

## LOS ROTAVIRUS COMO AGENTES ETIOLÓGICOS DE LA GASTROENTERITIS EN EL ESTADO ZULIA

Dorothy Gaskin de Pellacani\* y Armando Soto Escalona\*\*

\* Cátedra de Virología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Apartado Postal 526, \*\* Instituto de Investigaciones Clínicas, Apartado Postal 1151, Maracaibo 4001-A, Venezuela.

### RESUMEN

Para tratar de demostrar la incidencia de Rotavirus en casos de diarreas infantiles en nuestro medio, se estudiaron 158 muestras de heces provenientes de niños internados en el Servicio de Hidratación del Hospital Universitario de Maracaibo, mediante el microscopio electrónico. Al mismo tiempo se procesaron 25 muestras de heces de niños aparentemente sanos, recolectadas a nivel de sus hogares; las cuales se usaron como controles.

De las muestras examinadas provenientes de niños con diarrea se detectó la presencia de Rotavirus en 78 de ellas, lo que representa un 49%; en solo uno de los controles se evidenció este agente viral, que equivale a un 4%.

Nuestros resultados indican la existencia de Rotavirus en el Estado Zulia y su participación en la etiología de las enteritis infantiles.

## INTRODUCCION

Es conocido el importante papel que juegan las bacterias en la etiología de la gastroenteritis infantil. La *Escherichia coli* en sus variedades enteropatógenas y toxigénicas, la *Shigella* y *Salmonella*, han sido estudiadas en sus relaciones con los cuadros diarreicos de la infancia (1, 27, 39, 43). También se ha demostrado el papel enteropatógeno de los protozoarios como *Giardia*, *Balantidium coli* y *Entamoeba histolítica* (5, 47), aunque en proporciones muchos menores.

Sin embargo, hasta hace poco, aún en los estudios más exhaustivos no se había podido determinar el 100% de los agentes etiológicos, encontrándose agentes bacterianos en proporciones que alcanzaban el 60% de los casos estudiados.

En la búsqueda de los agentes causantes de la diarrea en ese porcentaje no explicado, se extremaron los estudios en el campo de la Virología apoyados en la aparición de los enterovirus en la década de 1950-1960. Entre otros, Ramos-Alvares y Sabin en 1958, en Norteamérica (36), Cramblett y Siewers en 1964 en Norteamérica y Europa (11), Ramos-Alvares y Olarte en 1964, en México (37); Guardiola-Rotger y cols. en 1964 en Puerto Rico (21), Parks y cols. en 1966 en Paquistán (35), Contreras y cols. en 1961 en Chile (10). Los resultados de estos estudios fueron contradictorios, pues algunos mostraban aparentemente la responsabilidad de los enterovirus en los cuadros diarreicos, mientras otros, al contrario, no conseguían la relación buscada.

Más recientemente se describieron agentes virales en heces de enfermos con diarreas en Norwalk, Ohio y además, la diarrea pudo ser transmitida a voluntarios por administración oral de filtrados de heces de enfermos (14). Esto fué conocido como el agente de Norwalk, caracterizado por ser un virus pequeño de la familia Parvovirus (23, 24), y dió lugar a la aparición de nuevos agentes, entre los que se puede citar el agente de Hawaii (49).

En Australia, Bishop y cols. en 1973 (3) demostraron mediante el Microscopio Electrónico, la presencia de partículas virales en la mucosa duodenal de pacientes con diarrea no bacteriana, y más adelante virus semejantes fueron visualizados en preparados de heces por los mismos investigadores (4), y por Davidson y cols. (13).

Estos hallazgos fueron confirmados por Middleton y cols. en Canadá (31), Flewett y cols. (17, 18) y Sheperd y cols. (41) en Inglaterra, Kapijian y cols. (26) y Gómez-Barreto y cols. en Norteamérica (2), Schoub y

cols. en Sur Africa<sup>(39)</sup>, Esparza y cols.<sup>(16)</sup> y Viera-Torres<sup>(46)</sup> en Venezuela; comprobándose así la difusión universal de estos agentes virales y su participación en muchos de los cuadros de gastroenteritis etiológicamente no identificados.

La historia de la etiología de la diarrea en Venezuela no se diferencia de lo ya expuesto para el resto del mundo<sup>(30, 34)</sup>. Briceño-Irragorry y Fosaert<sup>(6, 7, 19)</sup> hicieron estudios sobre bacterias como agentes causales de gastroenteritis, obteniendo resultados variables de positividad bacteriana. La búsqueda de virus fué iniciada por Núñez-Montiel y cols. en 1965<sup>(33)</sup> en 303 niños con diarrea aguda febril y 46 controles sanos, sin conseguir diferencia significativa en los porcentajes de aislamiento en cada grupo. En 1966, Soto y cols.<sup>(42)</sup> sospechando la endemidad de los enterovirus en la población infantil de Maracaibo, comprueban la alta incidencia de algunos serotipos en edad escolar y preescolar.

Esparza y cols. en Caracas en 1975, demuestran la existencia de Rotavirus en heces provenientes de niños hospitalizados por gastroenteritis, y Viera-Torres y cols.<sup>(46)</sup>, amplian estos estudios.

El propósito del presente trabajo es iniciar en el Estado Zulia, el estudio de la prevalencia de estos agentes en los casos de gastroenteritis en la región y su significación e importancia como agente etiológico del cuadro diarreico infantil.

## MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 158 muestras de heces provenientes de niños internados en el Servicio de Hidratación del Hospital Universitario de Maracaibo, por presentar un cuadro de enteritis aguda acompañada de vómitos, fiebre y grados variables de deshidratación. Conjuntamente se procesaron 25 muestras controles, provenientes de niños aparentemente sanos, y tomadas en sus respectivos domicilios.

Once de las muestras fueron tomadas durante el mes de julio de 1976, y las restantes 151, más los controles, de enero a junio de 1977.

La mayoría de los niños provenían de los diferentes barrios de la ciudad y algunos de los distritos circunvecinos. Sus edades estaban comprendidas de 1 a 21 meses para los casos hospitalizados y para los controles entre 3 y 4 años. A cada niño estudiado se le tomó una muestra de 5-10 gramos de heces, que se trasladó al laboratorio conservándose a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de procesarlas, lo que generalmente se hacía al acumularse 12 muestras.

Se utilizó la técnica de Bishop y cols. (4), modificada por Esparza y cols. (15). Se homogenizaron aproximadamente 2 gramos de heces y 10 ml de buffer Tris HCL 0.002 M pH 8.5-8.8, por un minuto, utilizando un Omni-Mixer (Ivan Sorvall, Norwalk, Conn, USA) a velocidad máxima. El material obtenido fué centrifugado a 4°C y 2.500 rpm por media hora en una centrífuga refrigerada Internacional Modelo PR2.

El sobrenadante fué centrifugado a 100.000 g por 1 hora, usando rotor 40 en una ultracentrífuga Beckman L50. El sobrenadante fué descartado y el sedimento resuspendido con 5 a 10 gotas de buffer Tris HCL 0.002 M, pH 8.5-8.8.

Se utilizó un microscopio electrónico JEM 100B (Jeol, Tokio, Japón), y rejillas de cobre de 100 campos previamente tratadas con una película de parlodión al 2% en acetato de amilo, y luego sombreado de carbón en un evaporador de vacío modelo JEE (Jeol, Tokio, Japón).

Para el montaje de la rejilla se colocó ésta sobre una gota de sedimento resuspendido, dejándolo en contacto por espacio de un minuto aproximadamente. Luego se retiró, se dejó secar y se coloreó colocando una rejilla sobre una gota de ácido fosfotungstico al 2%, pH 7.2 por un minuto; retirándola luego y dejándola secar. Las rejillas se observaron al Microscopio Electrónico.

## RESULTADOS

De las 158 muestras examinadas provenientes de niños con diarrea, 78 fueron encontradas positivas para Rotavirus, lo que representa un 49%. Las muestras controles estudiadas fueron negativas, a excepción de una que resultó positiva, lo que equivale a un 4%.

En la figura 1, se resume el número de casos positivos y su frecuencia en los diferentes grupos de edades. Podemos observar una mayor frecuencia en el grupo etario de 4 a 6 meses de edad encontrando menor positividad en las edades superiores e inferiores, observándose un marcado descenso después del primer año de vida. El control que resultó positivo tenía 36 meses de edad, y no fue incluido en los resultados.

La distribución de la infección de acuerdo con el sexo y grupo de edad, se evidencia en la tabla I. Observamos una marcada frecuencia de infec-

ción en varones con 30.35%, mientras que en las hembras fué de 18.96%. En la figura 2, podemos ver la distribución de los casos positivos en relación al número de muestras recolectadas cada mes.

