for Disease Control, Atlanta, 1974.
- 2- COHEN J: Ribonucleic acid polimerase activity associated with purified calf rotavirus. *J Gen Virol* 36: 395-402, 1977.
- 3- ESPARZA J, VIERA DE TORRES B, PIÑERO A, CARMONA FO, MAZZALI DE ILJA R: Rotaviruses in Venezuelan children with gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg* 26: 148-151, 1977.
- 4- ESPARZA J, GIL F: A study on the ultrastructure of human rotavirus. *Virology* 91: 141-150, 1978.
- 5- ESPARZA J, VIERA DE TORRES B: Avances recientes sobre la etiología viral de la gastroenteritis. *Acta Med Venez* 26: 110-121, 1979.
- 6- 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.

- 7- ESPARZA J, GIL F, GORZIGLIA M, NOVO E, URQUIDI V: Rotavirus y gastroenteritis: un nuevo enfoque a un viejo problema. *Invest Clín* 21: 108-137, 1980.
- 8- ESPEJO RT, CALDERON E, GONZALEZ N: Distinct reovirus like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 6: 502-506, 1977.
- 9- FLEWETT TH, WOODE GN: The rotaviruses. *Arch Virol* 57: 1-23, 1978.
- 10- 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.
- 11- JOKLIK WK: Reproduction of reoviridae. In: *Comprehensive Virology*, Vol 2 Fraenkel-Conrat and Wagner, Ed, pp. 231-334. Plenum Press, New York, 1974.
- 12- 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.
- 13- KAPIKIAN AZ, KIM HW, WYATT RG, CLINE WL, ARROBIO JO, BRANDT CD, RODRIGUEZ WJ, SACK DA, CHANOCK RM, PARROT RH: Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Eng J Med* 294: 965-972, 1976.
- 14- KAPIKIAN AZ, YOLKEN RH, WYATT RG, KALICA AR, CHANOCK RM, KIM HW: Viral diarrhea: etiology and control. *Am J Clin Nut* 31: 2219-2236, 1978.
- 15- LAEMMLI UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685, 1970.
- 16- MAZZALI DE ILJA R, PEREZ DE BLANCO M: Estudio serológico de rotavirus en población venezolana. *Rev Inst Nac Hig* 13: 91-98, 1980.
- 17- PARKS WE, QUEIROGA LT, MELNICK JL: Studies of infantile diarrhea in Karachi, Pakistan: II. Multiple virus isolation from rectal swabs. *Am J Epidemiol* 85: 469-478, 1967.
- 18- RODGER SM, SCHNAGL RD, HOLMES IH: Biochemical and biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin. *J Virol* 16: 1229-1235, 1975.

- 19- ROSEN L: Reoviruses. In: *Virology Monographs*, Vol. 1. pp. 73-107, Springer-Verlag, New York, 1968.
 - 20- ROSEN L, HOVIS JF, MASTROTA FM, BELL JA, HUEBNER RJ: An outbreak of infection with a type 1 reovirus among children in an institution. *Am J Hyg* 71: 266-274, 1960.
 - 21- SCHMIDT NJ: Antibody assays for enteroviruses and reoviruses. Chapter 66. In: *Manual of clinical immunology*. Rose and Friedman, Ed. pp. 488-493. American Society for Microbiology, Washington, 1976.
 - 22- 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.
 - 23- WYATT RG, JAMES WD, BOHL EH, THEIL KW, SAIF L, KALIKA AR, GREEMBERG HB, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM: Human rotavirus type 2 cultivations in vitro. *Science* 207: 189-191, 1980.
-