

## Tesis de Posgrado

# Rotavirus como agente causal de gastroenteritis infantiles en Buenos Aires

Muchinik, Guillermo Rafael

1980

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Muchinik, Guillermo Rafael. (1980). Rotavirus como agente causal de gastroenteritis infantiles en Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1625\\_Muchinik.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1625_Muchinik.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Muchinik, Guillermo Rafael. "Rotavirus como agente causal de gastroenteritis infantiles en Buenos Aires". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1625\\_Muchinik.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1625_Muchinik.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

ROTAVIRUS COMO AGENTE CAUSAL DE GASTROENTERITIS  
INFANTILES EN BUENOS AIRES

Guillermo Rafael Muchinik

Tesis presentada para optar por el título de  
Doctor en Ciencias Biológicas

- 1980 -

25  
Ej:2

Director de Tesis:  
Dr.Saúl Grinstein.

Consejero de Estudios:  
Dr.Jorge M.de Carlo.

A mis padres por su maravilloso ejemplo de  
lucha y esfuerzo constante.

A la memoria de mi abuelo materno quien,  
con errores o virtudes, vislumbró un cami-  
no en la ciencia.

A Irene quien me acompaña en la lucha.

A Saúl, mi maestro y guía en el camino de  
la investigación.

## Agradezco

al Dr. Eduardo Scodeller por su constante y desinteresada ayuda en el trabajo y en la revisión de este manuscrito.-

al Dr. José Esparza Bracho por abrirme el camino hacia el estudio de los rotavirus.-

al personal profesional y técnico del Laboratorio de Virología del Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez" por su cooperación y, en especial, a los estudiantes Jorge Gómez, Andrés Berco- vich y Ricardo Corral, sin quienes habría sido difícil deslindar responsabilidades para poder realizar este trabajo.-

a los Dres. César Bergada y Marco Rivarola y al personal profesional de C.E.D.I.E., Centro de Investigaciones Endocrinológicas del Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez", por su cooperación técnica, sin la cual este trabajo habría sido irrealizable.-

al Dr. César Vázquez y al personal profesional y técnico de C.E.V.A.N., Centro de Virología Animal, por su colaboración profesional y técnica y por la amistad brindada en el trabajo diario.-

al Dr. Angel Plaza, jefe de la Unidad 8 del Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez" y a todos los residentes que por dicha sala han rotado, su esfuerzo y logros en la obtención del material indis-

///...

///...

pensable para esta tesis.-

al Dr.Sergio Tisminetsky por su amistad en estos años de trabajo.-

a C.E.D.I.Q.U.I.F.A., Centro de Estudios para el Desarrollo de la Industria Químico-Farmacéutica, el apoyo económico brindado en los inicios de esta investigación.-

a todos aquellos que, de una u otra manera, hicieron posible la ejecución de este trabajo.-

"Quienes se sientan subyugados por la invencibilidad del espíritu humano y la incesante eficacia del método científico como herramienta útil para desentrañar las complejidades del Universo, encontrarán muy vivificador e incitante el veloz progreso de la ciencia.

Isaac Asimov  
de "Introducción a la Ciencia"

## I. INTRODUCCION



## 1) LA GASTROENTERITIS COMO PROBLEMA EN SALUD PUBLICA

La gastroenteritis se define como una enfermedad caracterizada por nauseas, vómitos, cólicos abdominales, diarrea y, ocasionalmente, fiebre.-

En muchos países del mundo, incluido el Hemisferio Occidental y, especialmente en los países en vías de desarrollo, incluida la Argentina, la diarrea infantil constituye un importante problema sanitario en razón de su alta morbilidad y mortalidad. Según datos, entre 1.000.000 de defunciones registradas en niños menores de 5 años en América Latina, 250.000 se debieron a diarrea aguda (Informe OPS). La Tabla 1 nos muestra la mortalidad por enfermedades diarreicas entre niños menores de 5 años de edad en 15 ciudades de América.-

Hacia fines de 1970, las infecciones entéricas constituyeron una de las tres primeras causas de defunción en niños menores de 1 año en 22 países de América. En 11 de estos países, con una población equivalente al 69% de la población total de 20 países analizados, dichas enfermedades originaron más del 15% de todas las defunciones observadas antes del quinto mes de vida (OPS III 7° Reunión Especial Ministros de Salud de las Américas, 1972).-

La Investigación Interamericana de Mortalidad en la Niñez, realizada por la OPS, reveló que las tasas de mortalidad fluctuaron de 22,2 a 11,94 por 1.000 niños menores de 5 años, siendo dichas tasas mucho más elevadas en el primer año de vida (Puffer y col., 1973).-

Dichas infecciones presentan, en nuestro país, una elevada prevalencia con brotes epidémicos, siendo causa frecuente de severo padecimiento y con potencial riesgo de muerte, afectando con mayor frecuencia a los sectores de nivel socio-

económico más bajo de nuestra población. Está claro que, tanto en nuestra población como en la de otros países, el nivel socio-económico (manifestado por grado de contaminación de aguas para beber, adecuada depuración de aguas fecales y correcta alimentación) determina una mayor susceptibilidad a esta infección.-

La desnutrición y la infección cohabitan en un mismo medio social; no es la desnutrición lo que induciría la susceptibilidad a las infecciones, sino que la infección agrava la desnutrición.-

Esta interrelación, que puede calificarse de sinérgica, explica por qué en la Investigación Interamericana de la Mortalidad en la Niñez se encontró que, en toda muestra estudiada, la enfermedad diarreica fue la causa básica de muerte más importante. Asimismo, se observó que la desnutrición figuraba como causa asociada en el 60-81% de las defunciones por diarrea (OPS XIX Discusiones Técnicas, 1975).-

Ciudad	Tasas por 1.000.000 habitantes
San Salvador (El Salvador)	1.193,9
Recife (Brasil)	1.023,3
Resistencia (Argentina)	687,6
La Paz (Bolivia)	653,5
Cali (Colombia)	504,9
Sao Paulo (Brasil)	492,4
Monterrey (México)	487,7
Medellín (Colombia)	446,9
Cartagena (Colombia)	375,6
Ribeirao Preto (Brasil)	283,8
Santiago (Chile)	253,6
San Juan (Argentina)	253,6
Kingston (Jamaica)	220,9
San Francisco (Estados Unidos de América)	20,9
Sherbrooke (Canadá)	3,3

Tabla 1: Mortalidad por enfermedades  
diarreicas entre menores de  
5 años de edad, 1968-1971,  
en 15 ciudades de las Amé-  
ricas.-

Puffer R.R.y C.V.Serrano Caracte-  
rísticas de la mortalidad en la  
niñez, Publicación Científica de la  
POS N°262, Washington, D.C.(1973),pág.  
146.-

### 1.1. MECANISMOS DE TRANSMISION

Las infecciones entéricas, tanto las de etiología com-  
probada como las enteritis indiferenciadas, tienen mecanis-  
mos de transmisión comunes. Fuera de la intoxicación alimen-

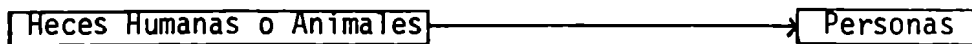
///...

///...

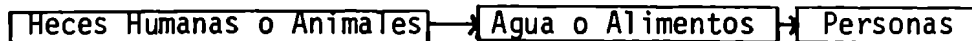
taria, que se propaga de un modo particular, esos mecanismos dependen de la ingestión de excremento. Esta enfermedad tiene muchos medios posibles de transmisión a través de las heces de procedencia humana o animal; de esta manera podemos incluir, entre ellos, al agua, a los alimentos y a la leche, a las moscas y otros insectos o bien al contacto directo (Cuadro I).-

---

I Persona a Persona o  
Animal a Persona



II Vehículo o Fuente Común




---

Cuadro I: Mecanismos básicos de la transmisión de las infecciones entéricas.-

Debido a las causas antes dichas, se puede decir que el agente infeccioso que contienen los excrementos puede pasar a su nuevo huésped ya sea, con escasa demora y recorriendo una distancia pequeña, o con gran dilación y luego de un trayecto largo.-

Sin embargo, debe marcarse que pueden existir diferencias según los tipos de distribución: las infecciones entéricas endémicas y esporádicas se transmiten, sobre todo, por contacto directo, es decir, de manos a boca, mientras que la transmisión indirecta se realiza a través de los objetos recién contaminados con heces. Cuando los dedos no intervienen en el contacto directo pueden propagar la infección contaminando

los alimentos que tocan y, a veces, el agua almacenada en la casa. En cambio, las infecciones entéricas epidémicas se originan, por lo general, en una fuente común y se propagan a través del agua, la leche o los alimentos sólidos, y los brotes de la enfermedad aparecen y desaparecen bruscamente.-

## 2) ETIOLOGIA DE LAS GASTROENTERITIS

Los agentes causales de la gastroenteritis pueden ser bacterianos o virales (Cuadro II).-

Bacterianas	Virales
Salmonella	Agente Norwalk
Shigella	Rotavirus
Escherichia coli	Adenovirus?
Estafilococo	Coronavirus?
Vibrio cholerae	Calicivirus?
Vibrio parahaemolyticus	Minirrotavirus?
Yersinia enterocolitica	
Campilobacter sp	

Cuadro II: Etiología de las gastroenteritis agudas en niños.-

### 2.1. LAS BACTERIAS COMO CAUSA DE GASTROENTERITIS AGUDAS

Hasta la actualidad se han realizado notables progresos en el conocimiento de la gastroenteritis. Ciertos patógenos, tales como Salmonella, Shigella, Escherichia coli enteropatógena han demostrado ser agentes causales de la gastroenteritis; sin embargo, estos patógenos no se aíslan sino en un relativamente bajo porcentaje de pacientes, oscilando entre un 20 y un 30% de los casos (López y col., 1975; De Torres, 1977; Breitman y col., 1975).-

Estudios llevados a cabo en el Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez" han permitido observar que el porcentaje de aislamientos bacterianos en niños con diarrea aguda es, anualmente, semejante a lo descripto en líneas anteriores, ocurriendo el mayor porcentaje de estos aislamientos durante los meses cálidos del año (Ruboglio y col., comunicación personal, 1979). Durante los meses fríos del año tan sólo se obtiene de un 5 a un 15% de identificación bacteriana.-

De los coprocultivos realizados en el Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez" se obtuvo un total de 21% de positivos. De este porcentaje el 12% fue Escherichia coli, el 1.2% Salmonella, el 3% Shigella, el 4% Klebsiela y el 0.3% Proteus (Ruboglio y col., comunicación personal, 1979).-

En 1961 Lubin, Girola y Grinstein realizan un estudio en 1092 niños menores de 2 años con diarrea, encontrándose que Salmonella fue identificada en 12% de los niños, Escherichia coli enteropatogénica en 9.5%, Shigella en 2%, y observándose resultados negativos entre 71 y 80% de los niños con diarrea.-

En estudios que permitirían comparar la identificación de bacterias con las de nuestro medio, citaremos los realizados en Caracas por Fossaert y col. (De Torres, comunicación personal, 1977), quien encontró que el porcentaje de coprocultivos positivos durante el año 1972 en el Hospital de Caracas era sólo del 22.5% con una mayor incidencia de Shigella -14%- sobre Salmonella -7%- y Escherichia coli -7.5%-, y los de Grunwith y col. (1977), quien observó en 1217 niños hospitalizados con gastroenteritis en el Hospital de Niños de Winnipeg, Canadá, únicamente un 25% de identificación de germen bacteriano, y de éstos, se identificaban 120 como Escherichia coli enteropatogénica, 139 como Shigella y 24 como Salmonella.-

*Yersinia enterocolitica* es un bacilo gram negativo que puede ocasionar enterocolitis severas y, ocasionalmente, muerte. Esta enfermedad es más frecuentemente descripta en los países escandinavos y en otros países de Europa. Dado su poco conocimiento hasta el presente, no se pueden establecer consideraciones estadísticas que permitan compararla con la identificación con otras bacterias (Gutman y col., 1973).-

De los otros gérmenes bacterianos, capaces de producir gastroenteritis, *Estafilococo*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahemolyticus* son excluidos de este análisis ya que sus hallazgos en el diagnóstico rutinario de gastroenteritis practicado en nuestro país no son frecuentes. *Campilobacter* sp está recién siendo identificado en los Laboratorios de Bacteriología de nuestro medio.-

Es importante destacar que, actualmente, se ha establecido, a través de experiencias en animales, que los mecanismos patogénicos a través de los cuales las bacterias pueden intervenir en la producción de diarrea son: a) invasión bacteriana de las células epiteliales seguida de rápida multiplicación de bacterias que provocan la destrucción celular y la ulceración de la pared intestinal; b) producción, por algunas bacterias, de una enterotoxina que origina lesión tisular local y disfunción celular; c) ambos procesos juntos (Du Pont y col., 1971; Phillips, 1972; Blacklow y col., 1972).-

Patógeno	Interacción bacteria-mucosa intestinal	Mecanismo patogénico	Localización en el intestino
E.coli	No hay invasión	Producción de enterotoxina	Intestino delgado
Shigella E.coli	Penetración intra-epitelial y multiplicación	Inflamación de la mucosa con destrucción	Al principio, intestino delgado; más tarde, colon
Salmonella	Penetración completa de las células epiteliales	Inflamación de la lámina propia	Intestino delgado y colon

Cuadro III: Patogenia de diarreas bacterianas por los gérmenes más comunes.-

## 2.2. VIRUS COMO AGENTES CAUSALES DE LA GASTROENTERITIS

En vista del gran porcentaje de gastroenteritis en el cual no se logró aislar ninguno de los patógenos reconocidos como agentes causales de la diarrea, se ha sospechado, desde comienzos de la década de 1940, de la etiología viral de la gastroenteritis aguda.-

### 2.2.1. PRIMEROS HALLAZGOS EXPERIMENTALES

Hacia el año 1931 McLean sospecha del origen viral de brotes epidémicos de vómitos y dolor abdominal en la época de invierno en niños de los Estados Unidos.-

