

Prevalencia de subgrupos, serotipos y electroferotipos de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela.

Antonio J. Maldonado N. y Jesús W. Bastardo G.

Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente,
Núcleo de Sucre. Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.

Palabras clave: Rotavirus, subgrupos, serotipos, electroferotipos, ELISA.

Resumen. De junio de 1992 a mayo de 1993, se detectaron por ensayo inmunoenzimático (ELISA) 159 casos positivos a rotavirus de 321 niños (49,5%) hospitalizados por diarrea aguda. De las 159 muestras positivas por ELISA se escogieron 80 al azar para el análisis de subgrupos y serotipos de rotavirus humanos del grupo A. Por ELISA se detectaron 9 (11,3%) muestras pertenecientes al subgrupo I, 46 (57,5%) al subgrupo II y 25 (31,3%) que no pudieron ser agrupadas. El serotipo G1 se encontró en 52 casos (65,0%), G2 en 11 casos (13,8%), G3 en 1 caso (1,2%) y 7 casos (8,8%) mostraron más de un serotipo. Por electroforesis se detectaron bandas de ARN rotaviral en 137 muestras (42,7%). El patrón largo (59,1%) prevaleció sobre el corto (35,8%), y por coelectroforesis se encontraron ocho electroferotipos distintos en todo el período de estudio. Estos resultados ilustran la gran variedad de cepas de rotavirus humanos en esta región del país.

Prevalence of subgroups, serotypes and electropherotypes of humans rotavirus in Cumana, Venezuela.

Invest Clin 1998; 39(1): 39-51.

Key words: rotavirus, subgroups, serotypes, electropherotypes, ELISA.

Abstract. From June 1992 to May 1993, rotaviruses were detected by an immunoenzymatic assay, in 159 (49.5%) of 321 children admitted to the hospital with acute diarrhea. Of the 159 cases ELISA positive, 80 samples were chosen at random to investigate subgroups and serotypes of group A human rotavirus. By the ELISA test 9 (11.3%) of the strains were subgroup I, 46 (57.5%) were subgroup II, and 25 (31.3%) could not be grouped. The serotype G1 was identified in 52 cases (65%), G2 in 11 cases (13.8%), G3 in

1 case (1.2%), and 7 cases (8.8%) showed more than one serotype. By electrophoretic analysis of viral RNA, 137 (42.7%) of the samples exhibited an RNA pattern. The long pattern (59,1%) prevailed over the short pattern (35,8%), and by coelectrophoresis 8 different electropherotypes were found throughout the period of study. These results illustrate the great variety of rotavirus strains in this region of the country.

Recibido: 13-5-97. Aceptado: 17-2-98.

INTRODUCCIÓN

La apariencia morfológica de los rotavirus es distintiva, las partículas virales completas están formadas por tres capas proteicas (1). Entre las proteínas destacan por su importancia en las especificidades antigénicas la VP6, VP4 y VP7 (3). El antígeno para grupo y subgrupo (VP6) está localizado en la capa intermedia, antes denominada cápside interna. A través de métodos serológicos y genéticos se han identificado siete grupos virales (de A a G) que infectan animales y humanos (3), siendo el grupo A el más frecuentemente encontrado en los casos de diarrea aguda en infantes y niños jóvenes (2,3). Dos subgrupos diferentes se han determinado por pruebas serológicas con anticuerpos monoclonales: subgrupo I (SG I) y subgrupo II (SG II). Los antígenos para serotipos (VP4 y VP7) están situados en la capa externa del virión y por pruebas de hibridización y de secuenciación de estas proteínas se han podido identificar en humanos ocho serotipos diferentes para VP4 (serotipos P), y 14 para VP7 (serotipos G), de los cuales del G1 al G4 son los más importantes en la epidemiología de las diarreas (3, 5).

El genoma de los rotavirus consiste de once segmentos de ARN de doble cadena que pueden ser separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y formar patrones electroforéticos o electroferotipos característicos para cada cepa viral (6,7). Basados en la diferencia de migración del segmento once de ARN viral por PAGE se ha podido clasificar a los rotavirus del grupo A en dos patrones electroforéticos principales: RVH de patrón largo y de patrón corto (8,9), que se han asociado con los subgrupos serológicos SG II y SG I respectivamente (10,11).