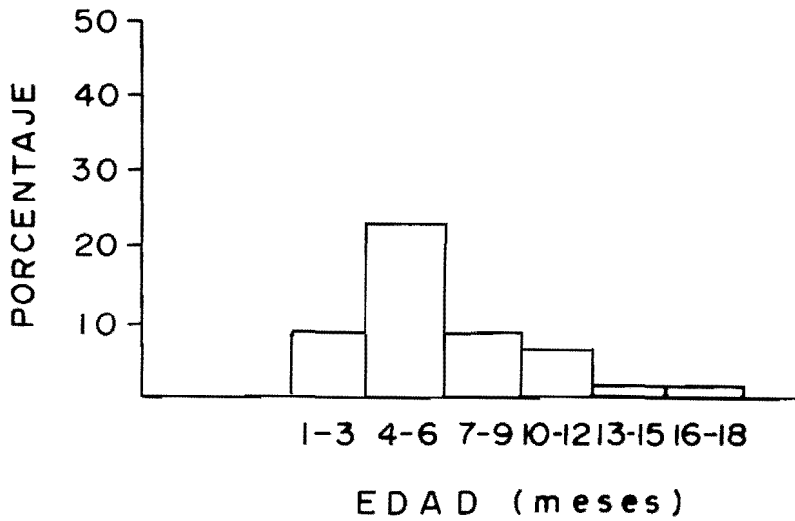


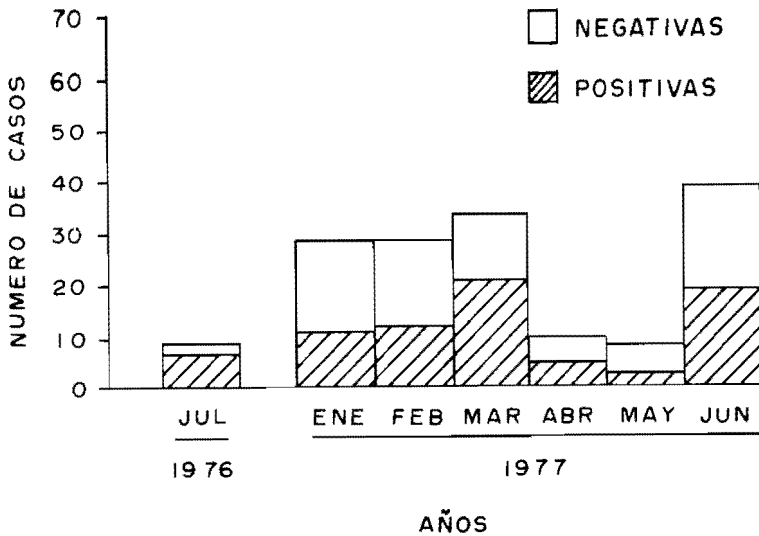
Fig. 1.— Distribución porcentual de los casos positivos por edades. Un mayor porcentaje de casos positivos se evidencia en el grupo de 4 a 6 meses de edad.

TABLA I

FRECUENCIA DE ROTAVIRUS POR SEXO Y GRUPO DE EDADES

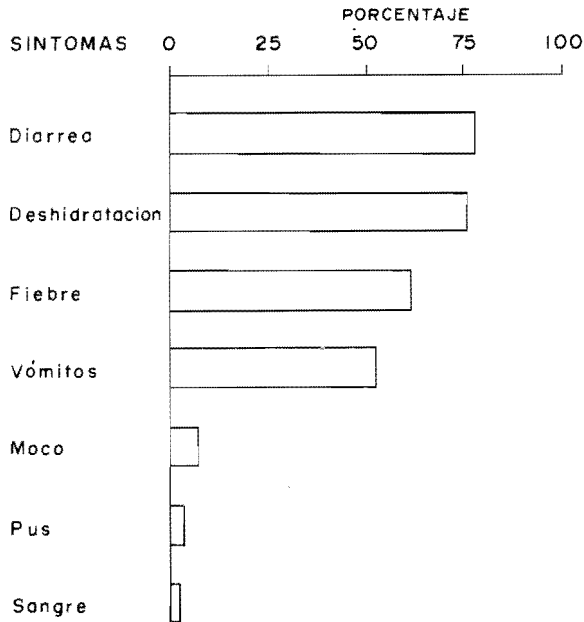
| Edad (Meses) | Varones | Porcentaje* | Hembras | Porcentaje* |
|--------------|---------|-------------|---------|-------------|
| 1 - 3        | 8       | 5.06        | 6       | 3.79        |
| 4 - 6        | 24      | 15.18       | 13      | 8.22        |
| 7 - 9        | 8       | 5.06        | 5       | 3.16        |
| 10 - 12      | 5       | 3.16        | 5       | 3.16        |
| 13 - 15      | 2       | 1.26        | 0       | 0.00        |
| 16 - 18      | 1       | 0.63        | 1       | 0.63        |
| Total        | 48      | 30.35       | 30      | 18.96       |

\* Los porcentajes se basan sobre el número total de las 158 muestras examinadas, provenientes de niños con diarrea.



**Fig. 2.—** Distribución de las muestras procesadas por meses. Se obtuvo un número mayor de muestras positivas en los meses de marzo y junio de 1977.

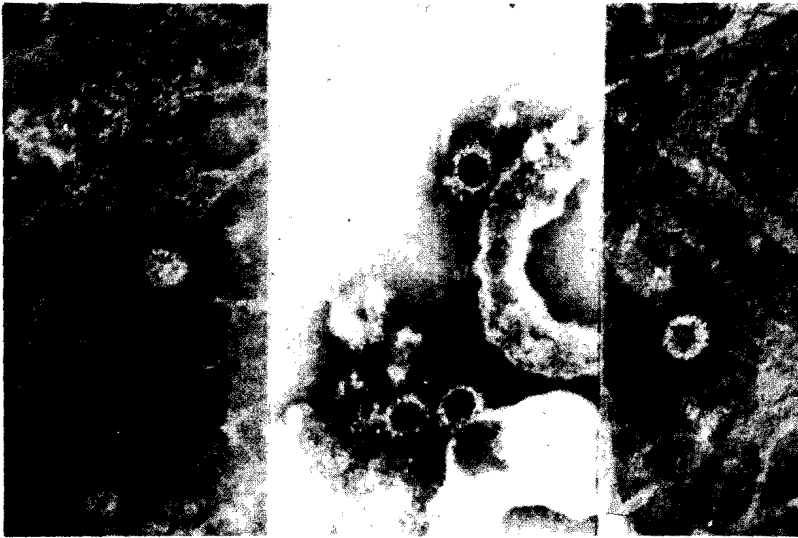
La sintomatología observada en los niños positivos para Rotavirus no difirió de los restantes. En la figura 3, podemos ver la frecuencia de los sín-



**Fig. 3.—** Relación porcentual de la sintomatología presentada en los 78 casos positivos para Rotavirus. La diarrea estuvo presente en todos los casos.

tomas presentados en las 78 muestras positivas. La diarrea fué observada en todos los casos; solo el caso control positivo no la presentó. Le sigue en frecuencia la deshidratación y depleción electrolítica. Se observó fiebre, vómitos, mocos en heces, pus y sangre.