En 1943 Light y Hodes logran, con cierto éxito, producir diarrea en gatos y terneros a los que se les administró filtrado de heces libres de bacterias provenientes de un brote de diarrea ocurrido en salas para recién nacidos en Baltimore, Maryland, E.U.A.-



Reimann y col.(1945) producen ingestiones, en voluntarios, de filtrados de suspensiones fecales y de lavados faríngeos, anunciando haber producido la enfermedad.-

En 1947 Gordon y col.transmiten diarrea aguda a voluntarios utilizando, a tal fin, filtrados de heces libres de bacterias obtenidos de un brote ocurrido en el Hospital de Marcy State de Nueva York. Estos filtrados eran efectivos cuando su ingestión se realizaba por boca, pero no cuando eran inhalados como aerosol. Esta infección demostró ser efectiva durante sucesivos pasajes; una vez recobrados de la enfermedad experimental, los voluntarios no podían ser re infectados. Llamaron a su agente cepa "Marcy".-

Estudios similares fueron llevados a cabo al mismo tiempo en Japón, cuyos investigadores lograron producir un inóculo que causaba gastroenteritis aún luego de varios pasajes a través de voluntarios. Este supuesto "virus" fue llamado cepa "Niigata" (Kojima y col., 1948).-

En 1953 Jordan, Gordon y Dorrance hacen experimentos iguales a los de Gordon y Kojima, pero con el agente causal de la gastroenteritis, en familias de Cleveland. Este agente, llamado cepa "FS", producía, a diferencia de lo que no ocurría con la "Marcy", fiebre. Los voluntarios que habían sido infectados con cepa "Marcy" no presentaban reacción cruzada con la cepa "FS", por tanto, eran sensibles a su ataque.-

En base a estos hallazgos se estableció que existían dos virus productores de diarrea, ambos infecciosos para los voluntarios, pero difiriendo, serológicamente, en el tiempo de incubación y en la severidad de la enfermedad.-

Seis agentes infecciosos, las cepas "Marcy", "Niigata" y otras cuatro obtenidas de diversas regiones del Japón, fueron estudiadas para observar posibles reacciones cruzadas entre ellas. Los voluntarios fueron inoculados con la cepa "Marcy" o

con algunas de las cuatro distintas no clasificadas recibiendo, a los 49 días, una reinoculación con la cepa "Niigata"; los resultados mostraron que no existía una nueva enfermedad con el segundo inóculo sugiriendo una relación antigénica entre estos seis agentes (Kojima y col., 1948; Fukumi y col., 1957). Debido a la imposibilidad de identificar el agente o de realizar su cultivo, pronto se abandonó el estudio de estos inóculos. Desde entonces se acumularon sucesivas evidencias que tratan de relacionar a los virus con la gastroenteritis, tanto la epidémica como la esporádica.-

En 1958 Ramos Alvarez y Sabin reportan la asociación de ECHO 6,7 y 4 con diarrea aguda, estudios que son ampliados por Ramos Alvarez y col.(1964) y por Yow y col.(1970).-

En varios trabajos también se ha considerado el rol del virus Coksakie en la gastroenteritis (Behbehani y col., 1969; Pelon y col., 1966; Bhatia, 1970).-

En la mayoría de estos estudios se obtenían aislamientos de un 20 a un 50%; sin embargo, los controles presentaban valores de identificación de virus mayores del 20% (Ramón Alvarez y col., 1958); Behbehani y col., 1966; Yow y col., 1970). En estudios de países subdesarrollados los virus entéricos fueron identificados en un 80% de los niños con diarrea; sin embargo, 40 a 80% de los controles excretaban virus similares (Pelon, 1966; Parks y col., 1967). Dada la falta de una clara asociación diarrea-virus, se eliminó parcialmente un rol de importancia de virus tipo Coksakie y ECHO de las gastroenteritis. No obstante, y debido a presentes evidencias aunque no muy numerosas, se presta aún a dudas el rol de ciertos virus en esta patogenia: Adenovirus y Coronavirus; por tal razón, estos virus presentarán un pequeño análisis especial en el desarrollo de este capítulo.-

### 2.2.2. AGENTES DEL GRUPO DE "NORWALK"

Antes del verano de 1972 no existía un virus que pudiera ser implicado como un agente etiológico importante de la gastroenteritis pero, a partir de dicha fecha, grupos de agentes virales fueron identificados como causas reales de la gastroenteritis aguda no bacteriana.-

En el primer grupo de virus descubierto encontramos, como prototipo, el agente de "Norwalk", quizás el más estudiado de este grupo, y su hallazgo se debe a un brote de gastroenteritis originado en una escuela pública de Norwalk, Ohio, en 1968, observándose, en aquella ocasión, una dispersión de este agente en la comunidad en un porcentaje mayor del 50%; existió una agresión secundaria del agente en un 32% de los contactos familiares (Adler y col., 1969). Tanto adultos como niños fueron afectados y la enfermedad presentó un promedio de duración de 24 a 48 horas.-

En 1971 Dolin y col. logran reproducir esta enfermedad en voluntarios que ingieren filtrados libres de bacterias. Dos de cada tres voluntarios resultan afectados en un período no mayor de 48 horas.-

En 1972 Kapikian y col. logran caracterizar estas partículas como de un tamaño de 27 nm, visualizado mediante Inmuno-electromicroscopía (realizada con suero convalesciente de un voluntario infectado, mezclado con extractos filtrados de heces libres de bacterias).-

Dadas sus características epidemiológicas, se ha llamado a la gastroenteritis por este germen como "Gastroenteritis Viral Epidémica", ya que, usualmente, ocurre en familias y comunidades y alcanza a adultos, niños en edad escolar, contactos familiares y, en algunos casos, niños muy pequeños.-

Es detalle importante de mencionar el que estos virus no son cultivables en ninguno de los sistemas celulares explorados

hasta la actualidad, lo que nos permitiría explicar por qué no fueron identificados anteriormente. Las características clínicas duran entre 24 y 48 horas y, generalmente, no se ha requerido administración de fluido vía parenteral en los pacientes.-

Partículas similares a las de "Norwalk" fueron observadas por Inmunolectromicroscopía en filtrados de heces de dos familias que habían padecido una epidemia de gastroenteritis; una fue observada en Hawaii; la otra, en el condado de Montgomery (MC), Maryland (Thornhill y col., 1977). Realizando reacciones cruzadas por Inmunolectromicroscopía, los agentes "Hawaii" y "Norwalk" mostraron que eran diferentes: "Norwalk" y "MC" estaban relacionados, y con "Hawaii" y "MC" los resultados eran poco convincentes (Kapikian y col., 1972; Wyatt y col., 1975; Thornhill y col., 1977).-

Existen descripciones de otros agentes morfológicamente parecidos al agente de "Norwalk"; uno de ellos fue descrito luego de una epidemia de gastroenteritis ocurrida en una escuela primaria de Ditchling, Inglaterra, donde el 24% de los estudiantes y profesores contrajeron la enfermedad. La otra se describe luego de que un voluntario contrae gastroenteritis por ingestión de filtrado de heces de un niño quien, junto con el 25% de la población de su escuela, es afectado por una epidemia de diarrea. Este nuevo agente se describió como "W" (Appleton y col., 1977; Clarke y col., 1972).-

Posteriores investigaciones llevarían a establecer que existen, por lo menos, cinco agentes asociados con una forma de gastroenteritis epidémica leve.-

Debemos mencionar que todas estas partículas presentan, en general, similares características bioquímicas: morfología, densidad de flotación en gradiente de cloruro de cesio (1.37 a 1.41 g/cm<sup>3</sup>), "Norwalk" y "W" son éter estables, todas son in-

///...

///...

fectivas luego de calentamiento a 60°C por 30' y estables a pH4 durante 3 horas a temperatura ambiente (Kapikian y col., 1974; Dolin y col., 1972; Thornhill y col., 1977; Appleton y col., 1972).-

Tales características de este grupo han llevado a sugerirlo como "parvovirus-like agents", aunque su definitiva clasificación llegará el día en que se logre desarrollar su propagación en cultivos celulares.-

### 2.2.3. ROTAVIRUS Y GASTROENTERITIS

#### 2.2.3.1. CONSIDERACIONES CLINICAS Y EPIDEMIOLOGICAS

En 1973 Bishop y col., examinando biopsias de duodeno de niños con gastroenteritis, reportaron que seis de los nueve casos estudiados presentaban gran número de partículas virales en las células epiteliales. La presencia de estas partículas virales coincidía con anormalidades histiológicas y depresiones en el nivel de las disacaridasas; luego de la recuperación de estos niños se restablecía la pared celular del duodeno y no se observaba virus.-

Dada la morfología, tamaño y ubicación, el virus observado fue descrito como un orbivirus, un grupo de virus RNA doble capsido donde se incluyen, entre otros, aquellos que producen la fiebre hemorrágica de la oveja y la enfermedad del caballo africano. Bishop lo relaciona con el virus EDIM (Banfield y col., 1968) o virus de la diarrea epizoótica del ratón infante (epizootic diarrhea of infant mice). Posteriormente, estos mismos autores confirman los hallazgos pero mediante el examen directo de heces clarificadas (Bishop y col., 1974; Davidson y col., 1975). Diversos investigadores en otros

países confirman más tarde estos hallazgos (Flewet y col., 1974; Kapikian y col., 1974; Middleton y col., 1974). A partir de éstos se establece que este virus está asociado con diarrea en humanos.<sup>7</sup> Sucesivos investigadores lo denominan en forma variada, incluyéndose los nombres Orbivirus (Middleton y col., 1974), Reovirus-"like agent" (Kapikian y col., 1974), Duovirus (Davidson y col., 1975) y Rotavirus (Bryden y col., 1975; Esparza y col., 1977). Nuestro término para este virus será el de "Rotavirus" por ser éste el de mayor popularidad.-

El término rotavirus deriva del término latino "rueda", y se lo ha sugerido debido a que la cápside externa presenta una definida forma circular, lo que le da su apariencia de llanta de una rueda con rayos que parten del centro del eje (Flewet y col., 1974; Flewet, 1976).-

A partir de 1975 se detecta y reporta la presencia de rotavirus en numerosos lugares del mundo: Venezuela (Esparza y col., 1977), Brasil (Baldacci y col., 1979), Sud Africa (Shoub y col., 1975), Japón (Konno y col., 1977), Argentina (Lombardi y col., 1975; Muchinik y col., 1979). En todos estos reportes se encontró a los rotavirus asociados a un alto porcentaje de cuadros diarreicos y, sólo ocasionalmente, en controles sanos. A partir de los datos presentados hasta la actualidad, está claro que LOS ROTAVIRUS SON, PROBABLEMENTE, LOS AGENTES VIRALES DE LA GASTROENTERITIS INFANTIL, aunque aún no se ha descartado plenamente la posibilidad de que otros virus tengan un papel de importancia en dicha enfermedad. En los países donde se ha estudiado, los rotavirus se ha asociado a diarreas en niños de 1 mes a 5 años de vida, aunque se han descripto casos en el período neonatal.-

En la mayoría de los estudios realizados por períodos anuales se ha observado, en este virus, una marcada variación estacional, con aislamientos de hasta un 90% en los meses fríos

del año, y una disminución de hasta un 20% en los meses cálidos (Birch y col., 1977; Konno y col., 1978). En dichos estudios o en otros se ha visto que, aproximadamente el 50% de todos los niños hospitalizados con gastroenteritis, presentaban evidencia de infección por rotavirus (Schreiber y col., 1977; De Torres y col., 1978). Para este virus se ha descrito un tiempo de incubación de 48 horas y una duración de la diarrea de 5 a 8 días (Gómez Barreto y col., 1976; Tufvesson y col., 1976), pudiéndose aislar de las heces de niños hasta 6 días después de la aparición de la enfermedad.-

Diarrea es el síntoma clínico clásico por el cual esta enfermedad es reconocida y, por definición, se la ha observado en la mayoría de los pacientes. Puede haber vómitos precediendo o concomitantemente con la diarrea y, en general, se ha observado fiebre en el 50 a 60% de los casos (Delage y col., 1978). En todos los pacientes se observa daño de la mucosa del duodeno y las disacaridasas se encuentran disminuidas en la mayoría de ellos (Davidson y Barnes, 1979).-

Se han descrito casos fatales por rotavirus (Carlson y col., 1978). Existen evidencias que parecerían indicar que, en recién nacidos, ocurren infecciones endémicas asintomáticas, donde los niños se infectan tempranamente, a veces al 3º día de vida, con aislamiento de virus en heces pero con ninguna sintomatología de las observadas en niños mayores (Chrystie y col., 1978).-

Se ha encontrado una inexplicable relación 3:2, hombre-mujer, en los niños internados con gastroenteritis aguda por rotavirus. Se presume que la transmisión de este virus es persona-persona por la vía feco oral, suponiéndose que los padres u otros hermanos serían los responsables de esta infección debido a que, en ellos, sucederían infecciones subclínicas o manifestaciones clínicas mínimas, que se presume son el

resultado de una resistencia inducida por previa experiencia al virus (Wenman y col., 1979) e, inclusive, se ha llegado a demostrar infección en el 62% de familias donde alguno de sus niños había tenido infección por rotavirus (Hang y col., 1978).-

Rotavirus también ha sido hallado en diversos animales: ratón recién nacido, oveja, conejo, mono, cerdo, potrillo, venado y ternero. La búsqueda de células para realizar cultivo de tejidos de rotavirus obtenido de estos animales ha sido, en su mayoría, infructuosa, a excepción de la del ternero.-