El uso de PAGE en estudios epidemiológicos no es sólo útil para el análisis de las variaciones genéticas entre rotavirus del grupo A dentro de una población, sino también para la detección de rotavirus atípicos cuyos segmentos de ARN viral se distribuyen en el gel de manera diferente a los rotavirus del grupo A (12,13), así como también para detectar segmentos extra genes (14,15).

El presente trabajo tuvo como objetivos principales el estudio de subgrupos y serotipos de rotavirus

humanos del grupo A, así como también el estudio molecular de su genoma, en niños diarreicos recluidos en la Sala de Rehidratación del Hospital Universitario Antonio Patriocio de Alcalá de Cumaná, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras fecales

Un total de 321 muestras fecales fueron obtenidas a partir de igual número de niños diarreicos menores de cinco años de edad recluidos en la Sala de Rehidratación del Hospital Universitario Antonio Patriocio de Alcalá, de Cumaná, en el lapso comprendido entre junio de 1992 a mayo de 1993. Las heces se transportaron bajo refrigeración y se procesaron de inmediato o se guardaron bajo congelación a -70°C hasta el momento del análisis.

Detección de rotavirus

La detección de rotavirus se llevó a cabo por el ensayo inmunoenzimático confirmatorio (ELISA) descrito previamente por Kapikian y col. (16).

Subgrupaje de rotavirus

Los rotavirus fueron subgrupados por ELISA con anticuerpos monoclonales según el método de Greenberg y col (17). Para el ensayo se utilizó como anticuerpo de captura antisuero hiperinmune de cabra contra rotavirus, mientras que el segundo anticuerpo fué del fluido ascítico de ratones inoculados con hibridomas (hibridoma 255/60/125/14 para subgrupo I o hibridoma

631/19/104/56P4 para subgrupo II).

Serotipos de rotavirus

El análisis de los serotipos se llevó a cabo según la técnica de Taniguchi y col. (18). Como antisuero de captura se utilizaron siete anticuerpos monoclonales serotipo específicos que reconocen a VP7, gentilmente suministrados por la Dra. Irene Pérez-Schael del Instituto de Biomedicina, Caracas-Venezuela: 5EB, KU-4, 2C9 (serotipo G1), S2-G10 (serotipo G2), YO-1E2, 954/159 (serotipo G3), y ST2GT7 (serotipo G4). Como segundo anticuerpo se utilizó suero anti-rotavirus de conejo y el conjugado fue fosfatasa alcalina anti IgG de conejo.

Electroforesis del ARN rotaviral

La electroforesis del ARN rotaviral se llevó a cabo por el método descrito por Herring y col. (19). El ARN viral fue extraído de las suspensiones fecales con una mezcla de fenol-cloroformo y precipitado con etanol según Sambrook y col (20). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 10% a 20 mA por 16 h a temperatura ambiente. Finalmente los geles se tiñeron con nitrato de plata 12 mM.

Los electroferotipos que a simple vista parecieron distintos, se les hizo coelectroforesis (21) para precisar las diferencias y ubicar en que clase de tamaño se encontraban las mismas.

RESULTADOS

De un total de 321 muestras, 159 (49,5%) resultaron positivas por

ELISA y 137 (42,7%) por PAGE. La distribución mensual de los rotavirus se muestra en la Tabla I, en la cual se observa que por ambos métodos se detectó un pico de mayor incidencia de estos virus en el mes de enero de 1993.

De las muestras que resultaron positivas a RVH por ELISA se seleccionaron 80 al azar para el estudio de subgrupos y serotipos. De estas, 9 (11,3%) resultaron subgrupo I (SG I), 46 (57,5%) subgrupo II (SG II) y 25 muestras (31,3%) no pudieron ser agrupadas (NA) debido a que no reaccionaron con los anticuerpos monoclonales.

En la Tabla II se muestra la distribución de los subgrupos encontrados en el año de estudio y se aprecia que el subgrupo II se pre-

sentó en casi todos los meses que abarcó el estudio, mostrando mayor frecuencia de aparición en los meses de enero, febrero y marzo. El subgrupo I estuvo presente en 7 meses y no mostró una prevalencia marcada en ninguno de éstos.