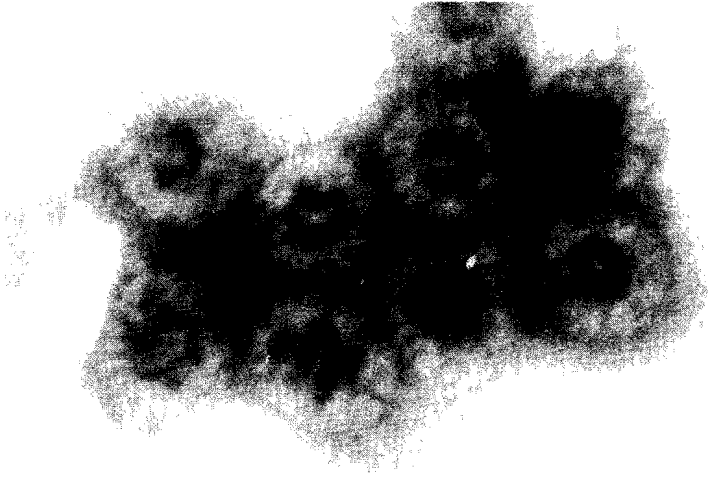
Las partículas virales observadas al Microscopio Electrónico exhibían las características de los Rotavirus, observándose virus con doble cubierta capsomérica, con un diámetro de 72-82 nm, virus con cubierta capsomérica simple con un diámetro de 60-67 nm y virus vacíos que habían perdido su contenido de ácido nucleico (Figs. 4, 5 y 6). También se observó



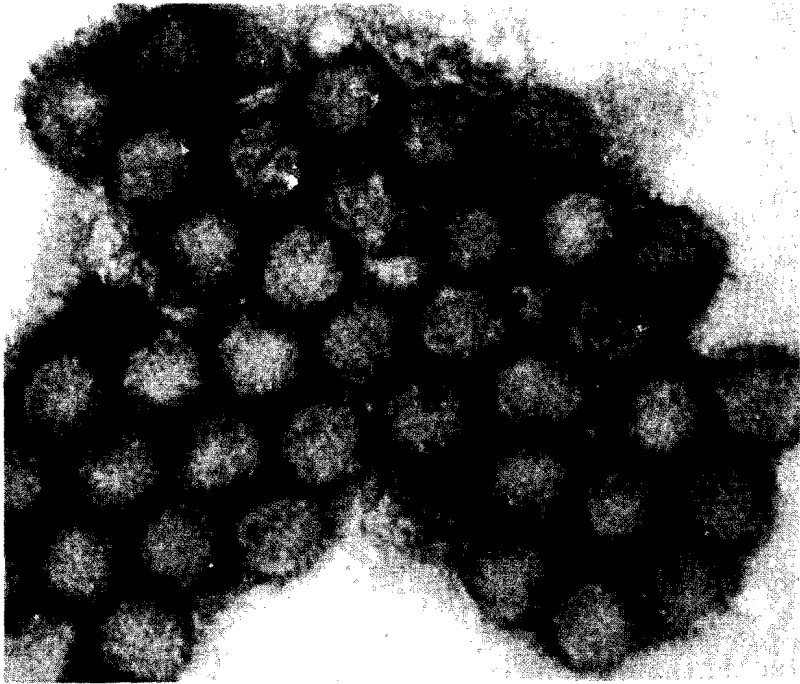
**Fig. 4.—** Virus de cubierta simple encontrados en heces de niños con gastroenteritis. Se observa una estructura capsomérica muy bien definida. Su tamaño es de 60-67 nm. Al centro se observan virus vacíos. 100.000X. una red de figuras hexagonales que han sido consideradas como fragmentos de virus<sup>(22)</sup> (Fig. 7). Asimismo se observaron unas partículas no identificadas que posiblemente sean virus entéricos más pequeños (Fig. 8).

## DISCUSION

Estos virus han sido denominados de diferentes maneras a medida que se ha ido clarificando su participación en el proceso diarreico. Se han utilizado términos como Rotavirus, Duovirus, Orbivirus, partículas parecidas a los Reovirus y agentes de la enteritis infantil. Su implicación como agentes etiológicos fué puesto de manifiesto, en primer término, por comparaciones estadísticamente válidas entre su prevalencia en poblaciones con gastroenteritis y controles sanos. Sin embargo, más adelante se ha podido

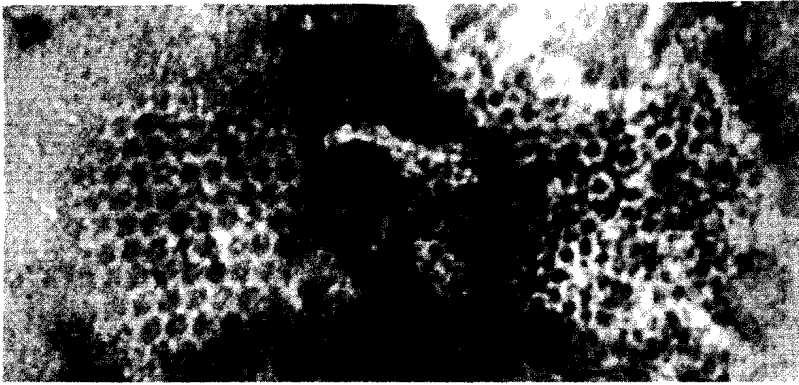


**Fig. 5.— Virus de cubierta doble vacíos encontrados en heces de niños con gastroenteritis. Su tamaño es de 72-82 nm. 240.000X.**

