

## ACTUALIZACIONES

## NUEVAS LUCES ACERCA DE UNA ANTIGUA ENFERMEDAD

H. HANSEN

### INTRODUCCION

La gastroenteritis viral, más correctamente denominada enteritis o enteropatía aguda, es causa común de enfermedad en el hombre. En los Estados Unidos es usualmente insignificante desde el punto de vista de severidad, duración y cuidado médico pero, por el contrario, en los países en vía de desarrollo es un problema importante y significativo. Se estima que es responsable de más de 500 millones de episodios de diarrea y de 5 a 18 millones de muertes anuales (1).

Un número considerable de virus ha sido implicado como agentes etiológicos de la gastroenteritis. Su identificación y caracterización adecuada y un claro entendimiento de la epidemiología son indispensables para encontrar medidas preventivas, especialmente para desarrollar vacunas efectivas y disponibles para la comunidad. Teniendo en mente estas metas presento a

discusión los más importantes virus asociados con gastroenteritis, separándolos en tres grupos fundamentales: (a) el agente Norwalk y sus relacionados; (b) los rotavirus del hombre y los animales, y, (c) otros virus implicados como probable causa de diarrea en el hombre (2).

### AGENTE NORWALK Y SIMILARES

Desde 1972 un nuevo grupo de agentes infecciosos, entre los cuales el agente Norwalk se ha considerado como el prototipo, se ha venido encontrando asociado a brotes epidémicos de gastroenteritis en poblaciones escolares, en su comunidad y en sus asentamientos familiares. El agente Norwalk fue descubierto en un brote de gastroenteritis en la localidad de Norwalk, Ohio, en octubre de 1968 (3). El 50% de los alumnos y profesores de una escuela elemental y el 32% de sus contactos familiares enfermaron. El ataque se produjo en un período de 24 horas con una sintomatología caracterizada por náuseas, vómito y ruidos intestinales aumentados. Los síntomas persistieron de 12 a 24 horas, sin requerirse hospitalización con una recuperación progresiva y total. Debido a la sorpresa que ocasionó el brote y a la

---

Dr. Henry Hanssen: Profesor Asociado, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. Actualmente en entrenamiento: Department of Virology/Epidemiology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston, Texas 77030U.S.A.

Solicitud de separatas al Dr. Hanssen.

elevada rata de ataque, las autoridades del Servicio de Salud Pública los estudiaron cuidadosamente (2, 3). Los hallazgos revelaron ausencia de diseminación por el agua o los alimentos. No se encontraron bacterias patógenas y los síntomas fueron considerablemente diferentes a los encontrados usualmente en los casos de diarrea por bacterias. Con el material obtenido del filtrado de las heces de los pacientes comprometidos en el brote, la enfermedad se reprodujo en los voluntarios susceptibles y pudo, subsecuentemente, transmitirse de un voluntario a otro en forma seriada. El agente no se ha podido reproducir en ningún sistema celular, ni en cultivos de órganos, e inicialmente sólo se logró su visualización mediante la inmunoelectromicroscopía (IEM) en un filtrado de heces contaminadas. Recientemente, también se observó en el vómito de cuatro de cinco voluntarios que desarrollaron gastroenteritis después de la administración de un filtrado infeccioso de materias fecales.

El material obtenido desde entonces ha permitido estudiar y analizar estos agentes desde el punto de vista bioquímico y biofísico (4, 5). Los agentes Norwalk tienen un diámetro de 25-27 nanómetros y, aunque no son perfectamente redondos, son similares morfológicamente a los parvovirus. No se ha apreciado todavía una estructura clara y definitiva al microscopio electrónico. Estos agentes hasta el momento no han sido reproducidos *in vitro* y, por lo tanto, su detección está limitada a la utilización de técnicas como la microscopía electrónica (EM), la IEM y el radioinmunoensayo (RIA) (5, 6).

Las partículas Norwalk tienen una densidad de flotación en cloruro de cesio de 1,37 a 1,41 g/cm<sup>3</sup>, determinada por ultracentrifugación (7). El ácido nucleico y el contenido de proteínas de este tipo de agentes se desconoce. Son estables después de exposición a un pH de 2,7 durante tres horas a temperatura ambiente ya que permanecen infecciosos como se ha podido

demostrar en voluntarios susceptibles. Así mismo, son estables en éter hasta por períodos de 24 horas y en el calor, conservando su infectividad en voluntarios aún después de ser sometidos a 60°C de temperatura durante 30 minutos (8).

Debido a que el contenido de ácido nucleico de estos agentes no ha sido analizado, no pueden aún agruparse según la actual clasificación viral (10). Sin embargo, el agente Norwalk comparte ciertas características con los parvovirus (9), tales como la morfología, la densidad y la resistencia relativa al éter, al ácido y al calor.

El agente Norwalk ha sido administrado a ratones, cobayos, conejos, gatos, terneros, monos babuinos (baboon), monos *Macacus*, chimpancés y también en algunas especies de monos suramericanos: *Cebus albifrons*, *Saimiri sciurens*, *Aotus trivirgatus*, *Ateles geoffroyi*. En ninguna de estas especies animales se ha desarrollado la enfermedad (11). De todas ellas, solamente en el chimpancé se ha logrado desarrollar una respuesta serológica al agente Norwalk y demostrar la excreción del antígeno de Norwalk mediante RIA (12).

Partículas semejantes morfológicamente al agente Norwalk, y también similares en densidad, fueron descubiertas mediante IEM en un brote intrafamiliar de gastroenteritis en individuos de dos familias. Estas partículas han sido denominadas el agente Hawaii y el agente MC, encontrado en el condado de Montgomery, Maryland (13, 14).

Mediante IEM y por estudio en voluntarios se ha encontrado que el agente Hawaii y el agente Norwalk son distintos; pero el agente MC y el Norwalk están relacionados (15). Otros virus similares en morfología y densidad al agente Norwalk han sido observados recientemente en especímenes fecales de (i) un brote de gastroenteritis en una escuela primaria en Ditchling, Inglaterra, de (ii) un voluntario que

se enfermó después de la administración de un agente denominado "W" obtenido de un niño que desarrolló gastroenteritis durante un brote de diarrea en un grupo escolar y, de (iii) individuos que desarrollaron gastroenteritis después de comer platos exóticos de algunas especies de moluscos bivalvos. Los agentes Ditchling y "W" aparentemente están relacionados entre sí pero son diferentes a los agentes Hawaii y Norwalk de acuerdo con lo que se ha observado en los estudios de IEM. No se tienen datos concluyentes acerca de los agentes detectados en los individuos con gastroenteritis después de la ingestión de moluscos (2, 13-15).