De las 80 muestras solamente a 71 se les realizó la determinación de serotipos con los anticuerpos monoclonales utilizados. De éstas, 52 (65%) resultaron ser serotipo G1; 11 (13,8%) serotipo G2; 1 (1,2%) serotipo G3; 7 (8,8%) no pudieron ser clasificadas motivado a que resultaron positivas para dos o más serotipos (Tabla III). No se encontraron muestras que reaccionaran solo como serotipo 4.

En la Tabla III se observa también la distribución mensual de los

TABLA I
FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS PARA ROTAVIRUS POR ELISA Y PAGE EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS ENTRE JUNIO DE 1992 Y MAYO DE 1993

MESES	N°	ELISA +	%	PAGE +	%
JUN	22	11	50,0	7	31,8
JUL	30	14	46,7	12	40,0
AGO	30	13	43,3	10	33,3
SEP	36	14	38,9	11	30,6
OCT	20	4	20,0	4	20,0
NOV	15	8	53,3	8	53,3
DIC	17	7	41,2	7	41,2
ENE	59	54	91,5	49	83,1
FEB	25	14	56,0	13	52,0
MAR	34	12	35,3	10	29,4
ABR	18	6	33,3	5	27,8
MAY	15	2	13,3	1	6,7
TOTAL	321	159	49,5	137	42,7

TABLA II

DISTRIBUCIÓN MENSUAL DE LOS SUBGRUPOS ENCONTRADOS ENTRE JUNIO DE 1992 Y MAYO DE 1993

MESES	N°	SG I (%)	SG II (%)	NA (%)
JUN	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)
JUL	3	2 (66,7)	1 (33,3)	
AGO	3	1 (33,3)	2 (66,7)	
SEP	5	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)
OCT	2		1 (50,0)	1 (50,0)
NOV	4		2 (50,0)	2 (50,0)
DIC	5	1 (20,0)	2 (40,0)	2 (40,0)
ENE	29	1 (3,5)	20 (68,9)	8 (27,6)
FEB	12		7 (58,3)	5 (41,7)
MAR	9	1 (11,1)	6 (66,7)	2 (22,2)
ABR	4		2 (50,0)	2 (50,0)
MAY	1			1 (100,0)
TOTAL	80	9 (11,3)	46 (57,5)	25 (31,3)

NA= Muestras no agrupadas

serotipos encontrados. El serotipo G1 se encontró en todos los meses del año de estudio, presentando picos de mayor incidencia en los meses de enero, febrero y marzo. El serotipo G2 se presentó en 8 meses y el serotipo G3 apareció una sola vez, en el mes de enero. Las muestras que reaccionaron a más de un serotipo (NC) se presentaron una vez en diciembre y seis en enero.

De las 137 muestras que revelaron el ARN rotaviral por PAGE, se encontraron 49 (35,8%) con un patrón electroforético corto y 81 (59,1%) con patrón largo; en las 7 muestras restantes (5,1%) sólo se pudo identificar algunos segmentos del genoma viral por lo cual no se pudo establecer el tipo de patrón.

Ocho patrones electroforéticos distintos de ARN se pudieron dife-

renciar por coelectroforesis, a cada uno se le asignó una letra para su identificación (de A a H) (Fig. 1): cinco pertenecieron al patrón largo (A, B, C, D, E) y tres pertenecieron al corto (F, G, H).

La distribución de los ocho electroferotipos en el año de estudio se muestra en la Fig. 2. El patrón electroforético corto predominó hasta octubre de 1992 y el patrón largo de noviembre de 1992 hasta mayo de 1993.