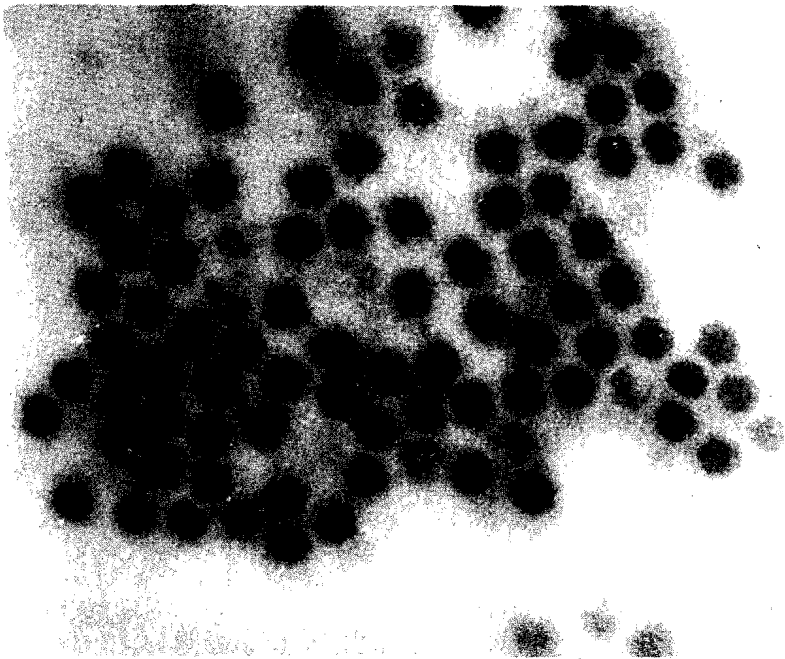


**Fig. 6 — Virus de cubierta doble llenos encontrados en heces de niños con gastroenteritis. Su tamaño es de 72-82 nm. 240.000X.**





**Fig. 7.—** Elementos hexagonales comúnmente hallados en el material de estudio. Se supone que sean capsómeros virales que se agrupan libremente en formaciones paracristalinas. 240.000X.



**Fig. 8.—** Partículas no identificadas halladas ocasionalmente en el material de estudio. Se piensa sean virus entéricos más pequeños. 120.000X.

utilizar algunos procedimientos serológicos, tales como inmunomicroscopía electrónica<sup>(22)</sup>, inmunofluorescencia<sup>(45)</sup>, contraelectroforesis<sup>(32)</sup>, y otras; además, los postulados de Kock han podido ser cumplidos por infección experimental en cerdos<sup>(44)</sup>, monos<sup>(51)</sup>, becerros<sup>(44)</sup> y voluntarios humanos<sup>(14, 50)</sup>.

Estos agentes han podido ser estudiados tanto en su morfología como en su comportamiento físico-químico. Son partículas de un tamaño de 72-82 nm, de características muy bien delineadas. Los especímenes pueden contener partículas de doble cubierta o cubierta simple, teniendo éstas bordes irregulares con aproximadamente 21 proyecciones en su periferia (15), o bien puede haber una mezcla de los dos tipos.

En estudios comparativos hechos con Rotavirus purificados de origen humanos, Simio SA11, y de becerros sobre gel de poliacrilamina (38), se determinó que tanto los virus humanos como Simios tienen ocho polipéptidos y nueve los Rotavirus de los becerros, de los cuales cuatro se localizaron en la envoltura capsomérica interna y son iguales para los tres virus; 3 ó 4 se localizan en la envoltura capsomérica externa observándose variaciones sobre todo a nivel de los polipéptidos de bajo peso molecular.

Otros autores (18) ponen de manifiesto variaciones serológicas en infecciones experimentales si los virus son de doble cubierta capsomérica, haciéndose indistinguibles si los virus presentan una sola cubierta.

Los porcentajes de positividad encontrados por diversos autores para diferenciar series estudiadas hasta el presente son de una gran variedad. Albrey y cols. (1) reportaron el 31% de positividad en las muestras examinadas; Sheperd y cols. (41) acusan el 32% de hallazgos positivos en 100 muestras examinadas; Bryden y cols. (8) reportan un 38% con Duovirus; Kapikian (26) reporta 24% de especímenes positivos de 142 muestras examinadas, y el 62% de 21 muestras en otra ocasión (25); Gómez-Barreto y cols. (20) reportaron el 55% de muestras con virus presentes en 29 casos; Bishop y cols. (4) reportaron el 81%; Viera-Torres y cols. (46), de 293 muestras examinadas, encontraron positividad en 49% de los casos estudiados.

Es de observar que los variables porcentajes obtenidos pueden haber sido el producto de varios factores, entre los cuales más importante para tomar en cuenta son la edad del niño, y el momento de la toma de la muestra, así como también la época del año en que se recolecta ésta, por las variaciones estacionales que han sido reportadas para otros virus (46). Esta es una infección de una edad muy temprana de la vida, demostrada para el estudio de la tabla de frecuencia que indica que por debajo de un año de edad se presenta el 82% de los casos positivos.