**Características clínicas y epidemiológicas.** De los 604 casos primarios y secundarios del brote de Norwalk, el 85% presentó náusea, el 84% vómito, el 52% ruidos abdominales aumentados, el 57% letargia, el 44% diarrea, el 32% fiebre y el 5% escalofrío. Los síntomas duraron de 12 a 24 horas en la mayoría de los casos y raras veces se prolongaron por un período mayor de 48 horas (2, 16, 17). Los signos y síntomas observados en 32 de 55 voluntarios, que desarrollaron enfermedad después de la administración de filtrados de materias fecales conteniendo el agente Norwalk, aparecen en la Tabla I.

En este grupo particular de voluntarios la enfermedad fue relativamente moderada y limitada, pero cabe mencionar que se han descrito casos en los cuales el paciente ha

presentado más de 20 episodios de vómito en menos de 24 horas requiriéndose la administración de líquidos parenterales: La excreción del agente se ha podido detectar hasta por un período de 72 horas después de las apariciones de los primeros signos y síntomas (2-14, 16, 17).

La participación del agente Norwalk en brotes de gastroenteritis viral ha sido evaluada últimamente. Con el reciente desarrollo del RIA para su detección ha sido posible estudiar al menos 23 brotes diferentes de gastroenteritis en diferentes partes del mundo. Seis de los 23 brotes han sido asociados con el agente Norwalk. De estos seis, dos ocurrieron en colegios de los Estados Unidos, uno en una escuela primaria del Japón, dos en viajes turísticos en barcos comerciales y uno en varios miembros de una familia de los Estados Unidos (2). La imposibilidad de responsabilizar otros agentes etiológicos como el Hawaii y el agente "W" del resto de brotes estudiados se ha debido esencialmente a la carencia de un procedimiento serológico sensible y completamente estandarizado.

**Cambios histológicos observados durante la infección.** El estudio de biopsia realizado en voluntarios infectados por los agentes Norwalk y Hawaii han permitido caracterizar las lesiones que ocasionan a nivel intestinal. Generalmente se presenta ensanchamiento y acortamiento de la mucosa yeyunal y usualmente se observa un moderado infiltrado mononuclear y vacuolización citoplasmática de las células epiteliales. El examen de cortes delgados de porciones de yeyuno mediante microscopía electrónica ha revelado acortamiento de las microvellosidades, dilatación del retículo endoplásmico liso y rugoso, así como edema de las mitocondrias y un incremento en el número de lisosomas. Hasta el presente no se han podido observar partículas virales en el interior de las células. Después de cuatro a seis días de la infección, la apariencia del tejido es normal. Los niveles de las enzimas del epitelio intestinal,

**Tabla 1.** Signos y síntomas observados en la infección experimental por el agente Norwalk en 32 enfermos infectados voluntariamente. Norwalk, Ohio, 1974.

SIGNO 0 SINTOMA	Nº	PORCENTAJE
Fiebre (37,5°C)	16/32	50%
Diarrea	27/32	84%
Vómito	20/32	63%
Ruidos abdominales aumentados	23/32	72%
Anorexia	30/32	94%
Cefalea	27/32	84%
Mialgias o malestar	20/32	63%

\* Período de incubación de 12-51 horas.

trealosa, fosfatasa alcalina y sucrasa, se encuentran disminuidos. De otro lado, la actividad de la adenilciclasa a nivel yeyunal permanece normal (18-20).

**Métodos de diagnóstico.** Se han desarrollado algunas técnicas de laboratorio para detectar las infecciones por estos agentes. Estos procedimientos están dirigidos esencialmente a: (1) detectar el agente responsable por examen directo de las heces mediante IEM; y, (2) medir los anticuerpos producidos contra estos agentes mediante los procedimientos del bloqueo del radioinmunoensayo (RIA-BL) y más recientemente por la prueba de hemaglutinación por inmunoadherencia (IAHA)(21).

#### DETECCION DEL ANTIGENO

**IEM.** Mediante este procedimiento el agente Norwalk puede ser detectado en materias fecales. El procedimiento es simple y consiste esencialmente en incubar una suspensión o filtrado de heces con un suero de convaleciente o gammaglobulina de tipo Norwalk. La mezcla es centrifugada, el sobrenadante se descarta y el sedimento se reconstituye en agua destilada; se colorea por tinción negativa y se examina al microscopio electrónico. Los agentes del grupo Norwalk son indiferenciables morfológicamente mediante microscopía electrónica (10, 13).

**RIA.** La detección del agente Norwalk en especímenes fecales mediante la prueba de radioinmunoensayo fue desarrollada recientemente y parece ser más eficiente que la IEM. El ensayo se basa en el enlace diferencial de suspensiones de heces que contienen el agente Norwalk a pequeños pozos de un microplato de polivinilo. Una serie de pozos del microplato han sido cubiertos por suero convaleciente y otra con suero no inmune.

La suspensión de heces se confronta por separado con los dos tipos de suero en los pozos del microplato. Paso seguido, se

añade una inmunoglobulina G anti-agente Norwalk marcada con  $I^{125}$ . Los platos se incuban por un tiempo determinado, los pozos se lavan varias veces (3-5) con una solución salina y finalmente se mide la radiactividad en un contador de partículas gamma. Se consideran como muestras positivas aquellas con una radiactividad, en términos de cuentas por minuto (CPM), cuatro veces superior a la del control negativo (22).

#### DETECCION DE ANTICUERPOS

**RIA-BL.** Esencialmente es una modificación del procedimiento para detectar antígeno, basada en la habilidad del suero a examinar o suero problema para bloquear el alcance de la gammaglobulina anti-agente Norwalk ( $I^{125}$ -IgG) al antígeno de Norwalk. La prueba es altamente sensible y específica y más eficiente que la IEM en la medición de la respuesta serológica. Es aplicable en gran escala y puede usarse para detectar anticuerpos prácticamente en cualquier líquido del cuerpo, por ejemplo, en secreciones intestinales, en saliva, en calostro y en leche materna (2, 80).

**IAHA.** Es una prueba bastante específica para la detección de anticuerpos y tiene un alto grado de concordancia con la prueba de (RIA-BL). Utiliza un antígeno preparado a partir de heces que contienen el agente Norwalk. El antígeno se obtiene mediante varios pasos de extracción y concentración de las heces de un individuo infectado y, por lo tanto, la dificultad en la obtención del antígeno se constituye en la principal desventaja del método. Para la hemoaglutinación se emplean eritrocitos humanos tipo O. Los reactivos de la prueba incluyen soluciones costosas y de cuidadosa preparación. Otra gran desventaja del procedimiento es la necesidad de examinar numerosos donantes de eritrocitos tipo O ya que no todos los eritrocitos reaccionan en forma comparable en la prueba. Este procedimiento es recomendable sólo para aquellos laboratorios que tengan ya establecido el procedimiento del RIA, donde

puedan evaluarse y compararse los resultados mediante los dos sistemas. Se tiene la esperanza de poder llegar pronto a una simplificación del procedimiento (2).