En los de patrón largo el designado con la letra **B** fue el de mayor prevalencia (46%) encontrándose en 9 de los 12 meses que abarcó la investigación, seguido por el electroferotipo **C** (7%) que apareció en seis meses de estudio. En los patrones electroforéticos cortos el electroferotipo designado con la letra **F** fue

TABLA III
DISTRIBUCIÓN MENSUAL DE LOS SEROTIPOS G
ENCONTRADOS ENTRE JUNIO DE 1992 Y MAYO DE 1993

MESES	N°	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)	NC (%)	NT (%)
JUN	3	2 (66,7)				1 (33,3)
JUL	3	1 (33,3)	1 (33,3)			1 (33,3)
AGO	3	2 (66,7)				1 (33,3)
SEP	5	3 (60,0)	1 (20,0)			1 (20,0)
OCT	2	1 (50,0)	1 (50,0)			
NOV	4	2 (50,0)	1 (25,0)			1 (25,0)
DIC	5	3 (60,0)	1 (20,0)		1 (20,0)	
ENE	29	16 (55,2)	3 (10,3)	1 (3,5)	6 (20,7)	3 (10,3)
FEB	12	10 (83,3)	1 (8,3)			1 (8,3)
MAR	9	7 (77,8)	2 (22,2)			
ABR	4	4 (100)				
MAY	1	1 (100)				
TOTAL	80	52 (65,0)	11 (13,8)	1 (1,2)	7 (8,8)	9 (11,3)

NC = No clasificados. NT = No tipificables

predominante (28%) apareciendo durante 9 meses y el patrón G estuvo en segundo lugar con un 4% de aparición (sólo en dos meses). Los demás electroferotipos mostraron períodos cortos de aparición de 1 a 2 meses.

DISCUSIÓN

Los rotavirus estuvieron presentes durante todo el año que duró el estudio, presentando el mayor pico de incidencia en el mes de enero. Estos resultados difieren un poco de los encontrados en 1987 en la misma región, cuando se observó mayor prevalencia de RVH en los meses de septiembre y octubre (22). Este modelo de circulación de los rotavirus parece indicar que en esta

región del país la escasa variación de la temperatura durante el año no influye mayormente sobre la incidencia de los rotavirus, pudiendo aparecer picos de mayor incidencia en cualquiera de los meses del año.

Se notó claramente que el subgrupo II predominó durante todo el año de estudio. Sin embargo, las cepas del subgrupo I se presentaron con la misma frecuencia que las del subgrupo II durante los primeros cuatro meses para luego disminuir drásticamente su frecuencia de aparición mientras que las del subgrupo II se incrementaban considerablemente.

Cambios similares en la prevalencia y aparición temporal de subgrupos de rotavirus humanos fueron reportados por Uhnoo y Svensson

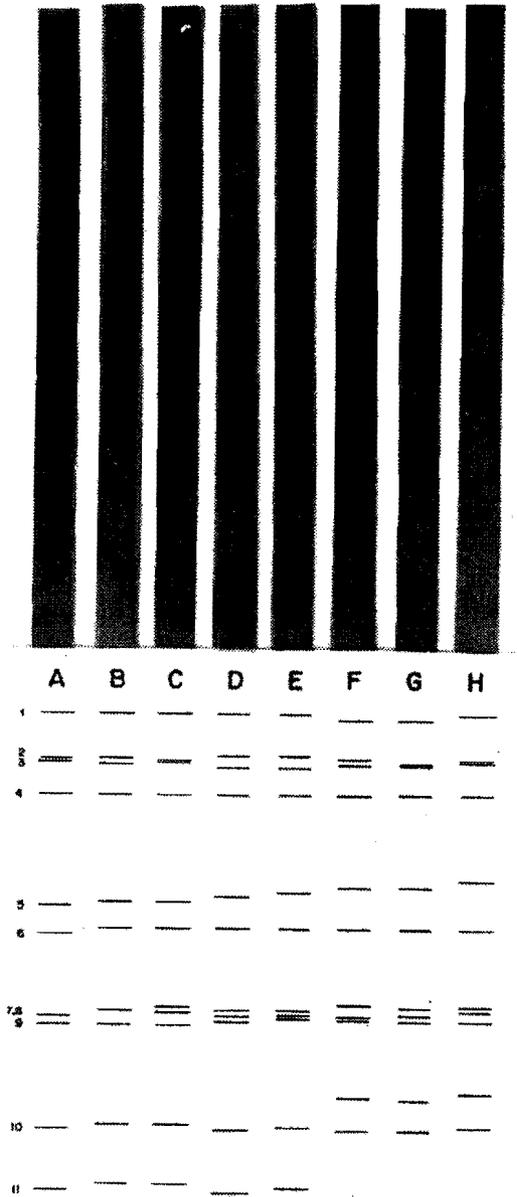


Fig. 1. Distintos patrones genómicos de ARN (A a H) (panel superior) y su representación esquemática (panel inferior) de las cepas representativas de rotavirus identificadas en Cumaná, Venezuela, desde junio de 1992 hasta mayo de 1993. La migración electroforética fue de arriba hacia abajo a corriente constante (20 mA) por 16 h a temperatura ambiente.