Otros reportes acusan mayor susceptibilidad a diferentes edades: entre 6 meses y 2 años (26), de 6 meses a 3 años (8), desde 3 meses a 2 años (20), y de 10 días a 4 años (41). Sin embargo, infecciones a Rotavirus pueden ir más allá de estas edades, siendo posible casos positivos hasta los 6

años<sup>(8)</sup>. Sobre esta edad es raro encontrar infecciones a Rotavirus. Por otro lado, se ha demostrado que el virus se excreta durante 6 días como término medio y que la positividad decae rápidamente cuando la muestra es tomada más allá de ese tiempo; de allí la importancia de una toma de muestra en el momento apropiado para obtener resultados valederos en cuanto a la verdadera importancia de estos virus en la diarrea.

La presencia de virus en niños sanos indica la posibilidad de una circulación silenciosa del virus con las implicaciones epidemiológicas que esto acarrea. Sin embargo, las cifras hasta ahora publicadas indican que ese tipo de infección inaparente es de escasa importancia, pues los reportes varían entre valores absoluto de 0% hasta 8% de positividad en poblaciones infantiles sanas<sup>(25, 26, 31, 46)</sup>.

Sin embargo, Albrey y cols.<sup>(1)</sup> reportan Rotavirus en 12 de 23 recién nacidos que no acusaron sintomatología alguna hasta el momento de la toma de la muestra. De igual manera Chrystie y cols. acusaron infecciones en niños recién nacidos en el retén<sup>(12)</sup>. Este es un aspecto poco conocido de esta infección, sobre lo cual debe hacerse énfasis especial por la importancia que tiene en los mecanismos de propagación.

La sintomatología del cuadro producido por los virus en estudio fué descrita por Sheperd<sup>(41)</sup>, y no se diferencia de las gastroenteritis bacterianas hasta ahora reportadas. Nuestro estudio indica que en orden de frecuencia, los síntomas y signos más resaltantes fueron diarrea, deshidratación, vómitos y fiebre. La presencia de moco y sangre es superior a lo ya reportado por Sheperd, aunque no podemos ofrecer una explicación racional a esta diferencia.

Con respecto al sexo, puede haber una mayor incidencia en varones que en hembras. Al efecto Sheperd<sup>(41)</sup> observa una frecuencia de 63% en varones menores de 6 meses y 37% en hembras; nuestras observaciones coinciden con las de estos investigadores. Gómez-Barreto<sup>(20)</sup> reporta 13 varones positivos de 16 niños estudiados.

La morfología de las partículas que se visualizaron al Microscopio Electrónico, tenían características semejantes a las de las discutidas por Bishop y cols. en 1973<sup>(3)</sup> a partir de la mucosa duodenal, y posteriormente en 1974<sup>(4)</sup> del centrifugado de heces; las cuales se describen como entidades virales que guardan semejanzas morfológicas con Orbivirus, el virus de la diarrea de los becerros, y el de la diarrea epizootica de los ratones lactantes<sup>(48)</sup>; presentándose en su forma características de cápsido doble con diámetro de 72-82 nm y partículas de una sola cubierta de 60-67 nm de diámetro.

Estas observaciones han sido confirmadas en repetidas ocasiones (16, 22, 25, 26, 31), y al mismo tiempo han podido observar Adenovirus y ciertos artefactos de forma tubular aplanada y en mallas de mosaico hexagonales (Fig. 7) que se ha dicho corresponden a restos de virus desintegrados (22). Partículas virales pequeñas no identificadas fueron observadas por nosotros en varias oportunidades (Fig. 8).

En 1975, nuevas investigaciones asocian a los Coronavirus como responsables de algunos de los cuadros de gastroenteritis en becerros (28, 40), y en humanos (9).

Queda por lo tanto dilucidar cuál es la incidencia que le corresponde a cada uno de los enteropatógenos virales visualizados en heces de niños con gastroenteritis. De lo que no nos queda duda es la existencia de Rotavirus en el Estado Zulia, y de su amplia participación en la etiología de la diarrea que afecta a los niños de 1 a 4 años.

#### ABSTRACT

**Rotavirus as an etiological agent of gastroenteritis in Zulia State.** *Gaskin-Pellacani D. (Cátedra de Virología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Venezuela), Soto-Escalona A. Invest Clín 21(4): 259-275, 1980.*— In order to determine the participation of Rotavirus as a causa of acute diarrhea in children, 158 samples of faeces from children with acute diarrhea and hospitalized in the hidration service of the Hospital Universitario were studied using electronmicroscope. At the same time 25 samples of faeces from children without diarrhea collected at their homes were used as controls. Of the 158 samples studied from the hospitalized children 78 were positive for Rotavirus representing 49%. One of the 25 controls were positive which account for 4%. Our results demonstrate the presence of Rotavirus in Zulia State and its participation as an etiological cause of infant enteritis.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— ALBREY MB, MURPHY AM: Rotavirus and acute gastroenteritis of infants and children, *Med J Aust I*: 82-85, 1976.
- 2— BARNES G: Duovirus in New Zealand. Letter to the editor. *Lancet I*, 1192, 1975.
- 3— BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ: Virus particles in epithelial cell of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet II*: (2) 1281, 1883, 1973.