### ROTAVIRUS

Los rotavirus fueron detectados en el hombre por primera vez en Australia, en 1973, con el microscopio electrónico en cortes finos de biopsias duodenales de niños con diarrea aguda (23). Posteriormente fueron observados en especímenes fecales de niños con diarrea en Inglaterra, Australia, Canadá y Estados Unidos (24).

Las partículas de rotavirus tienen 70 nm de diámetro, contienen ácido ribonucleico bicatenario y polisegmentado (25); poseen una cápside doble representada por una estructura interna y otra externa. Derivan su nombre de la palabra latina "rota" que significa rueda. Su apariencia similar a la de las ruedas de automóvil hace su nombre particularmente fácil de recordar. Inicialmente se les describió como "orbivirus", "duovirus", "agentes similares a reovirus", y "virus de gastroenteritis infantil" (26-28).

Los rotavirus humanos son morfológicamente similares y comparten ciertos antígenos comunes con los rotavirus animales. Mediante pruebas de fijación de complemento los rotavirus humanos han mostrado estar estrechamente relacionados con, por lo menos, cuatro tipos de rotavirus de animales: los virus de la diarrea de los terneros de Nebraska (NCDV), el virus de la diarrea epizootica de los ratones recién nacidos (EDIM), los rotavirus de simios (SA 11) y el agente 'O' de ovejas y terneros. En efecto, los antígenos de cualquiera de estos virus animales pueden usarse para demostrar serológicamente la infección por rotavirus en el hombre. Esta característica ha sido muy útil en la realización de estudios epidemiológicos debido a las limitaciones para reproducir eficientemente los rotavirus humanos en cultivos celulares (29-31).

**Características clínicas.** El período de incubación de la enteritis por rotavirus varía entre uno y siete días pero usualmente es menor de 48 horas. En estudios con voluntarios se ha observado que la diarrea ocurre de dos a cuatro días después de la administración oral del inóculo de rotavirus. Usualmente el vómito es un síntoma notorio y temprano, y muchas veces precede a la diarrea. El 25% de los casos presentan diarrea con moco pero el hallazgo de sangre es raro. La elevación de la temperatura ocurre aproximadamente en 20-50% de los casos. Se han informado síntomas respiratorios pero no hay suficiente evidencia para pensar que sean causados por el virus. Como en otras infecciones entéricas, el grado de severidad varía; el promedio de duración de la enfermedad es de cinco a siete días y la eliminación de virus continúa usualmente hasta el décimo día. En los casos más severos se han presentado deshidratación grave y desequilibrio electrolítico. Se han informado muertes por diarrea por rotavirus y se presume que su impacto en la mortalidad infantil de los países menos desarrollados puede ser de grandes proporciones aunque falta determinarla (32-34).

En adultos la infección ocasiona episodios de diarrea moderados o, más comúnmente, es de tipo subclínico. Por razones aún no completamente establecidas las infecciones en recién nacidos son frecuentemente asintomáticas o muy moderadas (35-37).

**Fisiopatología.** Los conocimientos sobre la fisiopatología de la diarrea por rotavirus han sido derivados de los estudios realizados en biopsias de intestino de terneros gnotobióticos privados de calostro e infectados con rotavirus humanos. Los estudios de estas biopsias en forma seriada han revelado una secuencia de eventos a nivel del intestino delgado derivados de la infección de las células absortivas epiteliales intestinales. Se observa reemplazo de las células del epitelio ciliado columnar por células cuboidales. Hay un considerable

acortamiento de las vellosidades, infiltración linfocítica de la lámina propia y, finalmente, reparación del epitelio por renovación. Estos cambios se observan en dirección céfalo-caudal y sugieren que gran parte de la patogénesis de este tipo de diarrea puede estar relacionada con la pérdida de la capacidad de absorción del intestino delgado. Se han hecho observaciones similares en biopsias de tejido intestinal de infantes con diarrea por rotavirus (38).

Un aspecto de considerable interés ha sido la discusión sobre la posible producción de diarrea crónica por rotavirus, pero hasta el momento no se conocen estudios que hayan intentado probar esta hipótesis. Los pacientes con diarrea aguda por rotavirus usualmente presentan un marcado incremento de sustancias reductoras en las heces, lo cual refleja alteración de la absorción y la digestión de los carbohidratos. Esto no parece ser sorprendente dada la fisiopatología de la enfermedad. También hay que señalar que estas anomalías no impiden la hidratación con soluciones orales de glucosa y electrolitos (39). Los rotavirus humanos pueden inducir diarrea en otros animales recién nacidos privados de calostro, incluyendo terneros, cerditos gnotobióticos y convencionales, monos *Macacus* y corderos gnotobióticos. También pueden infectar perros recién nacidos sin causarles enfermedad evidente. El hecho de que solamente los animales recién nacidos son susceptibles a la infección por rotavirus humanos no se ha explicado completamente. Una hipótesis es que se deba a las altas concentraciones de lactasa en los animales infantes y a que esta enzima actúe como receptor o como enzima facilitante de la infección (40-42).

**Incidenia.** La enteritis por rotavirus es generalmente una enfermedad de niños con una distribución mundial. Los rotavirus se han constituido en los virus más frecuentes observados en las heces de niños con diarrea en casi todas las áreas geográficas donde se han investigado. La mayoría de

los casos se presentan en niños de 6 a 24 meses de edad con un pico de incidencia entre los 9 y los 12 meses. En países desarrollados y en países en vía de desarrollo, los rotavirus se han detectado en aproximadamente el 50% de los casos de niños con diarrea, algunas veces con cierta variación estacional y siendo el sexo masculino el más afectado (43, 44).

Varias encuestas serológicas han determinado la frecuencia de la infección por rotavirus en niños de diferentes países. Los procedimientos de laboratorio más frecuentemente utilizados con este propósito han sido la fijación de complemento, la contrainmunolectroforesis y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). En Australia el 40% de los niños menores de dos meses ya tienen evidencia de anticuerpos anti-rotavirus. En la India, y usando la prueba de contrainmunolectroforesis, se demostró la presencia de anticuerpos en el 85% de los recién nacidos (45-47). En un área de Australia, en nativos y europeos y utilizando la técnica de ELISA, se ha demostrado que el 100% de las personas examinadas para anticuerpos anti-rotavirus en edades comprendidas entre los 2 y los 68 años presentaron evidencia de infección. La temprana y rápida aparición de anticuerpos en la infección por rotavirus sigue en términos generales el mismo patrón que en las infecciones por virus de parainfluenza 3 y virus respiratorio sincitial (48,49).

Existe evidencia reciente acerca de la existencia de más de un serotipo de rotavirus humanos. Mediante los procedimientos de fijación de complemento e IEM, de neutralización de focos fluorescentes y de ensayo inmunoenzimático en Bélgica, en Inglaterra y en los Estados Unidos, respectivamente, se han definido por lo menos dos serotipos. Estos serotipos parecen tener muy amplia distribución geográfica. Aún en distritos tan limitados como el área metropolitana de la ciudad de Washington existe evidencia de infección causada por los dos serotipos. También es probable que existan otros serotipos adicionales (2).