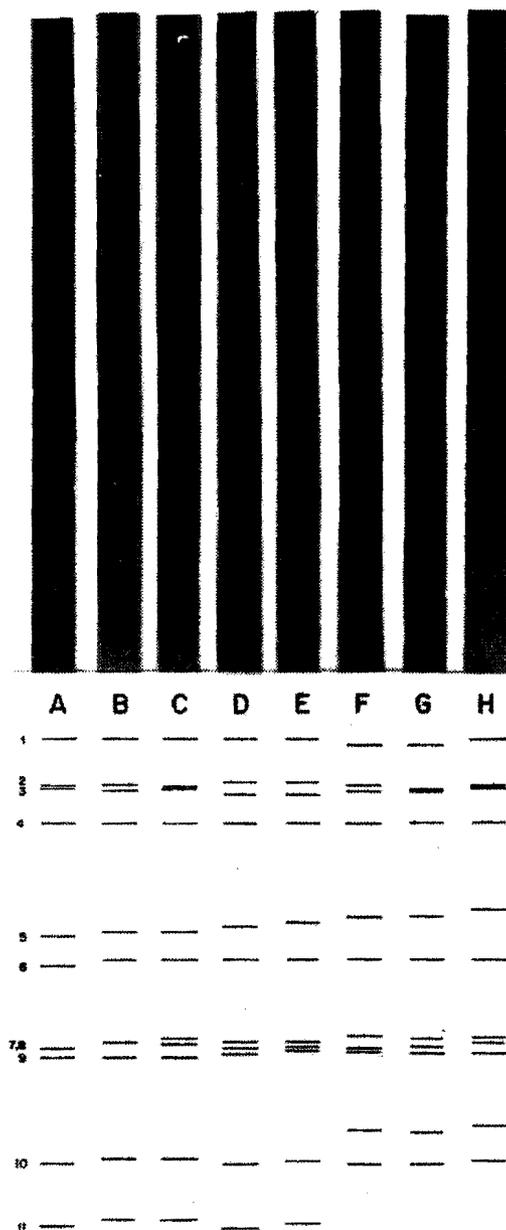


Fig. 2. Distribución mensual de los distintos electroferotipos (A a H) de rotavirus encontrados en niños con gastroenteritis aguda recluidos entre junio de 1992 y mayo de 1993 en el Hospital Antonio Patricio de Alcalá de Cumaná. Los numerales indican el número de electroferotipos encontrados por número de muestras analizadas cada mes.

(23), quienes encontraron un predominio del subgrupo II (64%) sobre el subgrupo I (36%) y notaron que los dos subgrupos cocircularon a frecuencias iguales durante los primeros 7 meses del año, después del cual el SG I desapareció completamente y el SG II se mantuvo presente en el resto del año. El predominio del SG II sobre el I ha sido reportado por muchos otros investigadores desde diversas partes del mundo (24, 25).

En cuanto a los serotipos, el G1 fue el de mayor predominio, seguido por G2 y por G3. El serotipo G4 solo apareció en muestras con más de un serotipo (NC). Esta prevalencia del serotipo G1 sobre los demás también ha sido observada por Birch y col. (26) en Australia, Urasawa y col. (27) en Japón, White y col. (28) y Callejas y col. (24) en Venezuela, y O'Ryan y col. (29) en Chile. Sin embargo, en estos últimos años se ha encontrado que cualquier otro serotipo G puede predominar en un brote diarreico (30,25).

También se encontraron nueve muestras que, aún cuando contenían suficiente antígeno para su detección, no pudieron ser ubicadas dentro de ningún serotipo en particular, este hallazgo también ha sido reportado por Flores y col. (31) y White y col. (28) quienes sugirieron que puede deberse a: (a) la presencia de otros serotipos que no pueden ser reconocidos por los anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio, (b) por diferentes "monotipos" de los serotipos G1, G2 y G3, (c) a una baja concentración de particu-

las virales, (d) al tiempo de almacenaje de las muestras en el freezer o (e) a otros factores hasta ahora desconocidos. Para tratar de solucionar este problema se ha sugerido el desarrollo de anticuerpos monoclonales con un rango más amplio de acción en las pruebas serológicas (28).