- 4- BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ: Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet I*: 149-151, 1974.
- 5- BONILLA L, GUANIPA N, ARAPE R: Prevalencia de Entamoeba histolítica, Entamoeba hartmanni y otros parásitos intestinales en niños hospitalizados. *Invest Clín 17(1)*: 25-41, 1976.
- 6- BRICEÑO-IRRAGORRY L: Contribución al estudio de la naturaleza infecciosa del síndrome "diarrea y enteritis" infantil. *Rev SAS 7 (3)*: 363-374, 1942.
- 7- BRICEÑO-IRRAGORRY L, FOSSAERT H: Estudio bacteriológico de las diarreas y enteritis infantiles en Venezuela. *Memorias del Primer Congreso Venezolano de Salud Pública y Tercera Conferencia de Unidades Sanitarias*. 125, Caracas, 1956.
- 8- BRUDEN AS, DAVIES HA, HADLEY RE, GLEWETT TH, MORRIS CA, OLIVER P: Rotavirus enteritis in the west mudlands during 1974. *Lancet II*: 241-243, 1975.
- 9- CAUL EO, PAVER WK, CLARKE SKR: Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis. Letter to the editor. *Lancet I*: 1192, 1975.
- 10- CONTRERAS GA, MacGINTY A, PARDO R, VELAZCO J: Virus entéricos. I. Aislamiento de virus. *Pediatría (Santiago) 4*: 181-193, 1961.
- 11- CRAMBLETT HG, SIEWERS CM: The etiology of gastroenteritis in infants and children with emphasis on the occurrence of simultaneous mixed viral bacterial infections. *Pediatrics 35*: 885-898, 1965.
- 12- CHYSTIE IL, TOTTERDELL B, BAKER JM, SCOPES JW, BANATVALA JE: Rotavirus infections in a maternity unit. Letter to the editor. *Lancet II*: 79, 1975.
- 13- DAVIDSON GP, BISHOP RF, TOWNLEY RRW, HOLMES IH, RUCK BJ: Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet I*: 242-246, 1975.
- 14- DOLIN R, BLACKLOW NR, DUPONT H, FORMAL S, BUSHOP RF, KASEL JA, CHARMES RP, HORNICK R, CHANOCK RM: Transmission of acute infections non-bacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis 123*: 307-312, 1971.

- 15- ESPARZA J, GIL F: A study on the ultrastructure of human rotavirus. *Virology* 91: 141-150, 1978.
- 16- ESPARZA J, VIERA-TORRES B, PINERO A, CARMONA O, MAZZALI-DE ILJA R: Rotavirus in Venezuelan children with gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg* 26: 148-151, 1977.
- 17- FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* II: 1497, 1973.
- 18- FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H, WOODS GN, BRUDGER JC, DERRICK JM: Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* II: 61-63, 1974.
- 19- FOSSAERT H: Etiología de las gastroenteritis en Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Caracas. Folleto mimeografiado. 1962.
- 20- GOMEZ-BARRETO J, PALMER EL, NAHMIAS AJ, HATCH MH: Acute enteritis associated with Reovirus-like agent. *JAMA* 235(17): 1857-1860, 1976.
- 21- GUARDIOLA-ROTGER A, FIGUEROA-GONZALEZ E, KAUDER E, MUÑOZ A, LOPEZ VA, GADEA DE, FUNKENBUSCH MJ: Studies on diarrheal diseases. The multiplicity of infectious agents in the intestinal flora of Puerto Rican children with gastroenteritis. *J Pediatric* 65: 81-94, 1965.
- 22- HOLMES IH, RUCK BJ, BISHOP RF, DAVIDSON GP: Infantile enteritis virus: morphogenesis and morphology. *J Virol* 16: 937-943, 1975.
- 23- KAPIKIAN AZ, WYATT RG, DOLIN R, THORNHILL TS, KALIKA AR, CHANOCK RM: Visualization by immune electron microscopy of 27 nm particles associated with acute infectious non bacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075-1081, 1972.
- 24- KAPIKIAN AZ, GERIN JL, WYATT RG, THORNHILL TS, CHANOCK RM: Density in cesium choride of the 27 nm 8 filas particles associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis: determination by ultracentrifugation and immune electron microscopy. *Proc Soc Exp Biol Med* 141: 874-877, 1973.
- 25- KAPIKIAN AZ, KIM HW, WYATT RG, RODRIGUEZ WJ, ROSS S, CLINE WL, PARROTT RH, CHANOCK RM: Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic test. *Science* 185: 1053-1094, 1974.