**Prevalencia.** Se ha demostrado por estudios realizados en Norteamérica, Inglaterra y Australia que la enfermedad por rotavirus en los climas cálidos es mucho más prevalente en las estaciones frías. Una excepción a esta observación ha sido la infección en recién nacidos la cual no tiene variación estacional especialmente cuando se estudia en albergues infantiles. En el trópico la enfermedad parece ser prevalente en las estaciones lluviosas y de menor temperatura (2, 32, 33, 37, 40).

**Transmisión.** En la actualidad todo parece indicar que la infección por rotavirus se hace por la vía oral-fecal. La transmisión por esta vía ha sido confirmada por experimentos en numerosos voluntarios y en animales. Los enterocitos del intestino delgado parecen ser el único lugar de replicación de estas partículas infecciosas de rotavirus. A pesar de la presencia de anticuerpos tipo inmunoglobulina A en la leche y en el calostro, todavía no está claro si estas secreciones tienen algún papel en la protección contra la infección, especialmente en los países pobres donde la alimentación de pecho en los recién nacidos se prolonga hasta por períodos mayores de 6 meses después del nacimiento. Se han informado varios brotes de diarrea por rotavirus en guarderías infantiles y en hospitales pediátricos. El problema de la transmisión nosocomial de los rotavirus ha sido muy difícil de controlar (2, 50, 51).

**Rotavirus en otras enfermedades.** La infección por rotavirus se ha observado en niños con intususcepción o con gastroenteritis hemorrágica. El síndrome de Henoch-Schoenlein también se ha observado en este último grupo de pacientes. Se encontró un caso de severo compromiso del sistema nervioso central con desarrollo y desenlace fatal de un síndrome de Reye en un niño infectado por rotavirus. La encefalitis también ha sido informada y varios niños han desarrollado síndrome urémico hemolítico y coagulación intravascular diseminada. Niveles altos de transaminasas son detectados a menudo. Los rotavirus se

han aislado en pacientes con enfermedad de Crohn. El papel de los rotavirus en las condiciones mencionadas anteriormente no ha sido aclarado y requiere estudios cuidadosos en el futuro (2).

**Diarrea en animales.** Los rotavirus son agentes infecciosos de amplia distribución y se han demostrado en varias especies animales como ratones, terneros, cerdos, conejos, venados, antílopes, gallinas, pavos, cabras, gatos, chimpancés y gorilas. La infección de estos animales por lo general ocurre temprano en la vida. En algunos animales tales como lechones y terneros las infecciones por rotavirus son muy severas causando una mortalidad hasta del 90% durante los brotes epidémicos (52-59).

**Vacuna anti-rotavirus.** El desarrollo de una vacuna anti-rotavirus en los humanos es prioritaria en la prevención de la diarrea de los infantes y los recién nacidos. Sin embargo, se hace indispensable un claro entendimiento de los mecanismos por los cuales se adquiere inmunidad contra la infección. Los estudios realizados en animales han demostrado la gran importancia de los anticuerpos a nivel del tracto gastrointestinal para prevenir y disminuir la sintomatología durante la infección por rotavirus. En estudios experimentales, los anticuerpos administrados por vía oral han probado su efectividad para inducir resistencia a la infección producida con un inóculo fresco e infeccioso administrado por la misma vía. Este efecto no se ha observado con los anticuerpos circulantes. Además los estudios realizados en voluntarios humanos prueban que existe una correlación mejor y más específica entre la inmunidad conferida por los anticuerpos tipo inmunoglobulina A del tracto intestinal y la conferida por los anticuerpos tipo inmunoglobulina G del suero (76-78). Esto indica que los anticuerpos a nivel de la superficie epitelial del intestino delgado son de extrema importancia en la resistencia a la infección por rotavirus. Por lo tanto, una aproximación para obtener una efec-

tiva inmunoprofilaxis en la infección por rotavirus es el desarrollo de una vacuna de administración oral capaz de estimular suficiente inmunidad local a nivel intestinal de anticuerpos tipo inmunoglobulina A (79-81).

Un serio obstáculo para este propósito ha sido la dificultad para reproducir eficientemente los rotavirus humanos en cultivos celulares que permitirían producir suficiente antígeno para los estudios de vacunas. Otra dificultad ha sido la duración de la inmunidad a nivel intestinal; la incertidumbre surgió como consecuencia de los estudios realizados con el agente Norwalk en adultos voluntarios los cuales se reinfectaron al ser inoculados por segunda vez después de períodos que variaron de 27 a 42 meses. La existencia de varios serotipos de rotavirus humanos complica el advenimiento de la inmunoprofilaxis ya que de acuerdo con los análisis iniciales no parece existir protección cruzada en la infección por estos agentes (82).

Las perspectivas para el logro de una vacuna eficiente están completamente abiertas a la investigación actual en el área de los rotavirus. Propuestas en distintos sentidos se prevén para el futuro inmediato. Entre ellas se destacan la producción de una vacuna a partir de un agente no humano, por ejemplo, con los rotavirus porcinos previamente atenuados en el laboratorio. Una segunda alternativa, ante la imposibilidad de cultivar eficientemente los virus humanos, sería la de fabricar alternativamente una recombinante viral entre un virus humano y un virus animal, considerando que este último contribuyera al "híbrido" con la habilidad de crecer efectivamente, mientras que el virus humano aportara la habilidad de estimular antigénicamente e inducir una respuesta de anticuerpos. Una tercera alternativa surgida más recientemente, es la de utilizar una vacuna de una fracción purificada de las partículas virales una vez se conozcan apropiadamente las funciones biológicas de

cada uno de los polipéptidos presentes en los rotavirus. No obstante las anteriores dificultades, deben continuarse ininterrumpidamente los esfuerzos sustanciales para lograr una inmunoprofilaxis adecuada, considerando la prioridad que tiene el estudio de esta enfermedad (2).

## MÉTODOS DE DIAGNOSTICO

### **Electro e inmunoelectromicroscopía.**

En las infecciones humanas un gran número de partículas de rotavirus es excretado en las heces. El período óptimo para la detección de los virus lo constituyen los 3 a 5 primeros días después de la aparición de los síntomas. Generalmente, las partículas virales pueden ser observadas fácilmente con microscopía electrónica mediante técnicas de tinción negativa. Algunas veces su visualización se optimiza mediante la centrifugación diferencial. El tamaño y las características de la estructura de doble cápside de las partículas pueden ser fácilmente reconocidas. Las heces que contienen pocas partículas pueden ser analizadas mediante IEM con la adición de un antisuero específico al extracto de heces para lograr la agrupación de las partículas y hacerlas más fácilmente identificables. El microscopio electrónico es un instrumento bastante eficiente para la detección de las infecciones por rotavirus; sin embargo, no deja de ser un equipo costoso cuyos procedimientos de preparación toman bastante tiempo y no todos los laboratorios poseen estas facilidades, especialmente en los países con escasos recursos económicos. Por lo tanto, el uso de otros métodos de diagnóstico se ha hecho indispensable (2, 33,60,61).