El rotavirus de ternero ha recibido, originalmente, el nombre de "Nebraska calf-diarrhea virus", dado que fue éste el primer animal en que fue individualizado e, inclusive, anterior a su hallazgo en el hombre (Mebus y col., 1969). Su cultivo en células ha sido perfectamente adaptado utilizando las provenientes de riñón de embrión de ternero; esto ha permitido al investigador obtener ciertos adelantos en sus investigaciones. Además de su identidad morfológica, los rotavirus provenientes de diversos animales y el humano comparten ciertos antígenos; la interrelación animal-humano más importante es la existente entre Nebraska calf-diarrhea virus (NCDV) y rotavirus humano (Flewet y col., 1974); esta considerable importancia proviene de que, gracias a la adaptabilidad de NCDV en cultivo de tejidos, se ha podido elaborar gran cantidad de antígeno que se utiliza para reacciones de Fijación de Complemento y, por lo tanto, realizar estudios epidemiológicos con humanos, de los cuales aún no se logrado cultivo de tejidos.-

Al igual que toda infección por germen, la producida por rotavirus va seguida de conversión serológica. Esta ha sido medida por: Inmuno-electromicroscopía (IEM) (Kapikian y col., 1974), Inmunofluorescencia Indirecta (II) (Flewet y col., 1974), neutralización en cultivo de tejidos (NCT) (Flewet y col.,



1974), test de precipitinas fluorescentes (TPF) (Peterson y col., 1976), Fijación de Complemento (FC) (Kapikian y col., 1974; Tufvesson y col., 1976), Contraimmunoelectroforesis Discontinua (CIED) (Middleton y col., 1976; Tufvesson y col., 1976) y ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) (Scherrea y col., 1977). De todas estas técnicas la más usada y disponible es la de Fijación de Complemento utilizando como antígeno ya sea extractos de concentrados de heces de rotavirus humano, o concentrados de virus de Nebraska calf-diarrhea virus crecido en cultivo de células; este último sistema de cultivo es el más utilizado (Kapikian y col., 1975). Mediante la técnica de FC, Gust y col. (1977) han mostrado aumento del título de anticuerpos entre 4 y 6 semanas posteriores a la aparición de los primeros síntomas clínicos, y no observaron alteración significativa de los títulos luego de 1 ó 2 años. La conversión serológica asociada a la enfermedad es un criterio que confirmará la asociación etiológica rotavirus-diarrea.-

Mas, experiencias en animales que cumplen los postulados de Koch han sido una fuerte evidencia en el papel etiológico de este virus. Terneros gnotobióticos recién nacidos inoculados oralmente con rotavirus humano desarrollan la enfermedad entre 2 y 7 días después de la inoculación; los rotavirus pueden entonces ser observados en las heces y reproducen la enfermedad en pasajes seriados (Mebus y col., 1974; Mebus y col., 1976).-

Desde comienzos de sus estudios los investigadores han utilizado el microscopio electrónico como forma de diagnosticar rotavirus en heces de niños (Flewett y col., 1976; Birch y col., 1977); sin embargo, se han descrito técnicas que son tan sensibles como el ME y de mayor practicidad para estudios epidemiológicos ; inclusive, algunas de ellas pueden

ser utilizadas en laboratorios de escasos recursos. La Tabla 2 nos muestra los métodos disponibles para el diagnóstico de rotavirus y su practicidad.-

METODO	EFICIENCIA*	PRACTICIDAD PARA ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS (considerando 4+ como eficiente)
Microscopía Electrónica	4+	1+
Inmunolectromicroscopía	4+	<1+
Cultivo de células (efecto citopático)	<1+	2-3+
Cultivo de células (con Inmunofluorescencia)	1+	<1+
Cultivo de células (con ME)	<1+	<1+
Difusión en gel	1+	4+
Radioinmunoensayo	4+	3-4+
Contrainmunolectroforesis	3-4+	4+
ELISA	4+	4+
Fijación de Complemento	1+	4+

Tabla 2: Eficiencia y practicidad de los métodos disponibles para detección de rotavirus humano obtenido de heces.-

\* De una escala de 1+ a 4+, 1+ indica bajo grado de eficiencia o practicidad, y 4+ indica alto grado de eficiencia o practicidad.-

De las técnicas descriptas en la Tabla 2, las más utilizadas en la actualidad han sido, quizás por su fácil implementación, ELISA (Yolken y col., 1977) y Contrainmunolectroforesis Discontinua (Middleton y col., 1976). Existen trabajos que han comparado la eficiencia de ELISA y CIED con la del microscopio electrónico, obteniéndose resultados altamente satisfactorios (Tufvesson y col., 1976).-

ELISA es una reacción de tipo enzimático y, por tanto, presenta alta sensibilidad, mientras que CIED es una reacción de

difusión en un gel de agarosa aumentada por una corriente eléctrica; ambos métodos permiten diagnósticos en pocas horas, hecho que los ha llevado a ser utilizados en hospitales como rutina. En el Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez" se implementó la CIED para este trabajo, comparándose con la Microscopía Electrónica y obteniéndose resultados altamente confiables que han llevado al médico pediatra a asumir esta técnica como una excelente forma de diagnóstico de esta enfermedad (Muchnik y col., 1978).-

A partir de las reacciones serológicas, Yolken y col.(1978) y Zissis y Lambert (1978) han llegado a determinar la presencia de dos serotipos de rotavirus; el primero, mediante un estudio de 414 niños con gastroenteritis provenientes de diferentes regiones del mundo, empleando la técnica de ELISA, y el segundo mediante FC. Estos serotipos han recibido el nombre de tipo I y tipo II. A partir del estudio de Yolken y col.(1978) se ha establecido que las infecciones por tipo II son predominantes sobre aquéllas por tipo I. Este postulado de mayor virulencia de un serotipo de rotavirus es similar a lo propuesto por Melnick (1976) con poliovirus, donde el tipo I excede a los tipos II y III en su neuropatogenicidad.-

Las infecciones por un serotipo no dan inmunidad frente a un ataque del otro, hecho que ha sido comprobado por aislamiento e identificación de los distintos tipos de rotavirus en infecciones secuenciales de niños.-

Análisis de las heces de niños recién nacidos asintomáticos para rotavirus han demostrado la presencia del tipo II; esto plantearía un aspecto fascinante de la epidemiología de rotavirus: por qué el tipo II, asintomático en recién nacidos, es más patogénico que el tipo I en niños más grandes.-

No se han observado variaciones estadísticas significativas entre la aparición de los tipos I y II en los períodos anuales

y en las distintas edades.-

Espejo y col.,(1977) describen la presencia de tipos distintos de rotavirus mediante el análisis de los patrones de corrida electroforética del RNA.-

De los trabajos de Yolken y col.(1978) e Inglis y col.(1978) se ha demostrado que el calostro humano contiene una significativa concentración de anticuerpos contra rotavirus y, específicamente, IgA secretoria. El nivel de anticuerpos en calostro no se correlaciona con el detectable en la circulación, es decir, es independiente.-

Este anticuerpo específico se ha observado hasta 5 meses posteriores al parto (Cukor y col., 1979).-

Larsen y Holmer (1978) estudiaron durante 2 años a 107 niños menores de 12 meses internados con gastroenteritis, observando que sólo uno era alimentado con leche materna en el momento de admisión; 40 de estos niños eran menores de 6 meses, de lo que queda establecida la importancia del rol de la alimentación materna en niños pequeños.-

Lo establecido aquí con respecto a infecciones por rotavirus y leche materna es, por lo pronto, cierto para otras tantas infecciones. Se ha dicho que calostro y leche humana transfieren una inmunidad específica a las superficies de la mucosa externa del intestino y, posiblemente, al tracto respiratorio del recién nacido. Esta inmunidad pasiva adquirida es importante, tal como vimos recientemente, en el período neonatal, en el cual el sistema inmune secretorio está pobremente desarrollado (Pittard, 1979).-

El calostro humano contiene linfocitos T y B, macrófagos y la mayoría de las inmunoglobulinas, pero el mayor volumen de ellas corresponde a la IgA secretoria (11s). Se ha sugerido que la actividad de la IgA encontrada en la glándula mamaria y calostro deriva del tejido linfoide del intestino (Tomasi y col.,

1968; Goldblum y col., 1975).-

En estas últimas líneas he querido destacar el rol de importancia que juega una buena alimentación materna en las infecciones de niños menores de 6 meses. Esta alimentación es la que hará variar los resultados epidemiológicos en la búsqueda de rotavirus; en general, como se verá más adelante, los niños menores de 6 meses incluidos en este estudio presentaban una alimentación deficiente o no por leche materna.-

#### 2.2.3.2. ASPECTOS MOLECULARES DE ROTAVIRUS

##### 2.2.3.2.a. MORFOLOGIA

Mediante el uso del microscopio electrónico, rotavirus ha podido ser caracterizado morfológicamente como un virus de doble cápside (inner shell, outer shell). Para la cápside externa se ha descrito un diámetro aproximado de 70 nm y, para la interna, uno de 55 nm (Mathan y col., 1977). Mediante ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio se han identificado dos bandas: la primera, que correspondería al virus completo, bandea a 1.36 g/ml. mientras que la otra, correspondiente al virus completo, se observa a 1.38 g/ml (Elías, 1977).-

Esparza y Gil (1978) proponen que la cápside interna es una estructura icosaédrica regular donde cada cara del icosaedro está formada por 16 unidades morfológicas (Fig.1, Foto 1). En este modelo se forman dos tipos de agujeros: agujeros rodeados por cinco unidades morfológicas que siempre se ubican en los vértices (Fig.2, Foto 2), y agujeros formados por seis unidades morfológicas (Fig.1, Foto 1). Además, se puede ver que, luego de un pentámero hay, siempre, tres agujeros localizados en cada uno de los ejes del virión que se distinguen como formados por seis unidades morfológicas (Foto 1, Foto 2). Las u-

///...

///...

nidades morfológicas estarían organizadas de tal manera que, dos de ellas están siempre compartiéndose con cada uno de los agujeros vecinos. El compartir unidades morfológicas ha sido descrito también para reovirus (Vásquez y Tournier, 1964; Amano y col., 1971), y parecería ser un rasgo único entre los virus icosaédricos animales.-

El análisis les ha llevado a establecer 162 cavidades formadas por un arreglo icosaédrico de 320 unidades morfológicas que le darían un patrón característico de  $T=16$ . El análisis de las unidades les mostró que éstas se presentaban como estructuras triméricas dando un total de 960 unidades estructurales o protómeros por virión.-

Para su cápside externa plantean una simetría similar a la observada en la cápside interna. Sin embargo, recientemente y, en desacuerdo con estos resultados, Roseto y col.(1979), utilizando la técnica de "Freeze Drying", encuentran un patrón característico de  $T=13$ , lo que les daría 132 agujeros. Además, demuestran que la cápside externa exhibe una estructura rugosa, perforada en su superficie por pequeños "agujeros" que se corresponden uno a uno con los de la cápside interna.-

Se ha demostrado que las relaciones antigénicas entre rotavirus de distintas especies animales están mediadas por un antígeno o antígenos de la cápside interna del virus (Mathan y col., 1977), aunque su infectividad reside en el virión completo, cápside interna y externa (Elías, 1977).-

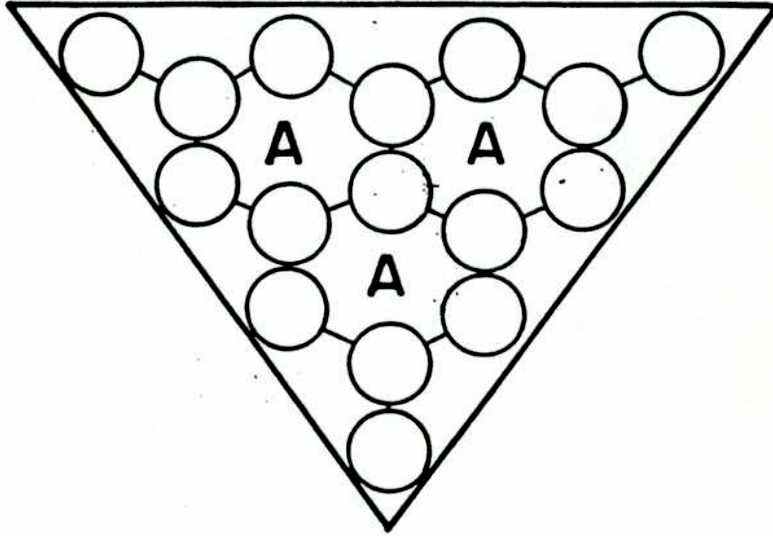


Figura 1: Dibujo esquemático de Modelo, de Esparza, tomado desde el eje de 5 pliegues de Foto 1.-

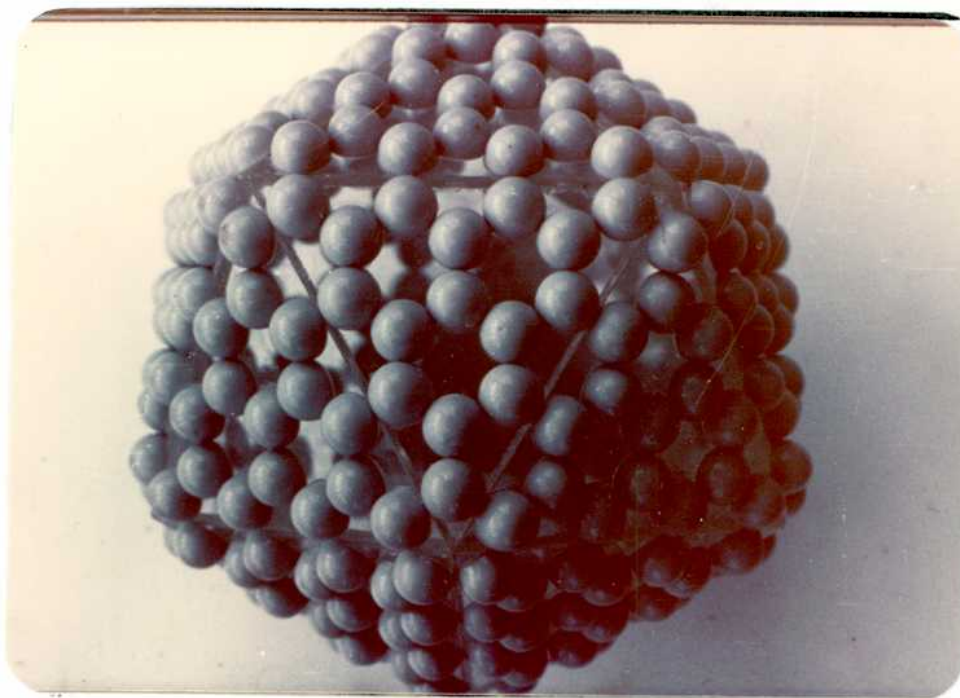


Foto 1: Modelo de ultraestructura de rotavirus humano, propuesto por Esparza y Gil (1978), visto desde el eje de 5 pliegues (five-fold axes).- Foto tomada en la Laboratorio del Dr. Esparza (I.V.I.C., Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela, 1978).-