- 26- KAPIKIAN AZ, KIM HW, WYATT RG, CLINE WL, ARROBIO JO, BRAND CD, RODRIGUEZ JW, SACK DA, CHANOCK RM, PARROT RH: Human Reovirus-like agent as the major pathogen associated "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med* 249: 965-972, 1976.
- 27- KASLOW RA, RAILOR A, DWCK HS: Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in a newborn nursery. *Am Dis Child* 128: 797, 1974.
- 28- McNULTY MS, CURRAN WL, McFERRAN JB: Virus-like particles in calves faeces. Letter to the editor. *Lancet* II: 78-79, 1975.
- 29- MEBUS CA, NEWMAN LE: Scanning electron light and immunofluorescent microscopy of intestine of genotobiotic calf infected with Reovirus-like agent. *Am J Vet Res* 38(5): 533-538, 1977.
- 30- MENDEZ CH, BRICEÑO-IRRAGORRY L: Diarrea del lactante. Revisión de su etiopatogenia. *Arch Vene Puer* 18: 17, 1955.
- 31- MIDDLETON PJ, SZYMANSKY MT, ABOIT GD, VORTOLUSSI R, HAMILTON JR: Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *Lancet* I: 1241-1244, 1974.
- 32- MIDDLETON PJ, PETRIC M, HEWITT CM, SZYMANSKI MT, TAN JS: Counter immunoelectro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (Orbi group) antigen and antibody. *J Clin Pathol* 29: 191, 1976.
- 33- NUÑEZ-MONTIEL O, HEROLD F, CASTILLO C. ANGELILLO E, IRAZABAL J, GOMEZ-MALARET S, VITELLI-FORES J: Investigación sobre enterovirus en Venezuela. II. diarrea aguda febril. *Acta Cient Ven* 16(2): 65-73, 1965.
- 34- OROPEZA P, IRAZABAL J, BRICEÑO-IRRAGORRY L: La mortalidad infantil en Caracas desde 1938 a 1942. Las diarreas y enteritis. Su etiología. *Jornadas Venezolanas de Puericultura y Pediatría* 11: 131, 1944.
- 35- PARKS WP, MENNICK JL, QUIROGA LT, KHAN HA: Studies of infantile diarrhea in Kanachi, Pakistan. I. Collection, virus isolation and typing of viruses. *Am J Epidemiol* 84: 382-395, 1966.
- 36- RAMOS-ALVARES M, SABIN AB: Enteropathogenic bacteria. Role in summer diarrheal disease of infancy and early childhood. *JAMA* 176: 147-156, 1958.

- 37- RAMOS-ALVARES M, OLARTE: Diarrheal disease of children. The occurrence of enteropathogenic viruses and bacteria. *Am J Child* 107: 218-231, 1964.
- 38- ROGER SM, SCHNAGEL RD, HOLMES IM: Further biochemical characterization, including the detection of sulfure glycoprotein of human, calf and simian Rotavirus. *J Virol* 24(1): 91-98, 1977.
- 39- SCHOUB BD, KOORNHOF HJ, LECATSAS G, PROZESKY OW, FREIMAN I, HARTMAN E, KASSEL H: Viruses in acute summer gastroenteritis in black infants. Letter to the editor. *Lancet* I: 1093-1094, 1975.
- 40- SHARPEE RL, MEBUS CA, BASS EP: Characterization of a calf diarrheal coronavirus. *Am J Vet Res* 37: 1031-1041, 1976.
- 41- SHEPHERD RW, TRUSLOW S, WALKER-SMITH JA, BIRD R, CUTTING W, DARNELL R, VARKER CM: Infantile gastroenteritis: a clinical study of Reovirus-like agent infection. *Lancet* II: 1082-1083, 1975.
- 42- SOTO A, ANGULO N, SUAREZ LM: Prevalencia de algunos echovirus en un sector de la población infantil de Maracaibo, Venezuela. *Invest Clín* 7(20): 23-32, 1966.
- 43- SOUTH MA: Enterophogenic *Escherichia coli* disease. New development and perspectives. *J Pediat* 79: 1, 1971.
- 44- TORRES-MEDINA A, WYATT RG, MEBUS CA, UNDERDAHL NH, KAPIKIAN AZ: Diarrhea caused in gnotobiotic piglets by Reovirus like agent of human infantile gastroenteritis. *J Infect Dis* 133(1): 22-27, 1976.
- 45- TSUNEO M, NAGOYOSHI S, OZAKI T, ISOMURA S, SUZUKI S: Immunofluorescence of human Reovirus-like agent of infantile diarrheal. *Lancet* II: 695, 1976.
- 46- VIERA-TORRES B, MAZZALI-ILJA RM, ESPARZA J: Epidemiological aspects of Rotavirus infection in hospitalized children with gastroenteritis. *Amer J Trop Med Hyg* 27(3): 567-572, 1978.
- 47- WALIA BNS, GUPTE SP, MEHTA S, AGGARWAL KC: Chronic diarrheal in North Indian children. *Indian J Med Rec* (59) 1448-1453, 1971.
- 48- WOODE GN, BRIDGER JC, JONES JM, FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES HA, WHITE GBB: Morphological and antigenic relationships between viruses (Rotavirus) from acute gastroenteritis of



children, calves, piglets, mice and foals. *Infect Immun* 14(3): 804-810, 1976.

- 49- WYATT RG, KAPIKIAN AZ, THORHILL TS, SERENO HW, KIM HW, CHANOCK RM: In vitro cultivation in human fetal intestinal organ culture of a Reovirus-like agent associated with non-bacterial gastroenteritis in infants and children. *J Infect Dis* 130: 523-528, 1974.
- 50- WYATT RG, DOLIN R, BLACKLOW RN, DUPONT HL, BUSCHORF, THORHILL TS, KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM: Comparison of three agent of acute infectious non-bacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 129: 709-714, 1974.
- 51- WYATT RG, SLY DL, LONDON WT, PALMER EA, KALICA RM, KAPIKIAN AS: Induction of diarrhea in colostrum deprived newborn rhesus monkeys with the human Reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Arch Virol* 50: 17-27, 1976.
-