**Contrainmunolectroforesis.** Es un método rápido, de bajo costo pero su sensibilidad depende esencialmente de la calidad del antisuero antiviral utilizado. Algunos autores afirman que su sensibilidad es similar o superior a la de la microscopía electrónica pero otros afirman lo contrario (62).

**Fijación del complemento.** Se han empleado varias pruebas modificadas de fijación de complemento que han resultado tan sensibles como la electromicroscopía. Su complejidad y el problema de que un buen número de extractos fecales resultan anticomplementarios han disminuido considerablemente su utilidad (63).

**RIA y ELISA.** Estos dos procedimientos han sido utilizados con mucho éxito en la detección de infecciones por rotavirus. Actualmente son considerados como los procedimientos más sensibles. No obstante cuando se emplea el ELISA, la positividad de los especímenes debe confirmarse mediante el ensayo de "bloqueo" con los reactivos apropiados. El uso del RIA está limitado por el empleo de sustancias radiactivas, el costo de las mismas y el equipo sofisticado para efectuar la lectura del procedimiento. En resumen, la prueba de ELISA se muestra como la más aplicable en estudios de campo donde se requiere examinar un gran número de especímenes (64-66).

**Inmunofluorescencia.** La localización por fluorescencia de células infectadas con rotavirus, bien sea en preparaciones obtenidas directamente de las heces o en preparaciones de cultivos celulares previamente inoculados con extractos fecales, también se ha empleado como método diagnóstico. Su principal inconveniente es la abundancia de falsos positivos por fluorescencia inespecífica (67, 68).

**Prueba de peroxidasa-antiperoxidasa.** Es un procedimiento altamente sensible para la detección de rotavirus en células infectadas y es aplicable en el estudio retrospectivo de tejidos previamente fijados y embebidos en parafina. También es útil para estudiar la patogénesis de la infección de rotavirus desde el punto de vista experimental. Esta prueba inmunocitoquímica se está empleando actualmente para el estudio de la morfogénesis de los rotavirus a nivel celular, en microscopía de luz y en microscopía electrónica (69).

**Titulación de anticuerpos.** Prácticamente todos los procedimientos mencionados anteriormente se han empleado con este propósito siendo, desde luego, el ELISA el más experimentado y recomendado. La sensibilidad del procedimiento es óptima y tiene adicionalmente la ventaja de poder adaptarse para la medición de cualquier clase de inmunoglobulina, en prácticamente todo tipo de secreción (70-72).

**Identificación de serotipos y cepas.** Mediante la fijación del complemento, la inmunofluorescencia y la IEM se ha demostrado que los rotavirus comparten un antígeno común de grupo asociado con la cápside interna de las partículas virales. Sin embargo, los rotavirus humanos pueden ser diferenciados de los rotavirus animales por pruebas de neutralización de focos fluorescentes y por pruebas de bloqueo del ELISA. La existencia de por lo menos dos serotipos de rotavirus humanos se ha puesto en evidencia mediante los procedimientos mencionados anteriormente. La migración electroforética del ácido nucleico viral de los rotavirus ha resultado ser útil para distinguirlos. El procedimiento se reduce a estudiar los parámetros de migración de los diversos segmentos del ácido nucleico en geles verticales de poliacrilamida. Sin embargo, no se ha podido establecer una relación directa entre los serotipos y los "electroretipos" y probablemente las diferencias detectadas por esta técnica no reflejan una diferencia antigénica (73-75).

## OTROS VIRUS IMPLICADOS

Un gran número de agentes virales ha sido identificado y su papel etiológico en la diarrea aguda no está completamente claro. Pueden dividirse en dos grandes grupos: uno de ellos está constituido por virus ampliamente conocidos tales como los adenovirus, coronavirus y enterovirus, el otro comprende agentes o partículas virales que han sido descritas por diferentes autores y que se han denominado como astrovirus, calicivirus y mini-rotavirus.

**Adenovirus.** Los adenovirus están bien identificados como virus respiratorios; se conocen por lo menos 33 serotipos y los más comunes pueden ser aislados frecuentemente de materias fecales. Recientemente, diferentes autores han informado el hallazgo de partículas morfológicamente indiferenciables de los adenovirus, en heces de pacientes con diarrea. Estas partículas no se han podido cultivar en células; la razón de este fenómeno es desconocida. Los adenovirus han sido encontrados por microscopía electrónica en cerca del 5 al 8% de niños normales. En algunos de estos niños la excreción de las partículas virales se ha prolongado por períodos considerables. Ningún serotipo de adenovirus se ha asociado convincentemente con diarrea a pesar de que esporádicamente se han descrito brotes epidémicos; por lo tanto la verdadera contribución de los adenovirus como causa de diarrea queda aún por establecerse (83-85).

**Coronavirus.** La importancia de los coronavirus como causa de diarrea es aún confusa. Existe evidencia de la presencia de coronavirus en por lo menos tres brotes epidémicos de diarrea en adultos y las partículas aisladas en uno de estos brotes ha podido cultivarse en órganos y cultivos celulares. No se han realizado estudios en voluntarios. Los coronavirus, sin embargo, infectan muchos animales y en ellos causan una gran variedad de síntomas clínicos. Son también responsabilizados de infecciones respiratorias en los humanos (86-89).

**Enterovirus.** Por lo menos 70 enterovirus diferentes han sido identificados y solamente exceptuando dos, todos han sido aislados de las heces. Los enterovirus son similares vistos al microscopio electrónico, semejando pequeñas esferas de 25 nm de diámetro. Los procedimientos para el aislamiento de los enterovirus han estado disponibles desde hace unos 10 años y numerosos investigadores han intentado implicarlos como causa de diarrea. En

términos generales, no existe evidencia convincente que los acredite como verdaderos responsables de episodios diarreicos (2,90).

**Astrovirus.** Fueron descritos por primera vez en Escocia en 1975. Se observaron en heces diarreicas de infantes y posteriormente se siguieron encontrando en pacientes de diferentes áreas geográficas de Inglaterra. Partículas similares se han informado en Australia y Canadá. Estas partículas no crecen en líneas celulares de uso rutinario en los laboratorios de virus pero lo hacen en forma limitada en líneas celulares embrionarias de riñón humano, en las cuales pueden ser detectados por inmunofluorescencia usando un anticuerpo preparado en cobayo (91). El papel de los astrovirus como agentes etiológicos de la diarrea tampoco está completamente claro; sin embargo, han sido asociados más frecuentemente con casos de diarrea que con los casos controles en estudios bien establecidos epidemiológicamente. El incremento de anticuerpos posterior a la infección se ha probado en estudios de IEM. También se han observado partículas morfológicamente similares en algunas especies de animales, particularmente en corderos y terneros en los cuales se cree que causan diarrea. La transmisión experimental de estas partículas a corderos y terneros gnotobióticos ha hecho posible reproducir los episodios de diarrea y han permitido demostrar la seroconversión (92-94).