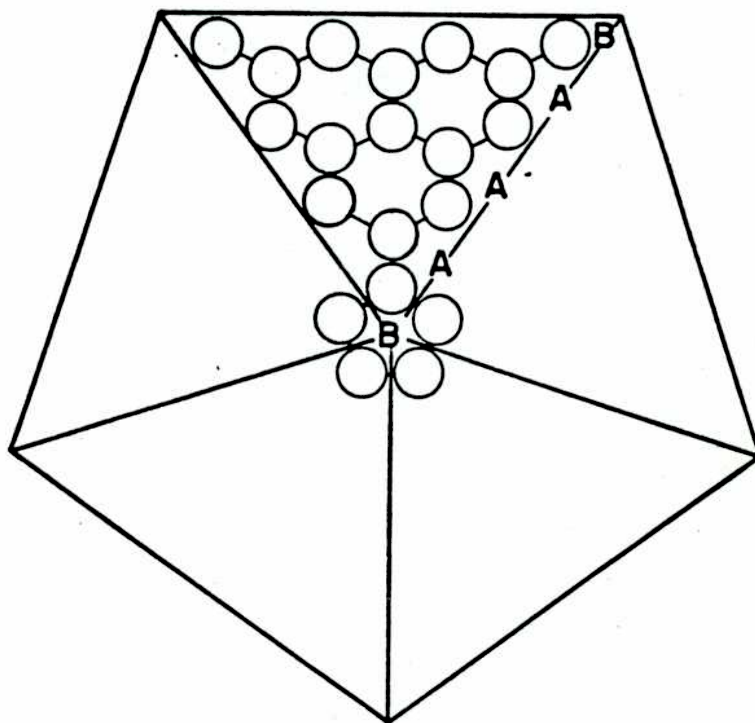


Figura 2: Dibujo esquemático de Modelo, de Esparza, tomado desde el eje de 3 pliegues de Foto 2.-

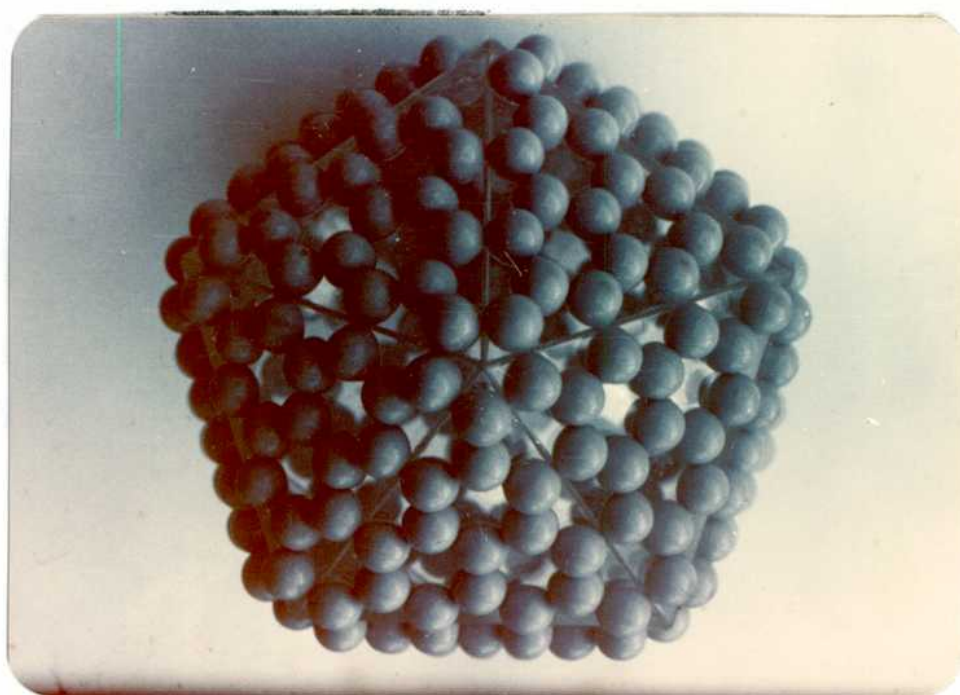


Foto 2: Modelo de ultraestructura de rotavirus humano, propuesto por Esparza y Gil (1978), visto desde el eje de 3 pliegues (three-fold axes).- Foto tomada en el Laboratorio del Dr. Esparza (I.V.I.C., Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela, 1978).-

2.2.3.2.b. PROTEINAS

Mediante el uso de geles de poliacrilamida, se han observado polipéptidos en rotavirus humanos, los que estarían dispuestos: cinco en la cápside interna y tres en la externa. Por tinción ácida de Schiff, se ha visto que los componentes mayores de la cápside externa están glicolizados (Rodger y col., 1977).-

Ian Holmes (1975) ha postulado que estas glicoproteínas pueden tener un rol de importancia en el gobierno de la infectividad del virus.-

Para rotavirus de otras especies animales, entre ellas, el ternero, se han observado nueve polipéptidos, los que estarían ubicados: cinco en la cápside interna y cuatro en la externa, estando el componente mayor de la cápside externa glicolizado.-

HUMANO		TERNERO	
Cápside int.	Cápside ext.	Cápside int.	Cápside ext.
127.000		131.000	
103.000		103.000	
97.000		97.000	
88.000		92.000	
	58.000		58.000
32.000		32.000	
	26.000 glicolizadas		22.000 glicolizada
	21.000 zadas		16.500
			14.500

Tabla 3: Pesos moleculares estimados para polipéptidos de rotavirus humano y de ternero, y su localización en la doble cápside según Rodger, Schnagl y Holmes. J.Virol.1: 91-97, 1977.-

#### 2.2.3.2.c. RNA

Estudios bioquímicos de Schnagl y Holmes (1976) llevados a cabo en Australia, y de Obijeski y Martín (1977) en E.U.A. han llevado a establecer que el genoma de rotavirus es RNA de doble cadena formado por once segmentos con un peso molecular total aproximado de  $14 \times 10^6$  daltons. El mayor de los segmentos correspondería a un peso molecular aproximado de  $2.04 \times 10^6$  daltons, y los más pequeños a  $0.23 \times 10^6$  daltons (Neuman y col., 1975; Schnagl y Holmes, 1976) (Tabla 4).-

Análisis del RNA genómico de rotavirus de pacientes en gels de agarosa han mostrado diferencias en sus patrones de corrida; esto podría deberse, según los autores, a diferencias de serotipos entre ellos (Espejo y col., 1977).-

Se ha demostrado actividad de polimerasa en rotavirus en seis pacientes con gastroenteritis mientras que, en controles, su búsqueda fue negativa (Hruska y col., 1978); esto está de acuerdo con la Biología Molecular del virus, ya que es sabido que todos los virus RNA de doble cadena inician el ciclo replicativo con una polimerasa codificada por el viri6n.-

BANDA VISIBLE Nº1	P.M.APROXIMADO x 10 <sup>6</sup> daltons
1	2.04
2-3	1.58
4	1.40
5	0.81
6	0.75
7-8-9	0.50
10	0.28
11	0.23

Tabla 4: Pesos moleculares estimados para los segmentos del genoma de rotavirus según Schnagel y Holmes. J.Virol.19: 267-270,1976.-

#### 2.2.4. OTROS VIRUS ASOCIADOS CON GASTROENTERITIS

##### 2.2.4.1. ADENOVIRUS

En la mayoría de los trabajos realizados mediante ME, en los cuales se analizaron las heces de niños con gastroenteritis, adenovirus fue observado en un porcentaje de 5 a 15% (Middleton y col.,1977; Esparza y col., 1977; McLean y col., 1977), y esto indicaría que este virus no juega un rol de importancia como causa de la gastroenteritis; sin embargo, existen evidencias que no permiten descartarlo como agente causal de esta enfermedad.-

En 1975 Flewett y col. encuentran un alto porcentaje de adenovirus en heces de niños que concurren a una guardería y que presentan señas de diarrea aguda mientras que no es individualizado en 13 niños sanos.-

En 1979 Richmond y col. describen una pequeña epidemia en niños de una estación militar y aíslan adenovirus como único germen en 17 de 24 niños. Tanto los datos de Flewett y Richmond como los de otros investigadores (Schoub y col., 1975) pueden establecer un factor de evidencia de que los adenovirus pueden causar gastroenteritis. Sin embargo, los hallazgos que han llevado a estas expectativas son escasos y aislados; además, debe tenerse en cuenta el bajo número de aislamientos hechos en otros trabajos -5-15%, en la mayoría de los cuales no se efectuaron adecuados controles que permitiesen establecer diferencias significativas entre grupos de enfermos y control. Un dato importante es que los adenovirus implicados en las gastroenteritis, a diferencia de los otros, no han podido ser cultivados en líneas celulares.-

#### 2.2.4.2. CORONAVIRUS

Los coronavirus son conocidos como agentes etiológicos de gastroenteritis en animales; Tojima (1970) lo describe para cerdos y Stair y col. (1972) para terneros.-

En 1975 Caul, Paver y Clarke encuentran partículas de coronavirus en heces de niños y adultos con diarrea, en la ciudad de Bristol. Similares hallazgos son reportados por Mathan y col. en India (1975).-

Por otra parte, Holmes (comunicación personal, 1978) demuestra que coronavirus son los agentes más frecuentemente observados en ciertas poblaciones aborígenes de Australia.-

El resto de la bibliografía presenta los hallazgos de este virus como hechos casuales y no lo interrelaciona con diarrea por lo tanto, el papel de los coronavirus como agente etiológico de las gastroenteritis, es discutido, aunque

no ha sido profundamente evaluado aún.-

#### 2.2.4.3. "PEQUEÑOS" VIRUS

Existen reportes aislados que identifican a "pequeños" virus en diarreas. La mayoría de estas partículas no son posibles de cultivar en células u órganos y, por tanto, deben realizarse estudios muy severos mediante ME e IEM que permitan a personas bien entrenadas visualizarlas. Algunas de estas partículas han mostrado características morfológicas que permiten realizar una primera clasificación basada en la ME; de esta manera, estos "pequeños" virus han sido llamados: Minirotavirus, Calicivirus (Spratt y col., 1978), Astrovirus, Picorna-Parvovirus (Middleton y col., 1977). La asociación de estos "pequeños" virus con diarrea no ha sido establecida pues, además de ser identificados en un menor porcentaje de casos, también aparecen frecuentemente en los controles sanos.-

## II. MATERIALES Y METODOS



### 3) PACIENTES Y MUESTRAS

Desde Agosto de 1978 hasta Enero de 1980 se estudiaron las heces de 180 niños internados en la Unidad 8 del Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez" con cuadro clínico de gastroenteritis; sus edades oscilaban de 0 a 5 años.-

Entre Enero y Diciembre de 1979 se estudió un grupo control de 120 niños sanos.-

En ambos casos se tomó a cada niño una muestra de 2 a 10 g de heces. Todas las muestras fueron enviadas inmediatamente al Laboratorio de Virología, donde se las colocó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio.-

De los niños internados en la Unidad 8 las heces fueron tomadas en un período no mayor de 48 hs.luego de la internación. La materia fecal que no cumplía este requisito era eliminada de este estudio. Las heces de los niños sanos e internados fueron estudiadas simultáneamente por CIED y por ME.-

Además, de 90 niños del primer grupo, se obtuvo una muestra de suero de aproximadamente  $5^{\pm} 0.5$  cc.; esta muestra de sangre fue tomada simultáneamente con las heces; 8 días después de su internación o en el momento del alta se obtuvo una nueva muestra de sangre.-

Al grupo de niños con gastroenteritis se le confeccionó una breve historia clínica, cuyo modelo se adjunta. Esta ficha, una por cada niño, trató de enfocar todas las características clínicas y de laboratorio que consideré debían tenerse en cuenta en casos de niños con diarreas agudas al momento de su internación. Los datos que posteriormente se consideraron importantes fueron obtenidos del análisis de la historia clínica del niño archivada en el Servicio de Historias Clínicas del Hospital.-

De cada niño del grupo internado con gastroenteritis se tomó, además, un hisopado de heces que se colocó en medio de transporte



ANOTACIONES DEL LABORATORIO

Caso N<sup>o</sup>:                      CIED:  
edad :                        ME:  
fecha :                       copro:

Duracion de la diarrea:  
Tiempo de Internacion:  
Fecha de ingreso:  
Fecha de egreso:-

"Stuart", el cual fue conservado a temperatura ambiente y llevado al Laboratorio para su análisis bacteriológico dentro de las 3 hs. de su toma.-

### 3.1. ESTUDIOS FAMILIARES

De dos pacientes con hallazgos de rotavirus positivo fue posible establecer contacto con los familiares inmediatamente. Al grupo que convivía con el paciente se le tomó una muestra de heces y dos muestras de sangre, con diferencia de 1 mes entre cada una de ellas, para estudio virológico. Estas muestras fueron enviadas al Laboratorio y procesadas de manera igual a la expuesta en el punto anterior.-

### 3.2. ESTUDIOS DE CALOSTRO

Como contribución a este estudio, del Dr. Alberto Díaz (Laboratorios Inmunoquemia S.A., Barcena 1546, Buenos Aires, Argentina) se obtuvieron 30 muestras de calostros humanos de distintas pacientes internadas en diversas clínicas de Buenos Aires.-