La prevalencia del patrón largo sobre el corto también ha sido reportada por otros autores (24, 32, 33), pero durante el primer tercio del tiempo de este estudio (junio, julio, agosto y septiembre de 1992) se observó que el patrón corto estuvo presente en mayor proporción que el largo, y los dos tercios restantes (octubre de 1992 a mayo de 1993) el patrón largo fue el dominante. Esta variación de predominio entre patrones largos y cortos se ha observado también en Chile (34), Suiza (23) y Kuwait (11), entre otros. Se ha sugerido que estos cambios en la prevalencia de electroferotipos puede indicar un cambio antigénico en los RVH y puede reflejar un cambio en la inmunidad de la población involucrada (23).

Por coelectroforesis se encontraron ocho electroferotipos distintos: cinco pertenecieron al patrón largo y tres al patrón corto. Esto evidencia que el patrón largo presentó una mayor variabilidad genética que el patrón corto. Un estudio más detallado de la variación de los once segmentos nos permitió establecer que en los electroferotipos largos los segmentos 2 y 3 (pertenecientes a la clase I), 7,8 y 9 (clase III), 10 y 11 (clase IV) fueron los que sufrieron la mayor variabilidad en su movilidad

electroforética; en cambio, la mayor variabilidad en los electroferotipos cortos ocurrió en los segmentos 2,3 (clase I), 7,8 (clase III) y 10 (clase IV).

La aparición de ocho electroferotipos distintos en el corto tiempo que duró el estudio ilustra la gran variedad de cepas de rotavirus circulando en esta región y el rápido cambio en la población local de rotavirus. La gran variabilidad genética de los rotavirus también ha sido reportada por Rodger y col. (35) en Melbourne, Australia donde aislaron 17 electroferotipos distintos en un estudio que abarcó un lapso de 7 años; Maldonado y Bastardo (22) en Cumaná, Venezuela, detectaron 12 electroferotipos distintos en un año de estudio; y Giordano y col. (32) en Córdoba, Argentina, detectaron 16 electroferotipos distintos en 10 años de estudio.

Los ocho electroferotipos encontrados en este estudio se compararon visualmente con fotografías de los 12 electroferotipos encontrados en la misma región en 1987 (22) y se pudo constatar: (a) por lo menos tres electroferotipos fueron completamente distintos, (b) en 1987 se encontró una sola muestra con patrón corto, (c) el patrón electroforético largo que predominó en este estudio fue diferente al patrón largo que predominó en el año 1987 en el cual los segmentos 7, 8 y 9 migraron como una sola banda. Esta comparación permitió establecer que después de cinco años han ocurrido en Cumaná cambios considerables de los electroferotipos, los cuales per-

miten inferir que el genoma de la población de rotavirus en la región experimenta cambios constantes.

Estos resultados también revelan que dos cepas de rotavirus con diferentes electroferotipos o diferentes serotipos pueden coexistir en una misma región. Esta multiplicidad de electroferotipos distintos puede deberse a mutaciones y arreglos del genoma viral (11, 37).

AGRADECIMIENTOS

El estudio de los subgrupos y serotipos de rotavirus fue posible gracias a la colaboración brindada por la Dra. Irene Pérez-Schael del Instituto de Biomedicina, Hospital Vargas, Caracas-Venezuela. También agradecemos la eficiente asistencia técnica prestada por el Lic. Y. Boher del mismo Instituto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ESTES M.: Rotaviruses and their replication en: Fields Virology. p 1625. Third edition, edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley *et al.* Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 1996.
- 2- BASTARDO J.W.: Rotavirus y gastroenteritis: una reseña con énfasis en la epidemiología, inmunidad y tratamiento de la enfermedad. p. 210. Editado por la Coordinación de Publicaciones del Rectorado de la Universidad de Oriente. Cumaná Estado Sucre. Venezuela. 1993.
- 3- KAPIKIAN A.Z., CHANOCK R.M.:

- Rotaviruses en: *Fields Virology*, p. 1657. Third edition, edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley *et al.* Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia. 1996.
- 4- PRASSAD B.V., WANG G.J., CLERX J.P.M., CHIU W.: Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* 1988; 199:269-275.
 - 5- TANIGUCHI K., URASAWA T., KOBAYASHI N., AHMED M.V., ADACHI N., CHIBA S., URASAWA S.: Antibody response to serotype-specific and cross-reactive neutralization epitopes on VP4 and VP7 after rotavirus infection or vaccination. *J Clin Microbiol* 1991; 29:483-487.
 - 6- ESPEJO R.T., AVENDAÑO L.F., MUÑOZ O., ROMERO P., ETERNOD J.G., LÓPEZ S., MONCAYA J.: Comparison of human rotaviruses isolated in Mexico city and Santiago, Chile, by electrophoretic migration of their double-stranded ribonucleic acid segments. *Infect Immun* 1980; 30:342-348.
 - 7- ESTES M.K., GRAHAM D.Y., DIMITROV D.H.: The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog Med Virol* 1984; 29:1-22.
 - 8- ESPEJO R.T., CALDERON E., GONZALEZ N., SALOMON A., MARTUSCELLI A., ROMERO P.: Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City, 1977. *J Infect Dis* 1979; 139:474-477.
 - 9- DYALL-SMITH M.L., HOLMES I. H.: Gene coding assignments of rotavirus double stranded RNA segments 10 and 11. *J Virol* 1981; 38:1099-1103.
 - 10- KALICA A.R., GREENBERG H.B., ESPEJO R.T., FLORES J., WYATT R.G., KAPIKIAN A.Z., CHANOCK R.M.: Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. *Infect Immun* 1981; 33:958-961.
 - 11- SETHI S.K., OLIVE D.M., STRANNEGARD O.O., AL-NAKIB W.: Molecular epidemiology of human rotavirus infections based on genome segment variations in viral strains. *J Med Virol* 1988; 26:249-259.
 - 12- ARMAH G.E., MINGLE J.A., DODOO A.K., ANYANFUL A., ANTWI R., COMMEY J., NRU-MAH F.K.: Seasonality of rotavirus infection in Ghana. *Ann Trop Pediatr* 1994; 14:223-229.
 - 13- MAUNULA L., VAN-BONSDORFF CH.: Rotavirus serotypes and electropherotypes in Finland from 1986 to 1990. *Arch Virol* 1995; 140:877-890.
 - 14- SPENCER E.G., AVENDAÑO L.F., GARCÍA B.I.: Analysis of human rotavirus mixed electropherotypes. *Infect Immun* 1983; 39:569-574.
 - 15- TABASSUM S., SHEARS P., HART C.A.: Genomic characterization of rotavirus strains obtained from hospitalized children with diarrhoea in Bangladesh. *J Med Trop* 1994; 43:50-56.