**Calicivirus.** Fueron descritos por primera vez en Escocia en 1976, en las heces de infantes y de recién nacidos. Se conocen informes de otros laboratorios en Inglaterra y Canadá. No se han podido cultivar en células humanas o animales. Se implicaron como responsables de un brote de "vómito del invierno" en una comunidad infantil. Fueron observados en los casos pero no en los contactos de los individuos comprometidos en el brote. No hay prueba de una asociación definitiva de los calicivirus con la gastroenteritis viral (95-97).

**Mini-rotavirus.** Algunos extractos de heces han demostrado la presencia de varios tipos de partículas similares a los rotavirus pero con un diámetro de 25 a 35 nm. Estas partículas son diferentes de cualquier otro material o artefacto observable al microscopio electrónico. Se han venido asociando con brotes de diarrea en comunidades e instituciones. Se han detectado partículas similares en perros y en cerdos sin que se haya podido establecer el significado de su presencia. Como los otros grupos de virus descritos anteriormente queda por establecer su participación real en la diarrea de los humanos (98-100).

### CONCLUSIONES

Es importante definir la responsabilidad de los nuevos agentes infecciosos en la etiología de la enfermedad. Por lo tanto es indispensable diferenciar entre los virus asociados a diarrea y los que son indudablemente agentes etiológicos de ella.

Las pruebas de causalidad de las enfermedades infecciosas fueron establecidas por Koch en 1890 (101). Los postulados de Koch establecen que un organismo debe aislarse regularmente de los pacientes con la enfermedad y además guardar una relación lógica con los cambios patológicos observados. El organismo aislado debe crecer en cultivos puros y debe mostrar su capacidad para causar la misma enfermedad en animales susceptibles o en humanos. Finalmente, Koch estableció que el organismo debe aislarse de los individuos y/o animales en los cuales se indujo experimentalmente la enfermedad. Debido a la dificultad para cultivar varios agentes virales Thomas Rivers (102) y más tarde Roberto Huebner (103) propusieron algunas modificaciones a los postulados de Koch, los cuales permiten llegar a la prueba de causalidad en las enfermedades virales. Ellos sugirieron que los virus deben asociarse regularmente con la enfermedad. La enfermedad debe ser transmisible a huéspedes susceptibles con material libre de

agentes no virales. Los estudios inmunológicos de casos y controles deben excluir que el virus en cuestión esté presente en forma fortuita en los individuos involucrados. Los análisis inmunológicos, tales como demostrar la ausencia de anticuerpos antes de la infección y su desarrollo durante la infección, son también pilares fundamentales de las modificaciones a los postulados de Koch. De los muchos virus identificados en materias fecales de humanos, solamente dos grupos cumplen los criterios como agentes etiológicos definitivos de gastroenteritis viral en humanos. Ellos son los agentes de tipo Norwalk y los rotavirus.

### BIBLIOGRAFIA

- 1.— ELLIOT K, KNIGHT J. Acute diarrhea in childhood, Ciba Foundation Symposium 42, Amsterdam, Elsevier/Excerpta Medica, 1976; 341.
- 2.— World Health Organization, Diarrhoeal diseases control program. Rotavirus and other viral diarrhoeas. Report on Epidemiology and Etiology. Washington, D.C., 1979.
- 3.— ADLER JL, ZICKL R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 1969; 119: 668.
- 4.— DOLIN R, BLACKLOW NR, DUPONT H et al. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 1971; 123: 307.
- 5.— DOLIN R, BLACKLOW NR, Dupont H et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 140: 578.
- 6.— KAPIKIAN AZ, WYATT RG, DOLIN R et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10:1075.
- 7.— KAPIKIAN AZ, GERIN JL, WYATT RG et al. Density in cesium chloride of the 27-nm "8FIIa" particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis; determination by ultracentrifugation and immune electron microscopy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 142: 874.
- 8.— DOLIN R, BLACKLOW NR, DuPONT H et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 140: 578.
- 9.— CHRISTOPHER PJ, GROHMANN GS, MILLSOM RH et al. Parvovirus gastroenteritis - a new entity for Australia. *Med J Aust* 1978; 1: 121.
- 10.— KJELDSBERG E. Small spherical viruses in faeces from gastroenteritis patients. *Acta Path Microbiol Scand* 1977; 85:351.
- 11.— KONNO T, SUZUKI H, IMAIA et al. Reovirus-like agent in acute epidemic gastroenteritis in Japanese infants: Fecal shedding and serologic response. *J Infect Dis* 1977; 135: 259.
- 12.— WYATT RG, GREENBERG HB, DALGARD DW et al. Experimental infection of chimpanzees with the Norwalk