Para la detección de anticuerpos antirotavirus en calostro se empleó la técnica de CIED (Cook y col., 1978).-

### 3.3. INVESTIGACION DE ROTAVIRUS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA (ME)

La detección de rotavirus por Microscopía Electrónica (ME) se realizó mediante el proceso descrito por Bishop y col. (1974) con modificaciones.-

Una alícuota de heces de cada paciente fue diluída 1:10 en una solución buffer Tris-ClH (0.002 M pH8.5) y homogeneizada durante 1'. Del homogeneizado se separó una alícuota de 2 ml., utilizada para Contrainmunolectroforesis Discontinua, y el volumen restante se mezcló con medio volumen de FREON 113, agitándose durante

se utilizó en la cuba electroforética un buffer barbital, pH 8.8 (Veronal 1.84 g., Veronal sódico 10.3 g., H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. 1.000 ml.). Como soporte de corrida electroforética se utilizó agarosa 1% (tipo B, high electroendosmosis, Pharmacia, Uppsala, Suecia) preparada en una solución de 1 parte de buffer de cuba y 2 partes de H<sub>2</sub>O destilada con la adición de 0.5% de azida sódica. La fuerza iónica de la agarosa obtenida de esta manera es de 1/3 de la del buffer de la cuba electroforética.-

Se utilizaron portaobjetos de 7.6 x 2.5 cm., a los que se les hizo una precubierta de 1 ml. de agarosa 1% en agua destilada, secándolos luego 2 hs. a 110°C. Estas placas pueden guardarse a temperatura ambiente por meses sin perder su precubierta.-

Para realizar la corrida electroforética sobre los portaobjetos pretratados se colocó 3 ml. de agarosa de electroforesis y, una vez gelificado el soporte, se le practicaron pares de orificios de 3 mm. de diámetro con una distancia centro-centro de cada par de 7 mm. Entre los pares de orificios existió una diferencia mínima de 5 mm. hacia sus costados y de 1 cm. hacia arriba o abajo indistintamente. De esta manera se realizó un máximo de 12 pares de orificios por portaobjeto (Fig. 3).-

El antígeno (homogeneizado de materia fecal cruda obtenida según visto en 3.3.) se colocó en el orificio considerado cátodo y el antisuero específico (obtenido según 3.4.1.) en el orificio correspondiente al ánodo. Como puente electroforético se utilizó papel Whatman N°1 en tiras de 2.5 x 12.7 cm. dobladas en su mitad por el lado más largo. La electroforesis se ensayó durante 180' a una tensión de 150 V, lo que llevó a obtener aproximadamente 10mA por portaobjeto. Se empleó una fuente de poder Cellovolt 2, Chemar N°511 y una cuba elec-

///...

20'. Esta mezcla fue luego clarificada por centrifugación a 5.000xg por 20' a 4°C utilizando una centrífuga Sorvall RC2-B y un rotor SS-34 (Newtown, Connecticut- E.U.A.). La fase acuosa fue recogida, colocada en un colchón de Sacarosa 45% grade I (Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri, E.U.A.) y centrifugada a 100.000xg durante 2 hs.a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L5-65 y un rotor Ti 50 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California, E.U.A.). El precipitado obtenido fue suspendido en aproximadamente 0.5 ml.de buffer Tris-ClH y procesado para su observación al microscopio electrónico.-

Para ME se emplearon grillas de 300 mesh (Ernest Fullan, Inglaterra) recubiertas con parlodion (Mallinckrodt Chemical Works, St.Louis, Missouri, E.U.A.) y reforzadas con una capa de carbón. Sobre la grilla se colocó una gota del material a observar y, luego de 30" aproximadamente, se secó con papel de filtro. Se colocó luego una gota de acetato de uranilo 2% (Mallinckrodt Chemical Works, St.Louis, Missouri, E.U.A.), el que fue eliminado después de 30" de manera igual a la anterior. Las grillas fueron examinadas con un microscopio electrónico JEM 100 C (Jeol.Ltd., Tokyo, Japón), gentilmente cedido por C.E.V.A.N. (Centro de Virología Animal, Serrano 661, Buenos Aires, Argentina). Se dedicó un tiempo de observación de aproximadamente 10' por grilla.-

#### 3.4. INVESTIGACION DE ROTAVIRUS POR CONTRAINMUNOELECTROFORESIS DISCONTINUA (CIED)

La técnica de CIED utilizada es la originalmente descrita por Wallis y Melnick (1971) para el diagnóstico de Antígeno Australiano, pero con ciertas modificaciones para el diagnóstico de rotavirus (Middleton y col., 1976). En esta ocasión

troforética Tank Mod.2 Pac.15 (Chemar S.A., Junín 933, Buenos Aires, Argentina) a la que se le agregaron 180 ml. del buffer Veronal pH 8.8 en cada uno de sus 2 depósitos.-

Luego de realizada la corrida electroforética se efectuó una primera observación en un fondo oscuro con luz tangencial y, posteriormente, los portaobjetos se sumergieron en una solución de ácido tánico 0.6% durante 30' volviéndose a observar.-

A los fines de tomar fotografías de los resultados, se realizó una tinción especial mediante un lavado de 24 hs. en solución fisiológica seguido de un lavado de 4 hs. en agua destilada. El gel de agarosa se secó posteriormente a 60°C y luego se tiñó por 15' con azul de Coomassie 0.2% en metanol-ácido acético-agua (5/1/5); más tarde se decoloró con igual solvente por 1 h.-

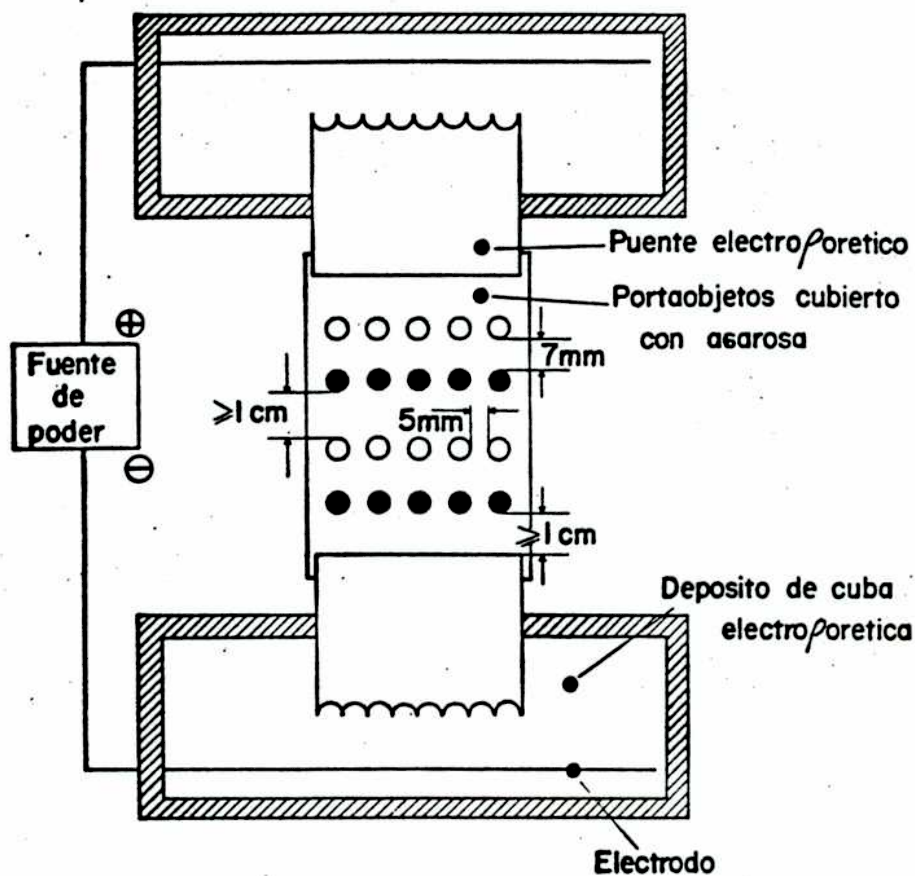


Figura 3: Diagrama básico mostrando los procedimientos para la CIED. En este ejemplo se colocan 2 filas de orificios: ○: orificio donde se coloca el anticuerpo; ●: orificio donde se coloca el antígeno. Los orificios son de 3 mm de diámetro.-



### 3.4.1. DEL ANTISUERO ANTIROTAVIRUS HUMANO

El antisuero antirotavirus humano utilizado en la reacción de CIED fue preparado en base a lo propuesto por Kalica y col. (1977) con modificaciones. Virus parcialmente purificado según lo visto en 3.3. se mezcló en una relación 1:1 con adjuvante completo de Freund (D.I.F.C.O., Michigan, E.U.A.); 0.5 ml. de esta mezcla se inocularon en forma intramuscular en cada pata trasera de los cobayos. A los 45 días se realizaron los recordatorios mediante inoculación intraperitoneal de 0.5 ml. de virus. Un mes después de la última inoculación los animales fueron sangrados por punción cardíaca.-

Se ensayó su eficacia utilizando un control positivo y comparándola con otro antisuero de título conocido; éstos dos últimos, gentilmente cedidos por el Dr. Peter Middleton, Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá.-

### 3.5. FIJACION DE COMPLEMENTO PARA DIAGNOSTICO DE ANTICUERPOS ANTIROTAVIRUS

#### 3.5.1. CULTIVO DE "NEBRASKA CALF-DIARRHEA VIRUS"

Teniendo en cuenta que el antígeno de rotavirus obtenido de heces humanas demostró presentar relaciones antigénicas con los obtenidos de heces de terneros, se aprovechó la facilidad de crecimiento de NCDV en algunas líneas celulares tratando de obtener un buen volumen de rotavirus bovino a fin de utilizarlo como antígeno en estudios sero-epidemiológicos.-

A cultivos primarios de células de riñón de ternero bovino crecidos en medio Eagle se les eliminó el medio de crecimiento lavando las células 2 veces con buffer P.B.S. e inoculándolas posteriormente con 0.2 ml. de NCDV, cepa Lincoln, dejando absorber el virus durante 2 hs. a 37°C antes de agregar

12 ml. de medio mantenimiento. Luego de 24 hs. de incubación se agregó 2% v/v suero fetal bovino (G.I.B.C.O. Laboratories, Madison, Wisconsin, E.U.A.).-

Las células se incubaron a 37°C y se observaron diariamente con el fin de hallar efectos citopáticos. Estos se visualizaron tempranamente como finos gránulos aparecidos en la superficie celular y, posteriormente, como agregados. Generalmente, luego de 6 días, el 75% de las células presentó dichos efectos. En ocasiones, luego de 9 días de incubación, estos efectos no se observaron. En dichos casos se tomó 1 ml. de cada botella, se los reinoculó en nuevos cultivos primarios y se los incubó nuevamente.-

Posteriormente las células fueron sometidas a congelación y descongelación a -70°C en dos ocasiones, y una alícuota de la suspensión obtenida fue, por un primer procedimiento, sonicada por 10' a 5.000 V en un sonicador Branson (Danburg, Connecticut, E.U.A.) y clarificada a 2.000xg por 10' (Sorvall RC2-B rotor SS-34), y el virus fue concentrado por ultracentrifugación a 100.000xg por 60' (Beckman L5-65 rotor Ti50); los precipitados fueron resuspendidos cada uno en volúmenes de 0.5 ml., examinados al microscopio electrónico y, al observarse virus en ellos, se juntaron, se titularon por FC contra un control conocido, se fraccionaron y se conservaron a -20°C hasta su uso.-

Por el otro método empleado, luego de realizar las sucesivas congelaciones, la alícuota restante se concentró mediante un filtro "Amicon" B15 25 veces (Lexington, New Jersey, E.U.A.). Lo obtenido se fraccionó y se congeló (Kapikian y col., 1975; Mebus y col., 1971; Kurogi y col., 1976).-

Posteriores experimentos permitieron optar por el mismo método como técnica para la obtención de antígeno.-

A mediados de 1979, y como colaboración a este trabajo, se recibió del Laboratorio Hoescht (25 de Mayo 375, Buenos Aires, Argentina) antígeno de NCDV (N°serie OTGB 04-05 Lote N°A 410116 B Título 1:10) así como también controles positivos (N°serie OTGC 02-03 Lote N°M 410307 B Título 1:320) preparado por el Behring Institut de Alemania. Se ensayó su eficacia comparando algunos sueros de pacientes previamente titulados con antígeno preparado en mi Laboratorio. Viendo una buena correlación en los datos, decidí optar por este antígeno dada la conveniencia de su obtención.-

El inóculo inicial de Nebraska calf-diarrhea virus, cepa Lincoln, utilizado para realizar estos cultivos, fue gentilmente enviado por el Dr. Charles Mebus, Plum Animal Disease Center, Nueva York, E.U.A..-

Las células de riñón de ternero recién nacido fueron cedidas por el Dr. Eduardo Palma, actualmente en el Laboratorio de Virología del I.N.T.A. (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Provincia de Buenos Aires, Argentina).-

### 3.5.2. REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO (FC)

La técnica de FC que se utilizó es la descripta por Seaver y col. en 1969, empleándose microplacas de polivinilo "no descartables" (Chemar S.A.).-

El antígeno utilizado durante el primer año de esta investigación se preparó según lo visto anteriormente y se tituló frente a un suero de título conocido (cedido por el Dr. Middleton) mediante la técnica de "block filtration" descripta por Seaver en 1969. El antígeno (de origen comercial) utilizado posteriormente presentaba un título de referencia de laboratorio que, realizando los controles pertinentes, se verificó era el ideal.-

Se utilizaron 2 unidades de antígeno, 2 unidades de complemento (Casa Gutiérrez, Araujo 153, Buenos Aires, Argentina) y 2 unidades de hemolisina (The Sylvania Co., Ohio, E.U.A.).-