- 16- KAPIKIAN A.Z., YOLKEN R.H., GREENBERG H.B., WYATT R.G., KALICA A.R., CHANOCK R.M., KIM H.W.: Gastroenteritis viruses en: diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. p. 927. 5th edition. E.H. Lennette, N.J. Schmidt, eds. Washington, D.C. American Public Health Association, 1979.
- 17- GREENBERG H., McAULIFFE V., VALDESUSO J., WYATT R.G., FLORES J., KALICA A., HOSHINO Y., SINGH N.: Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1983; 39:91-99.
- 18- TANIGUCHI K., URASAWA T., MORITA Y., GREENBERG H.B., URASAWA S.: Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-2-3, and 4 specific monoclonal antibodies to VP7. *J Infect Dis* 1987; 155:1159-1166.
- 19- HERRING A.J., INGLIS N.F., OJHE C.K., SNODGRASS D.R., MENZIES J.D.: Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982; 16:473-477.
- 20- SAMBROOK J., FRITSTCH E.F., MANIATIS T.: Molecular cloning. A Laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- 21- UNICOMB L., BISHOP R.F.: Epidemiology of rotavirus strains infecting children throughout Australia during 1986-1987. A study of serotype and RNA electropherotype. *Arch Virol* 1989; 106:23-24.
- 22- MALDONADO A.J., BASTARDO, J.W.: Epidemiología molecular de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Acta Cient Venez* 1992; 43:368-372.
- 23- UHNOO I., SVENSSON L.: Clinical and epidemiological features of acute infantile gastroenteritis associated with human rotavirus subgroups 1 and 2. *J. Clin Microbiol* 1986; 23:551-555.
- 24- CALLEJAS D., ESTEVEZ J., BLITZ-DORFMAN L., GARCIA D.: Epidemiología molecular de subgrupos y serotipos de rotavirus en niños menores de cuatro años de la ciudad de Maracaibo con síndrome diarreico. *Invest Clin* 1994; 35(1):3-18.
- 25- YACHHA S.K., SINGH V., KANWAR S.S., MEHTA S.: Epidemiology, subgroups and serotypes of rotavirus diarrhea in north Indian communities. *Indian Pediatr* 1994; 31(1):27-33.
- 26- BIRCH C.J., HEATH R.L., GUST I.D.: Use of serotype-specific monoclonal antibodies to study the epidemiology of rotavirus infection. *J Med Virol* 1988; 24:45-53.
- 27- URASAWA S., URASAWA T., TANIGUCHI K., WAKASUGI F., KOBAYASHI N., CHIBA S., SAKURADA N., MORITA M., MORITA O., TOKIEDA M., KAWAMOTO H., MINEKAWA Y., OHSETO M.: Survey of human

- rotavirus serotypes in different locales in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1989; 160:44-51.
- 28- WHITE L., GARCÍA D., BOHER Y., BLANCO M., PÉREZ M., ROMER H., FLORES J., PÉREZ-SCHAEI I.: Temporal distribution of human rotavirus serotypes 1,2,3, and 4 in Venezuelan children with gastroenteritis during 1979-1989. *J Med Virol* 1991; 34:79-84.
- 29- O'RYAN M., MAMANI N., AVENDAÑO L.F., COHEN J., PEÑA A., VILLARROEL J., CHAVEZ A., PRADO V., VALDIVIESO F., KALTWASSER G., *et al.*: Antigenic types of circulating rotavirus in children with acute diarrhea in Santiago de Chile. *Rev Med Chil* 1995; 123(5):549-559.
- 30- GONZALEZ M.R., PUERTO M., POLANCO G.G., PENICHE R., PUERTO F.I.: Frequency of serotype G rotavirus isolated from children with diarrhea in Mérida, Yucatán, México. *Rev Invest Clin* 1994; 46(3): 215-219.
- 31- FLORES J., TANIGUCHI K., GREN K., PÉREZ-SCHAEI I., GARCÍA D., SEARS J., URASAWA S., KAPIKIAN A.Z.: Relative frequencies of rotavirus serotypes 1,2,3, and 4 in Venezuelan infants with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988; 26:2092-2095.
- 32- GIORDANO M.O., DEPETRIS A.R., NATES S.V.: Retrospective study of circulation of human rotavirus electroferotypes in the city of Cordoba, Argentina, 1979-1989. *Rev Argent Microbiol* 1995; 27(1): 1-10.
- 33- EL ASSOULI S.M., MOHAMMED K.A., BANJAR Z.M.: Human rotavirus genomic RNA electroferotypes in Jeddah, Saudi Arabia from 1988 to 1992. *Ann Trop Paediatr* 1995; 15(1):45-53, 1995.
- 34- SPENCER E., AVENDAÑO F., ARAYA M.: Characteristics and analysis of electroferotypes of human rotavirus isolated in Chile. *J Infect Dis* 1983; 148:41-48, 1983.
- 35- RODGER S.M., BISHOP R.F., BIRCH C., McLEAN B., HOLMES I.H.: 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.
- 36- SCHNAGL R.D., RODGER S.M., HOLMES I.H.: Variation in human rotavirus electroferotypes occurring between rotavirus gastroenteritis epidemics in central Australia. *Infect Immun* 1981; 33:17-21.
- 37- PEREZ-SCHAEI I., ROJAS A.M., FLORES J.: Desarrollo de un vacuna anti-rotavirus. Pruebas de campo en Venezuela. *Acta Cient Venez* 1991; 42:296-312.