- agent of epidemic viral gastroenteritis. *J Med Virol* 1978; 2:89.
- 13.— THORNHILL TS, WYATT RG, KALICA AR et al. Detection by immune electron microscopy of 26 to 27 nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 1977; 135: 20.
  - 14.— APPLETON H, BUCKLEY M, THOM BT et al. Virus-like particles in winter vomiting disease. *Lancet* 1977; 1: 409.
  - 15.— WYATT RG, DOLIN R, BLACKLOW NR et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 1974; 129: 709.
  - 16.— BLACKLOW NR, DOLIN R, FEDSON DS et al. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. *Ann Intern Med* 1972; 76: 993.
  - 17.— PARRINO TA, SCHREIBER DS, TRIEN JS et al. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Eng J Med* 1977; 297: 86.
  - 18.— SCHREIBER DS, BLACKLOW NR, TRIER JS. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Eng J Med* 1973; 288: 1318.
  - 19.— AGUS SG, DOLIN R, WYATT RG et al. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Ann Intern Med* 1973; 79: 18.
  - 20.— WYATT RG, KAPIKIAN AZ. Viral agents associated with acute gastroenteritis in humans. *Am J Clin Nutr* 1977; 30: 1857.
  - 21.— SCHREIBER DS, TRIER JS, BLACKLOW NR. Recent advances in viral gastroenteritis. *Gastroenterology* 1977; 73:174.
  - 22.— GREENBERG HB, WYATT RG, VALDESUSO J et al. Solid phase microtiter radioimmunoassay for detection of the Norwalk strain of acute nonbacterial, epidemic gastroenteritis virus and its antibodies. *J Med Virol* 1978; 2: 97.
  - 23.— BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; 2:1281.
  - 24.— FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 1973; 2:1497.
  - 25.— FLEWETT TH, WOODE GN. The rotaviruses. *Arch Virol* 1978; 57:1.
  - 26.— PALMER EL, MARTIN JL, MURPHY FA. Morphology and stability of infantile gastroenteritis virus: comparison with reovirus and bluetongue virus. *J Gen Virol* 1977; 35:403.
  - 27.— STANNARD LM, SCHOUB BD. Observations on the morphology of two rotaviruses. *J Gen Virol* 1977; 37: 435.
  - 28.— FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H et al. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 1974; 2: 61.
  - 29.— FOSTER LG, PETERSON MW, SPENDLOVE RS. Fluorescent virus precipitin test. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 150:155.
  - 30.— ZISSIS G, LAMBERT JP, DeKEGEL D. Routine diagnosis of human rotaviruses in stools. *J Clin Path* 1978; 31: 175.
  - 31.— MEBUS CA, KONO M, UNDERDAHL NR et al. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *Can Vet J* 1871; 12:69.
  - 32.— BRYDEN AS, DAVIS HA, HADLEY RE et al. Rotavirus enteritis in the West Midlands during 1974. *Lancet* 1975; 2:241.
  - 33.— DAVIDSON GP, BISHOP RF, TOWNLEY RRW et al. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1975; 1: 242.
  - 34.— ECHEVERRIA P, BLACKLOW NR, SMITH DH. Role of heat-labile toxigenic *Escherichia coli* and reovirus-like agent in diarrhoea in Boston children. *Lancet* 1975; 2:1113.
  - 35.— KAPIKIAN AZ, KIM HW, WYATT RG et al. Human reovirus-like agent associated with "winter" gastroenteritis. *New Eng J Med* 1976; 294: 965.
  - 36.— MIDDLETON PJ, SZYMANSKI MT, ABBOTT GD et al. Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *Lancet* 1974; 1: 1241.
  - 37.— ORSTAVIK I, FIGENSHAU KJ, KAUG KW et al. A reovirus-like agent (rotavirus) in gastroenteritis of children. Virus Detection and serological studies. *Scand J Inf Dis* 1978; 8:1.
  - 38.— MEBUS CA, STAIR EL, UNDERDAHL NR et al. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a reo-like virus. *Vet Pathol* 1971; 8: 490.
  - 39.— MOON HW. Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 172:443.
  - 40.— KAPIKIAN AZ, KIM HW, WYATT RG, RODRIGUEZ WJ, ROSS S et al. Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serological tests. *Science NY* 1974; 185: 1049-1053.
  - 41.— MEBUS CA, WHITE RG, BASS EP, TWIEHAUS MJ. Immunity to neonatal calf diarrhea virus. *J Am Vet Med Ass* 1973;163:880-883.
  - 42.— SNODGRASS DR, WELLS PW. Rotavirus infection in lambs: studies on passive protection. *Arch Virol* 1976; 52: 201-206.
  - 43.— CUMMING GD. Epidemic diarrhea of the newborn from the point of view of the epidemiologist and bacteriologist. *J Pediat* 1947; 30: 706-710.
  - 44.— GOMEZ-BARRETO J, PALMER EL, NAHMIA AJ, HATCH MH. Acute enteritis associated with reovirus-like agents. *J Am Med Ass* 1976; 235:1857-1860.
  - 45.— MURPHY AM, ALBREY MB, CREWE EB. Rotavirus infections of neonates. *Lancet* 1977; ii: 1149-1150.
  - 46.— TOTTERDELL BM, CHRYSTIE IL, BANATVALA JE. Rotavirus infections in a maternity suit. *Archs Dis Childh* 1976; 51: 924-928.
  - 47.— CHRYSTIE IL, TOTTERDELL BM, BANATVALA JE. Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. *Lancet* 1978; i: 1197-1178.
  - 48.— KIM HW, BRANDT CD, KAPIKIAN AZ, WYATT RG, ARROBIO JO et al. Human reovirus-like agent infection. Occurrence in adult contacts of pediatric patients with gastroenteritis. *J Am Med Ass* 1977; 238: 404-407.
  - 49.— TUFVESSON B, JOHNSON T, PERSSON B. Family infections by reo-like virus. Comparison of antibody titres by