La mezcla de antígeno y anticuerpo fue incubada por 20' a temperatura ambiente y por 60' a 40°C antes del agregado del complemento. Esta mezcla se incubó toda la noche a 4°C, colocando luego el sistema hemolítico (hemolisina - glóbulos rojos de carnero) durante 30' a 37°C.-

La reacción de FC se realizó en cada paciente con los sueros de período agudo y convalescente. Se tomó 1/4 como el título límite, por debajo del cual los valores obtenidos se consideraron negativos.-

Un aumento de 4 ó más diluciones fue considerado como una respuesta significativa a la infección por rotavirus.-

### 3.6. INVESTIGACION BACTERIOLOGICA

La investigación bacteriológica de las muestras obtenidas de los pacientes internados fue realizada en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez" (dirigido por la Dra.A.Ruboglio).-

Las muestras transportadas en medio de "Stuart" fueron suspendidas en solución fisiológica y sembradas luego en medios selectivos de agar SS (Salmonella-Shigella), agar LBT (Lactosa bromotimol) y agar Sabouraud, e incubadas durante 24 hs. a 37°C.-

De obtenerse desarrollo, se llevó a cabo la tipificación, empleándose, a tal fin, los medios de MRVP (Rojo de Metilo Voges Proskauer), Triptona (Rojo de Timol), SV (Suracoveola, desdoblamiento de urea y movilidad), TSI (Tri Sugar Iron, Glucosa, Lactosa, Sacarosa).-

Los resultados se establecieron comparando las reacciones bioquímicas de tipificación con cuadros identificatorios.-

### 3.7. PURIFICACION DE ROTAVIRUS

Las muestras de heces positivas de las cuales se conservaba un excedente, fueron diluídas, homogeneizadas y clarificadas tal como se describió en 3.3. La fase acuosa del clarificado fue nuevamente colocada en medio volumen de FREON 113 agitado durante 20'. Se centrifugó a 3.000xg durante 20' a 4°C usando una centrífuga Sorvall RC2-B y rotor SS-34. Se midió la fase acuosa y se le agregó polietilenglicol 6.000 con concentración final del 8% (Merck, Munich, Alemania) dejándola a 4°C toda la noche; entonces se la centrifugó a 3.000xg por 30' a 4°C. El precipitado, conteniendo los virus, fue suspendido en 2 ml. de buffer Tris-ClH. Este material fue colocado sobre un colchón de Sacarosa 45% de 3 ml. y ultracentrifugado a 100.000xg durante 2 hs. a 4°C utilizando un rotor SW41 y una ultracentrífuga Beckman L5-65 (Bishop y col., 1974).-

El virus obtenido del procedimiento anterior fue resuspendido en 1 ml. de buffer Tris-ClH y mezclado con una solución de ClCs (Merck) con densidad de flotación final 1.363 g/cm<sup>3</sup> (190.7 mg. CsCl/ml. de solución). Este material fue ultracentrifugado a 150.000xg durante 18 hs. utilizando un rotor SW41 y una ultracentrífuga Beckman L5-65. Transcurrido el tiempo necesario, se fraccionó el gradiente manualmente por punción en la parte inferior del tubo, recogiénose 30 gotas por fracción. Cada 2 fracciones se leyó el índice de refracción ( $\eta$ ) en un refractómetro (Pay, Moscú, U.S.S.R.) y se calculó la densidad de cada una de ellas en base a la fórmula  $\rho = 10.242 \times \eta - 12.6483$ .- A todas las fracciones se les realizó lecturas de absorción de luz ultravioleta a longitudes de

onda de 260 a 280 nm (Espectrofotómetro, Gildford Instruments, Madison, Wisconsin, E.U.A.). Tres fracciones fueron realizadas contra buffer Tris-ClH durante 24 hs., observadas al microscopio electrónico y congeladas para usos posteriores.-

### 3.8. IODINACION DE ROTAVIRUS

La reacción de iodinación utilizada fue según el método descrito por Marchalonis en 1969. A tal fin, 100  $\mu\text{g}$  (100  $\mu\text{l}$ ) de virus purificado se mezclaron con 0.5  $\mu\text{g}$  (10  $\mu\text{l}$ ) de lactoperoxidasa (Calbiochem, Lote 427466, B.grade) y 250  $\mu\text{Ci}$  (5  $\mu\text{l}$ ) de  $\text{NaI}^{25}$  (Sodium Iodide- $\text{I}^{25}$  canier free, 50  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ , New England Nuclear, Boston, Massachusetts, E.U.A.). El volumen total de la reacción fue de 115  $\mu\text{l}$  y la reacción fue iniciada por la adición de 5  $\mu\text{l}$  de agua oxigenada 8.8.mM y vigorosa agitación. Se repitió el agregado a los 3 y a los 6', haciendo un volumen total de  $\text{M}_2\text{O}_2$  de 15  $\mu\text{l}$ . La reacción se interrumpió con la adición de 0.5 ml. de L-Cystina 5 mM. El virus iodinado fue ultracentrifugado en ClCs y recogido tal como se describió en el punto anterior; se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de cada fracción y se agregó 0.05 ml. de albúmina bovina 5%, 100  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético 10% ATA, incubándose de 10 a 15' a 5°C. Cada fracción se filtró en filtros Millipore 0.65  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, E.U.A.), se lavó 2 veces con ATA y se midió su radioactividad mediante viales de centelleo y 5 ml. de líquido de centelleo (Acquasol, New England Nuclear).-

### 3.9. DETERMINACION DE LOS POLIPEPTIDOS DE ROTAVIRUS

Los polipéptidos de rotavirus de algunos pacientes fueron determinados mediante el uso de geles discontinuos de poliacrilamida 8.75% según método de Laemmli (1970). Las preparaciones de rotavirus fueron purificadas según se vio en el punto 3.7.

Las purificaciones de rotavirus fueron disociadas utilizando 100  $\mu$ l de virus, 100  $\mu$ l de urea 8 M (BDH Chemicals Ltd., Poole, England), 25  $\mu$ l de SDS 10% (Fisher Scientific Corporation, Springfield, New Jersey, E.U.A.) y 10  $\mu$ l de 2 Mercaptoetanol (BDH Chemicals Ltd.), calentadas a ebullición (90°C) durante 5'. Transcurrido ese lapso, se añadió 1 gota de glicerina 20% (Fisher Scientific Corporation) y 5  $\mu$ l de azul de bromofenol (BDH Chemicals Ltd.).-

Los geles de poliacrilamida fueron precorridos durante 30' a 2mA/gel, y luego de colocados 200  $\mu$ l de la muestra, se realizó la electroforesis a 5mA/gel durante 4 hs. Posteriormente se fijaron los geles en una solución ácido acético 7%, isopropanol 3% y agua durante 16 hs. Teñidos luego con Coomasie blue 0.5% (BDH Chemicals Ltd.) diluído 1:10 con una mezcla de isopropanol, ácido acético y agua, se decoloraron con la misma mezcla utilizada para la fijación.-

La estimación de los pesos moleculares fue determinada comparándolos con la movilidad electroforética de polipéptidos de peso molecular conocido. A tal fin se utilizó B galactosidasa (P.M.130.000) grade IV, sero-albúmina bovina (P.M.67.000) fracción V, aldolasa (de músculo de conejo, P.M.40.000), tripsina (P.M.23.300), mioglobina (P.M.17.200) y citocromo C (P.M.11.700), todos estos productos obtenidos de Sigma Chemical Co..-

### 3.10. ANALISIS DEL RNA GENOMICO DE ROTAVIRUS EN GELES DE AGAROSA

El objetivo de este análisis fue poder comparar los pesos moleculares de los RNA genómicos provenientes de distintos pacientes. Espejo y col.(1977) demostraron la existencia de tales diferencias y que, según ellos, podrían estar relacionadas con distintos serotipos.-

A tal fin se realizaron slabs horizontales; éstos fueron preparados en placas de vidrio de 15.5 x 13.5 cm. sobre las que se puso un recuadro de acrílico de una única pieza con un perímetro interior de 15 x 12.5 cm., grosor 4 mm. (preparado por el C.E.V.A.N.). Este fue llenado con un volumen aproximado de 60 ml. de agarosa 2% en buffer de Loening (1969) (gel electrophoresis grade, BRL, Bethesda Research Laboratories, Rockville, Maryland, E.U.A.). Antes de su gelificación se colocó un peine de, generalmente, 12 calles. Luego de solidificarse el gel, se retiró el peine y, posteriormente, el recuadro de acrílico. De esta manera, el gel quedó fijo a la superficie de vidrio. Luego éste fue colocado en el fondo de una cuba electroforética, preparada en el C.E.V.A.N., que consistía en un recipiente plástico de una única pieza de 5 x 11 x 8 cm. y donde se colocaron electrodos en ambos costados interiores; el gel fue cubierto con 500 ml. de buffer de Loening. En los orificios dejados por el peine se sembraron aproximadamente 25  $\mu$ l de muestra y fueron corridos a 20 V durante toda la noche (16 hs.) mediante una fuente de poder Shandon (Southern Instruments, Inc., Ltd., Sirey, Inglaterra). Posteriormente los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio 1  $\mu$ g/ml (BDH Chemicals Ltd.); transcurridos 30' se observaron por transiluminación con luz ultravioleta (Short Wave transilluminator, Ultraviolet Prod., San Gabriel, California, E.U.A.). Se tomaron fotografías mediante film Kodak TXP 135 y filtro rojo Leitz.-

Las muestras a ser sembradas fueron obtenidas de pacientes con hallazgos positivos para rotavirus. De ellos, las heces fueron homogeneizadas, clarificadas, precipitadas con polietilenglicol 6.000 y ultracentrifugadas en un colchón de sacarosa 45%, tal como se describió en el punto 3.7.-



El pellet obtenido de esta purificación fue resuspendido en 40  $\mu$ l de una solución 1% Sodio Dodecil Sulfato (Fisher Scientific Corporation), 0.1% 2-mercaptoetanol (BDH Biochemical Ltd.) y 6 mM de etilendiaminotetraacético (EDTA) (Fisher Scientific Corporation) pH7.0 e incubado durante 1 h. a 55°C. A la mezcla se le agregó, posteriormente, 5  $\mu$ l de una mezcla agarosa 0.2%, sacarosa 20% y azul de bromofenol 0.2%. Se sembró y se corrió tal como los especificado anteriormente.-

### III. RESULTADOS

#### 4) IDENTIFICACION DE GERMENES

El estudio sistemático de 180 heces permitted identificar rotavirus en 62 casos (34%) de los niños con gastroenteritis mientras que, en el grupo control, se observaron tan sólo en 3 (2.5%) de los 120 niños estudiados (Foto 3).-

De los niños con gastroenteritis, en 4 casos se reconoció adenovirus (2.2%) (Foto 4), Coronavirus en 2 casos (1.1%) y partículas virales pequeñas redondeadas en 1 caso (0.5%); en esta ocasión, y dado que el único parámetro que hubo para detectar las partículas fue el ME denominé "picovirus" para hacer referencia a su pequeño tamaño (Tabla 5).-

Bacterias consideradas como enteropatógenas (Salmonella, Shigella, E.coli y Klebsiela) fueron aisladas en un porcentaje del 20% en los niños con gastroenteritis. De estos gérmenes, E.coli fue identificado en el 12% de los casos, Salmonella en el 2.2%, Shigella en el 2.7% y Klebsiela en el 2.22%. En el grupo de niños sanos no fue posible realizar identificación bacteriana.-

	GASTROENTERITIS <sup>a</sup>		CONTROLES <sup>b</sup>	
	N°	%	N°	%
Rotavirus	62	34	3	2.5
Adenovirus	4	2.2	1	0.8
Coronavirus	2	1.1	0	0
Picovirus	1	0.5	0	0

Tabla 5: Identificación de virus en heces de niños con gastroenteritis y controles.-

a: Se estudió un total de 180 niños en un período comprendido entre Agosto de 1978 y Enero de 1980, ambos inclusive.-

b: Se estudió un total de 120 niños sanos entre los meses Enero y Diciembre de 1979, ambos inclusive.-

#### 4.1. ASOCIACION ROTAVIRUS-BACTERIAS

En diversas ocasiones se observó que existía asociación entre una bacteria y rotavirus. De los 180 casos que comprende al grupo de niños internados, en 52 de ellos (29%), rotavirus fue identificado como único agente causal de la gastroenteritis mientras que, en 10 casos (18%), existió identificación viral y bacteriana (Tabla 6).-

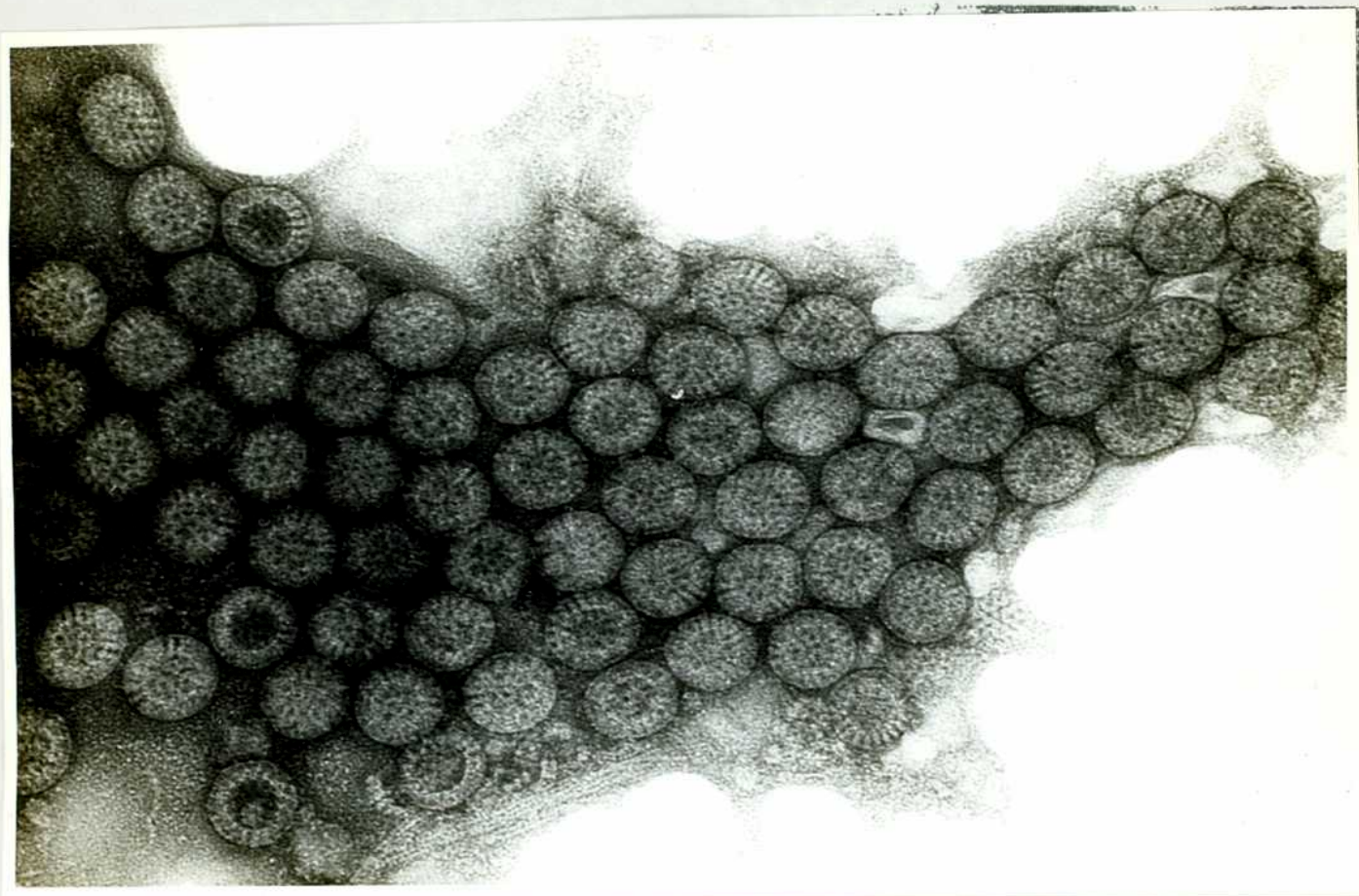


Foto 3: Partículas de rotavirus observadas  
al Microscopio Electrónico (x 200.000).-



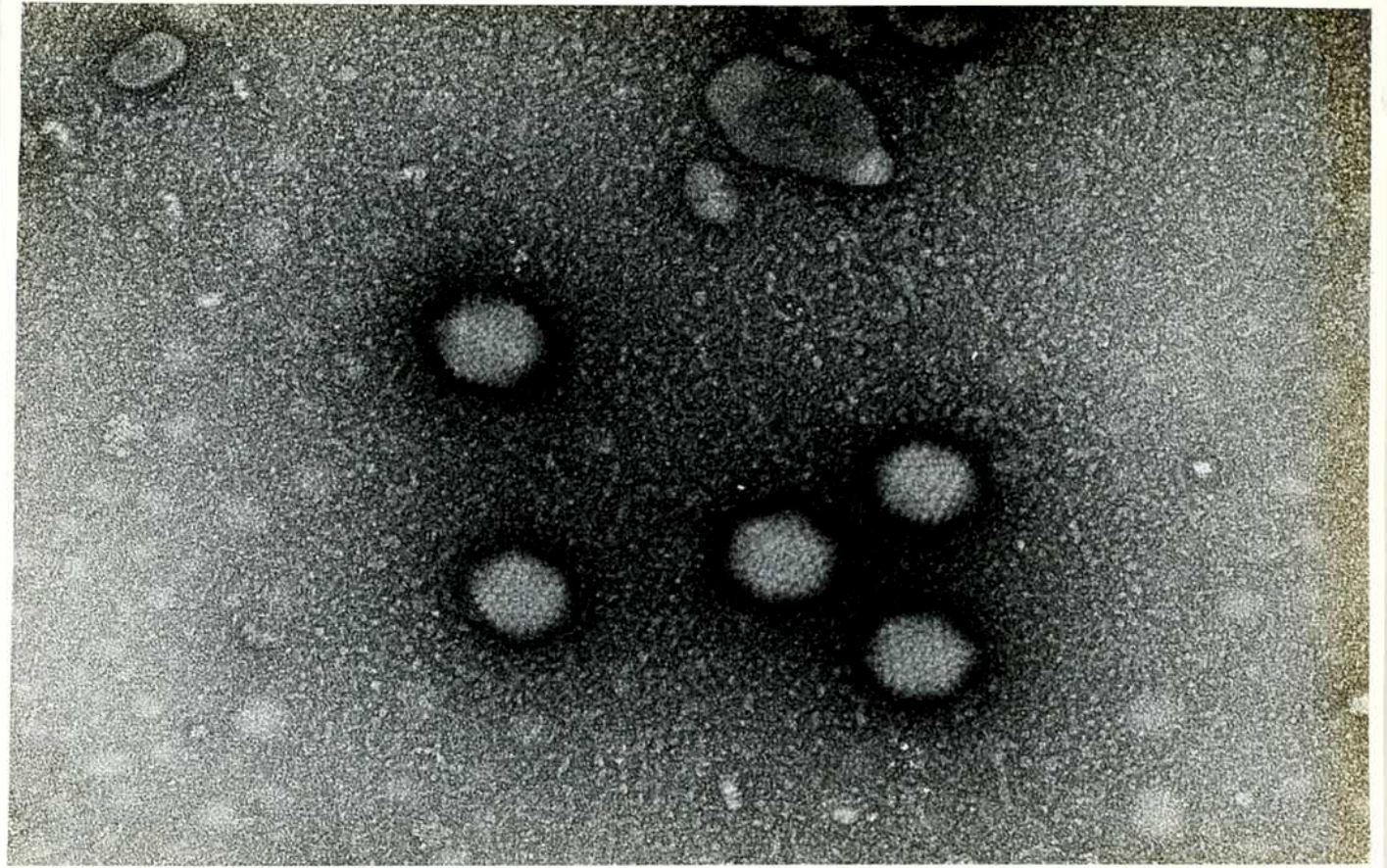


Foto 4: Partículas de Adenovirus observadas  
al Microscopio Electrónico (x 200.000).-

ROTAVIRUS	BACTERIAS	
	Positivos	Negativos
Positivos	10 (18%)	52 (29%)
Negativos	26 (14%)	86 (47%)

Tabla 6: Identificación de rotavirus y bacterias como únicos agentes o en asociación.-

Se observó que E.coli era la bacteria más frecuentemente asociada con rotavirus: 5 casos (2.7%); Shigella en 3 casos (1.6%), Salmonella y Proteus en 1 caso cada una (0.55%) mientras que, en cuanto a Klebsiela, no se observó asociación.-

Bacterias como único germen se observaron en 26 (14%) de los niños con gastroenteritis estudiados. De estos 26 niños con bacterias, a 17 (9.4%) se les aisló E.coli, a 3 (1.6%) se les aisló Shigella y en 4 casos (2.2%) se identificó Klebsiela.-

#### 4.2. TECNICAS DE IDENTIFICACION DE ROTAVIRUS

Tal como se planteó en la Introducción, la primera técnica de identificación de rotavirus que emplearon los virólogos fue ME. Sin embargo, se han buscado técnicas más sencillas y realizables en laboratorios de menores recursos. En este trabajo se utilizó la técnica de CIED, comparando su eficacia con la de ME en los 300 niños estudiados.-

La Foto 5 nos permite ver cómo se observan las bandas de precipitación en el gel de agarosa luego de ser sometidas a corrida electroforética y a tinción.-

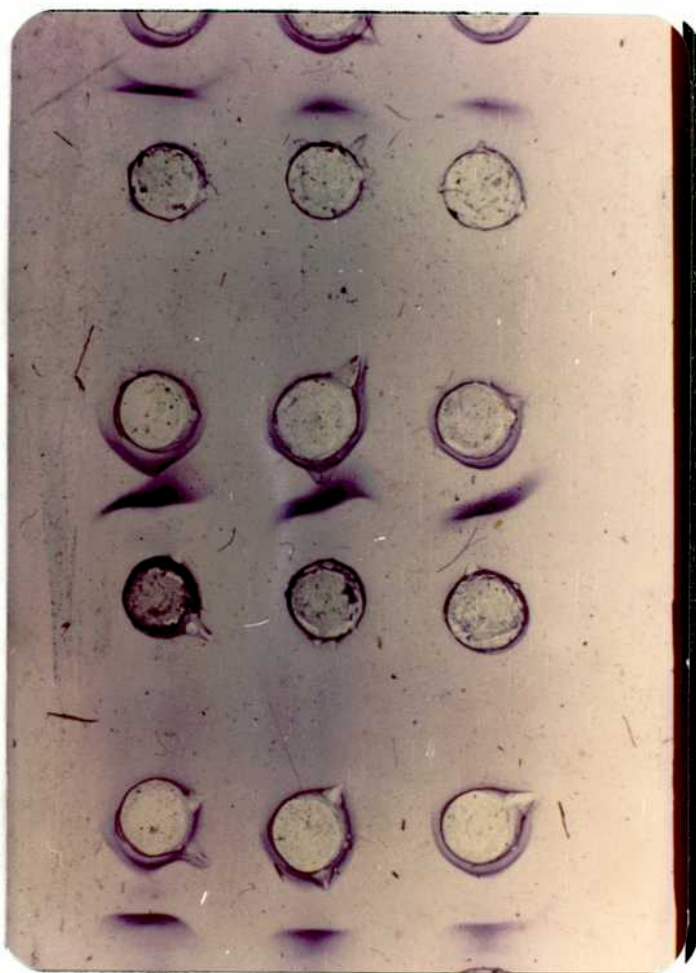


Foto 5: Bandas típicas de precipitación obtenidas luego de realizar una CIED de rotavirus.- La placa fue teñida especialmente con azul de Coomasie, tal como se describe en Materiales y Métodos.-



La Tabla 7a resume los hallazgos en el grupo de 180 niños con gastroenteritis pudiendo verse que, de los 62 casos identificados por CIED y/o ME indistintamente, 45 (72.5%) fueron identificados por ambos métodos mientras que, por CIED, únicamente 8 casos (12.9%) y por ME sólo 9 casos (14.5%).-

Del grupo de 120 niños control se identificaron 3 casos de rotavirus por ambos métodos y 1 caso por ME (Tabla 7b).-

ME	CIED	
	Positivo	Negativo
Positivo	45	9
Negativo	8	118

Tabla 7a: Resultados obtenidos por Contrainmunolectroforesis Discontinua (CIED) y por Microscopía Electrónica (ME) en 180 niños internados con gastroenteritis.-

ME	CIED	
	Positivo	Negativo
Positivo	2	1
Negativo	0	117

Tabla 7b: Resultados obtenidos por Contraimmunoelectroforesis Discontinua (CIED) y por Microscopía Electrónica (ME) en 120 niños sanos.-

#### 4.3. INCIDENCIA MENSUAL DE LAS INFECCIONES POR ROTAVIRUS

La Fig.4 nos muestra la incidencia mensual de rotavirus en niños internados con diarrea aguda.-

Se observa que hubo una marcada variación estacional. De esta manera, vemos que en los meses cálidos del año el porcentaje de identificación de rotavirus fue bajo, hecho que sobresalió en Diciembre de 1978, donde se obtuvo un 0% de identificación de este virus mientras que, en los otros meses de ese verano, el bajo porcentaje de aislamiento se mantuvo.-

En los meses fríos de ese mismo año se produjo un abrupto aumento de identificación del virus. En Julio de 1979 se observó un 80% de identificación de rotavirus y, en los otros meses de esa estación, se observó un aislamiento promedio del 53%.--

En Diciembre de 1979 se observó un porcentaje mayor de muestras con rotavirus en heces en comparación con el de Diciembre de 1978; sin embargo, el valor obtenido en la primera

entra dentro de los valores normales en comparación con aislamientos de Octubre de ese año y de Enero de 1980. Se ha observado extrañamente que, en contraposición a lo esperado, en los meses Noviembre de cada año el aislamiento de rotavirus sufre un brusco aumento.-

Para poder observar mejor la relación temperatura-rotavirus se han graficado estos dos parámetros juntos (Fig.5). Las temperaturas promedio se obtuvieron a partir del promedio mensual de los promedios de los valores diarios de temperatura máxima y mínima observados.-

Está claro que, en general, a temperaturas más bajas, el porcentaje de identificación de rotavirus es alto, mientras que disminuye en los meses de temperaturas más altas.-

Se ha graficado, además, la incidencia mensual de rotavirus y bacterias en niños con gastroenteritis aguda (Fig.6). Dicha Figura nos permite ver que el aislamiento de bacterias no sigue un patrón determinado, es muy fluctuante; sin embargo, en ninguna ocasión se obtuvo un aislamiento mayor del 40% y, de alguna manera, cuando el porcentaje de rotavirus disminuye, el de bacterias se ve aumentado y viceversa. Así, en Diciembre de 1978, se observó 0% de identificación de rotavirus y 40% de identificación de bacterias; en Julio de 1979 un 80% de niños presentaba rotavirus en sus heces mientras que sólo se aisló un 5% de bacterias y, en Enero de 1980, rotavirus se identificó en un 14% y bacterias en un 28%. -