- complement fixation and Immunoelectrophoresis. *Scand J Infect Dis* 1977; 9: 257-261.
- 50.— WOODS GN, JONES J, BRIDGER J. Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhoea virus. *Vet Rec* 1975; 97:148-149.
- 51.— THOULESS ME, BRYDEN AS, FLEWETT TH. Rotavirus neutralization by human milk. *Br Med J* 1977; ii: 1390.
- 52.— KRAFT LM. Observations on the control and natural history of epidemic diarrhoea of infant mice (EDIM). *Yale J Biol Med* 1958;31:121-137.
- 53.— RODGER SM, CRAVEN JA, WILLIAMS I. Demonstration of reovirus-like particles in intestinal contents of piglets with diarrhoea. *Aust Vet J* 1975; 51: 536.
- 54.— McNULTY MS, ALLAN GM, PEARSON GR, McFERRAN JB, CURRAN WL et al. Reovirus-like agent (rotavirus) from lambs. *Infect Immunity* 1976; 14: 1332-1338.
- 55.— FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H. Virus diarrhoea in foals and other animals. *Vet Rec* 1975; 96:477.
- 56.— MALHERBE HH, STRICKLAND-CHORLMLEY M. Simian virus SA 11 and the related O agent. *Arch Ges Virusforsch* 1967; 22:235-245.
- 57.— BRYDEN AS, THOULESS ME, FLEWETT TH. Rotavirus in rabbits. *Vet Rec* 1976; 99: 323.
- 58.— REED DE, DALEY CA, SHAVE HJ. Reovirus agent associated with neonatal diarrhoea in pronghorn antelope. *J Wildlife Dis* 1976; 12:488-491.
- 59.— TZIPORI S. Human rotaviruses in young dogs. *Med J Aust* 1976; ii: 922-923.
- 60.— SUZUKI H, KONNO T, ISHIDA N. Parvovirus-like agent detected by EM in infantile diarrhoea and its relationship to epidemic gastroenteritis in school children in Japan (Abstract). 4th International Congress on Virology, Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Hague, The Netherlands, 1978: 471.
- 61.— FLEWETT TH. Diagnosis of enteritis virus. *Proc R Soc Med* 1976; 69: 693.
- 62.— TUFVESSON B, JOHNSSON T. Immunoelectrophoresis for detection of reo-like virus: methodology and comparison with electron microscopy. *Acta Path Microbiol Scand B* 1976; 84:225.
- 63.— YOW MD, MELNICK JL, BLATTNER RJ, STEPHENSON WB, ROBINSON NM et al. The association of viruses and bacteria with infantile diarrhoea. *Am J Epidem* 1970; 92: 33-39.
- 64.— ELLENS DJ, De LEEUW PW. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. *J Clin Microbiol* 1977; 6: 530-532.
- 65.— KALICA AR, PURCELL RH, SERENO MM, WYATT RG, KIM HW et al. A microtitre solid-phase radioimmunoassay for detection of the human reovirus-like agent in stools. *J Immun* 1977; 118:1275-1279.
- 66.— MIDDLETON PJ, HOLDAWAY MD, PETRIC M, SZYMANSKI MT, TAM JS. Solid-phase radioimmunoassay for the detection of rotavirus. *Infect Immunity* 1977; 16:439-444.
- 67.— BARNETT BB, SPENDLOVE RS, PETERSON MW, HSU LY, LASALLE VA et al. Immunofluorescent cell assay of neonatal calf diarrhoea virus. *Can J Comp Med* 1975; 39: 462-465.
- 68.— BRIDGER JC, WOODS GN. Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. *Br Vet J* 1975; 131: 528-535.
- 69.— GRAHAM DY, ESTES MK. Comparison of methods for immunocytochemical detection of rotavirus infections. *Infection and Immunity* 1979; 6: 686-689.
- 70.— BABIUK LA, ACRES SA, ROUSE BT. Solid-phase radioimmunoassay for detecting bovine (neonatal calf diarrhoea) rotavirus antibody. *J Clin Microbiol* 1977; 6:10-15.
- 71.— BRYDEN AS, DAVIES HA, THOULESS ME, FLEWETT TH. Diagnosis of rotavirus infection by cell culture. *J Med Microbiol* 1977; 10:121-125.
- 72.— SCHERRER R, BERNARD S. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to the detection of calf rotavirus and rotavirus antibodies. *Annls Microbiol Paris* 1977; 128: 499-510.
- 73.— YOLKEN R, WYATT RG, KAPIKIAN AZ. ELISA for rotavirus. *Lancet* 1977; 2: 819.
- 74.— McLEAN B. Personal communication, 1978.
- 75.— ESPEJO RT, CALDERON E, GONZALEZ N. Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J Clin Micro* 1977; 6: 502-506.
- 76.— KAPIKIAN AZ, FEINSTONE SM, PURCELL RH, WYATT RG, THORNHILL TS et al. Detection and identification by immune electron microscopy of fastidious agents associated with respiratory illness, acute non-bacterial gastroenteritis and hepatitis A. En: POLLARD . *Perspectives in Virology*. New York: Academic Press: 1975; 9-45.
- 77.— KAPIKIAN AZ, WYATT RG, DOLIN R, THORNHILL TS, KALICA AR et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10: 1075-1081.
- 78.— ABOU-YOUSSEF MH, RISTIC M. Protective effect of immunoglobulins in serum and milk of sows exposed to transmissible gastroenteritis virus. *Can J Comp Med* 1975; 39: 41-45.
- 79.— BOHL EH, SAIF LJ. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristic of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect Immunity* 1975; 11: 23-32.
- 80.— HAELTERMAN EO, HOOPER BE. Transmissible gastroenteritis of swine as a model for the study of enteric disease. *Gastroenterology* 1967; 53: 109-113.
- 81.— MORILLA A, KLEMM RC, SPRINO P, RISTIC M. Neutralization of a transmissible gastroenteritis virus of swine by colostral antibodies elicited by intestine and cell culture-propagated virus. *Am J Vet Res* 1976; 37: 1011-1016.
- 82.— ORSTAVILK I, HAUG KW. Virus-specific IgM antibodies in acute gastroenteritis due to a reovirus-like agent (rotavirus). *J Infect Dis* 1976; 8:237-240.
- 83.— ZISSIS G, LAMBERT JP. Different serotypes of human rotavirus. *Lancet* 1978; i: 38-39.
- 84.— FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H, MORRIS CA. Epidemic viral enteritis in long-stay children's ward. *Lancet* 1975; 1: 4-5.

- 85.— ESPARZA IE, VIERA DE TORRES B, PINERO A, CARMONA FO, MAZZALI DE ILJA R. Rotaviruses in Venezuelan Children with gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26: 148-151.
- 86.— CRUICKSHANK JG, ZILBERG B, AXTON JHM. Virus particles and gastroenteritis in black and white children in Rhodesia. *South Afr Med J* 1975; 49: 859-863.
- 87.— FLEWETT TH, BOXALL E. The hunt for viruses in infections of the alimentary system: an immunoelectron-microscopical approach. *Clin Gastroent* 1976; 5: 359-385.
- 88.— MATHAN M, MATHAN VI, SWAMINATHAN SP, YESUDASS S, BAKER SJ. Pleomorphic virus-like particles in human feces. *Lancet* i: 1975; 1068-1069.
- 89.— MAAS G, BAUMEISTER HG, FREITAG N. Viruses as causal agents of gastroenteritis in infants and young children. *Munch Med Wschr* 1977; 119: 1029-1034.
- 90.— MELNICK JL, WENNER HA, PHILLIPS CA. Enteroviruses. En: Lennette EH, Schmidt NJ, eds. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. Washington: American Public Health Assn.; 1979.
- 91.— MADELEY CR, COSGROVE BP. 28 nm particles in feces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; ii: 451-452.
- 92.— McLEAN DM, WONG KSK, BERGMAN SKA. Virions associated with acute gastroenteritis in Vancouver in 1976. *Can Med Ass J* 1977; 117: 1035-1036.
- 93.— MIDDLETON PJ, SZYMANSKI MT, PETRIC M. Viruses associated with acute gastroenteritis in young children. *Am J Dis Child* 1977; 131:733-737.
- 94.— MADELEY CR, COSGROVE BP. Viruses in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; ii: 124.
- 95.— ALMEIDA JD, WATERSON AP, PRYDIE J, FLETCHER EWL. The structure of a feline Picornavirus and its relevance to cubic viruses in general. *Arch Ges Virusforsch* 1968; 25: 105-114.
- 96.— FLEWETT TH. Acute non-bacterial infectious gastroenteritis-an essay in comparative virology. En: WATERSON. *Recent advances in clinical virology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1977: 151-169.
- 97.— MADELEY CR, COSGROVE BP. Caliciviruses in man. *Lancet* 1976; i: 199-200.
- 98.— APPLETON H, HIGGINS PG. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1975; i: 1297.
- 99.— CAMERON DJS, BISHOP RF, VEENSTRA AA et al. Pattern of shedding of two non-cultivable viruses in stools of newborn babies. *J Med Virol* 1978; 2: 7-13.
- 100.— CAMERON DIS, BISHOP RF, DAVIDSON GP, TOWNLEY RRW, HOLMES IH et al. New Virus associated with diarrhoea in neonates. *Med J Aust* 1976; 1:85-86.
- 101.— KOCH R. Ueber bakteriologische forschung. *Verhandl der X International Medical Congress, Berlin*. 1891; 35.
- 102.— RIVERS TM. Viruses and Koch's postulates. *J Bacteriol* 1937; 33:1.
- 103.— HUEBNER RJ. The virologist's dilemma. *Ann NY Acad Sci* 1957; 67:430.