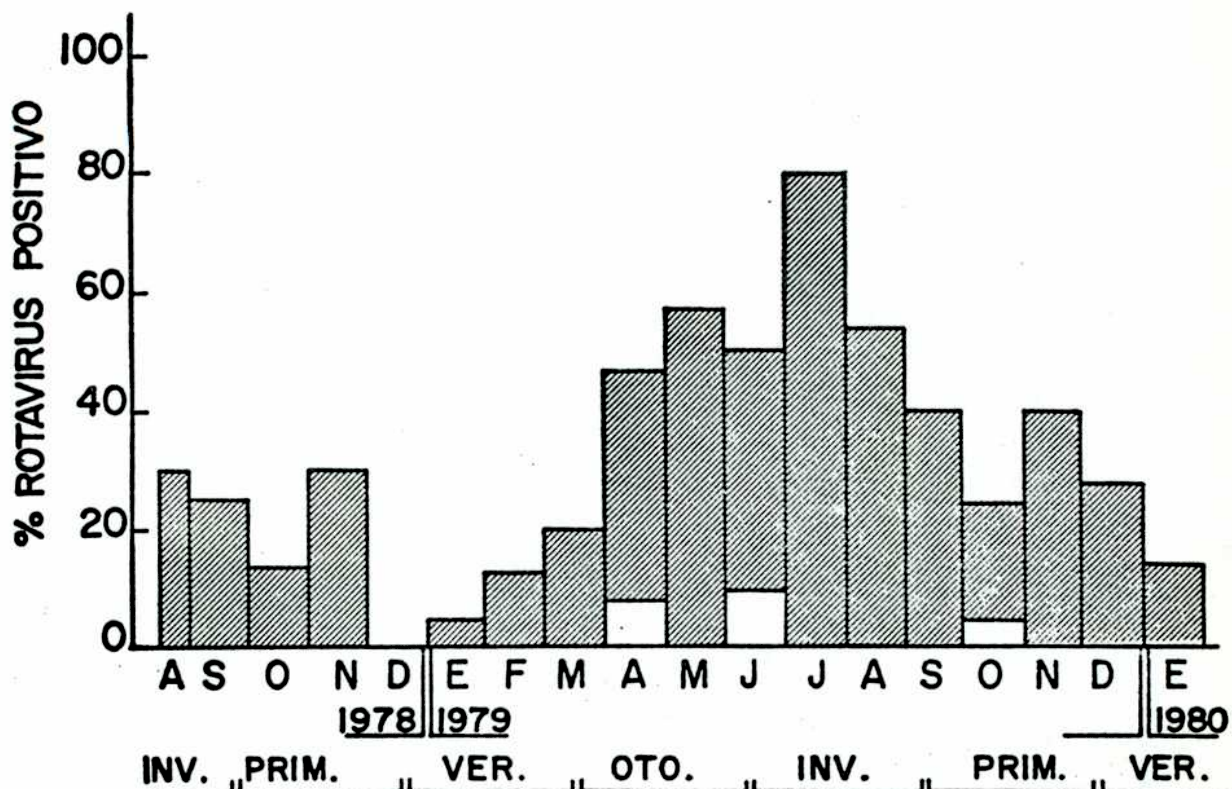


Figura 4: Distribución mensual de la incidencia de rotavirus en niños internados con gastroenteritis en la Unidad 8 del Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez" desde Agosto de 1978 hasta Enero de 1980. Las bandas en blanco representan la incidencia de rotavirus en niños sanos, con muestras obtenidas desde Enero hasta Diciembre de 1979.-

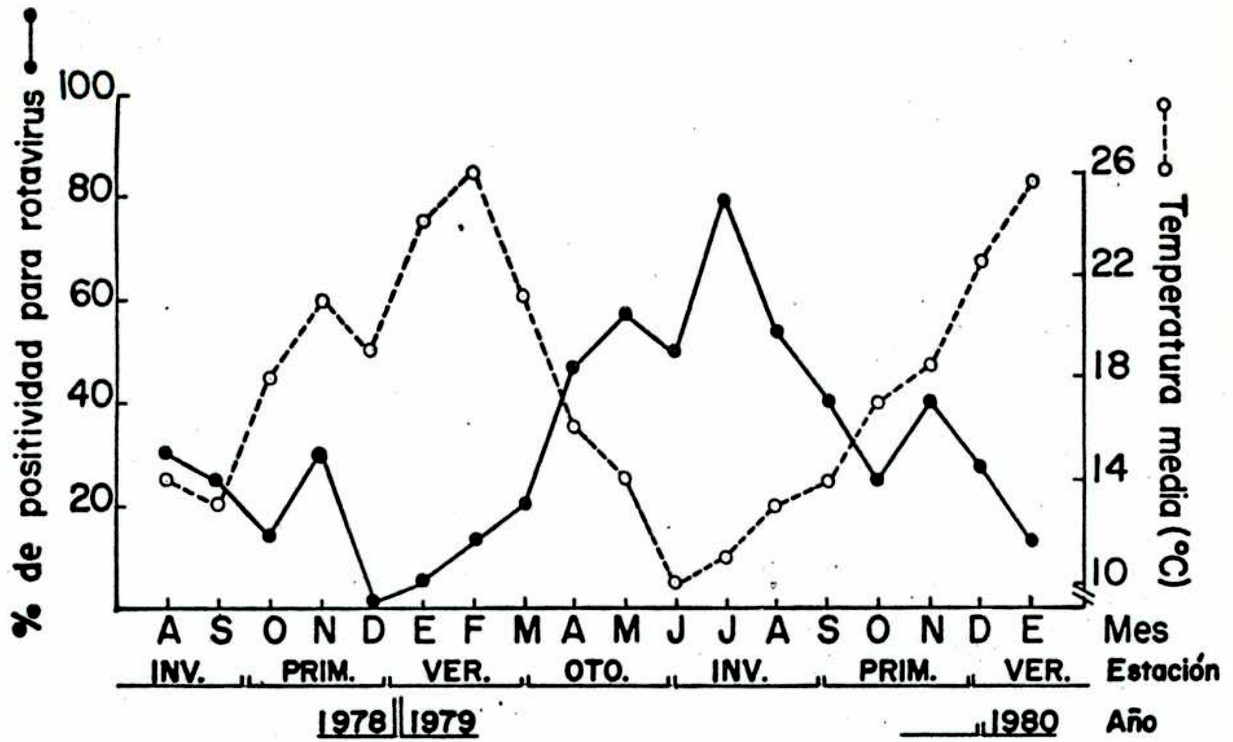


Figura 5: Influencia de la temperatura en la incidencia del aislamiento de rotavirus durante 18 meses (Agosto, 1978-Enero, 1980) en niños internados con gastroenteritis.-

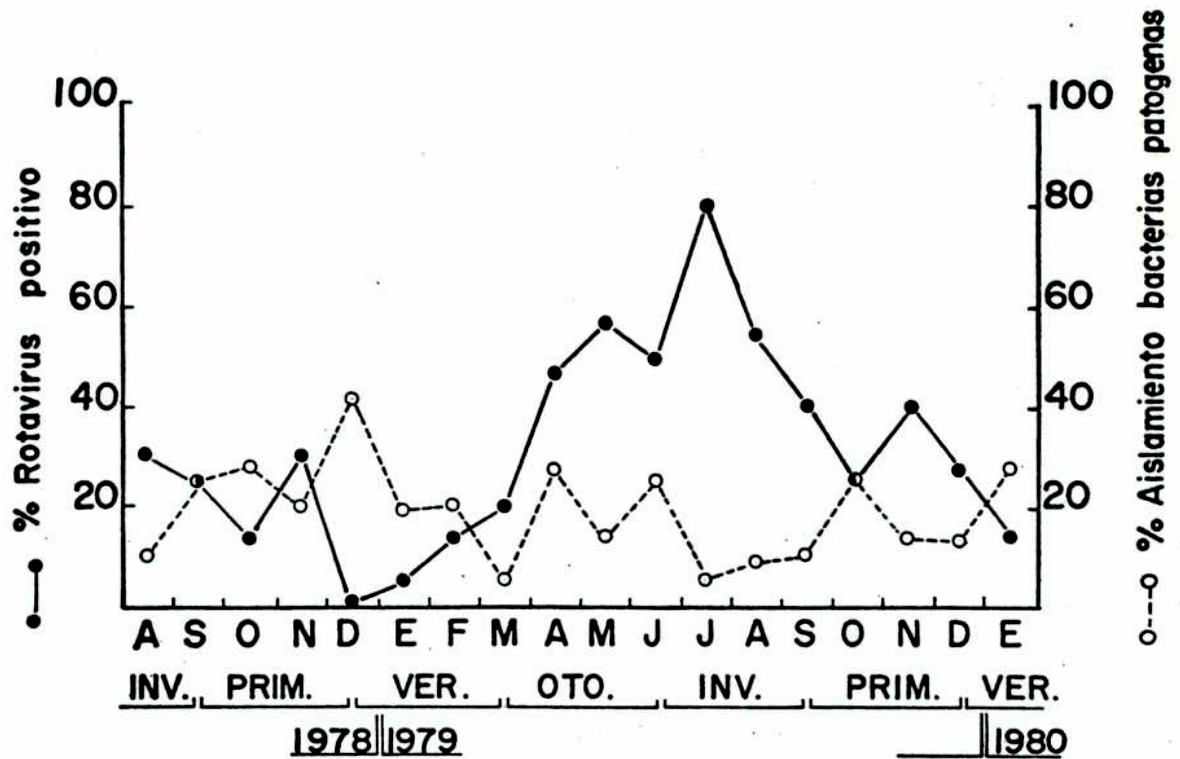


Figura 6: Porcentaje de identificación de rotavirus y bacterias patógenas en niños internados en la Unidad 8 del Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez", durante un período de 18 meses (Agosto, 1978-Enero, 1980).-

#### 4.4. INCIDENCIA DE ROTAVIRUS SEGUN LAS EDADES DE LOS PACIENTES

La Fig.7 nos muestra la frecuencia de rotavirus según la edad del paciente. Para este parámetro, hemos observado que los niños más comunmente infectados eran aquellos cuyas edades oscilaban entre 0 y 6 meses de vida, produciéndose luego una abrupta disminución de las internaciones de niños con gastroenteritis. Según se observa en la Fig.7. rotavirus fue hallado en las heces de un 33.6% de niños menores de 3 meses y sólo en un 3.8% de niños entre 3 y 5 años de edad. El paciente más joven que se encontró excretando rotavirus, tenía 20 días de vida. Se observó que, de los niños menores de 6 meses con gastroenteritis, el 81% no relataba ser alimentado por leche materna al momento de su internación.-

#### 4.5. HALLAZGOS SEROLOGICOS EN PACIENTES CON GASTROENTERITIS

Tal como se estableció anteriormente, para realizar estudios de anticuerpos antirotavirus en los pacientes se utilizó un antígeno de rotavirus bovino dado que éste presenta una reacción cruzada con el humano.-

En esta ocasión fue posible obtener muestras en los períodos agudo y convalesciente en 90 niños con gastroenteritis. Los hallazgos obtenidos en estos niños se encuentran graficados en la Tabla 8. El análisis de la prevalencia de anticuerpos Fijadores de Complemento anti NCDV nos mostró que el 96% (54 casos) de pacientes con rotavirus en sus heces revelaban evidencia serológica de infección, hallazgo que confirmaría lo detectado por ME y/o CIED. En 44 de estos pacientes (80%) se observó seroconversión entre los períodos agudo y convalesciente, en dos niños hubo un aumento de 4 diluciones en los títulos de ambas muestras de sangre mientras que,

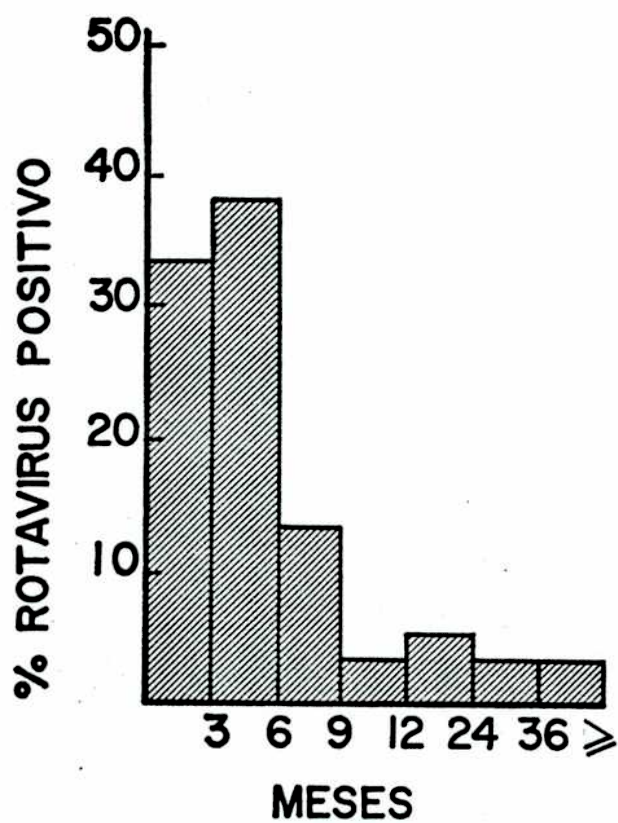


Figura 7: Frecuencia de rotavirus, según su edad, en niños internados con gastroenteritis.-



en 8 pacientes (14%), se pudo observar un título inicial en el período agudo que se mantuvo en la muestra tomada a la convalecencia. En dos niños con rotavirus en sus heces no se encontró respuesta inmunológica.-

De los 34 niños con gastroenteritis pero sin hallazgos de rotavirus en sus heces, 28 (82%) no tuvieron niveles de anticuerpos detectables por FC, pero en 3 ocasiones (9%) hubo seroconversión y en 3 niños (9%) se observó un título en el período agudo. En tres pacientes hubo niveles de anticuerpos antirotavirus detectables 3 días posteriores a la aparición de la enfermedad, y en los niños con anticuerpos en el período agudo sus títulos variaron entre 1:4 y 1:32.-

Por FC (con NCDV)	Rotavirus presente en heces	
	sí	no
Seroconversión	44	3
Conversión	2	0
Título en el período agudo	8	3
Negativo	2	28

Tabla 8: Comparación de los hallazgos en heces y la respuesta serológica (medida por FC con NCDV) en 90 pacientes internados con gastroenteritis.-

#### 4.6. SINTOMAS CLINICOS EN PACIENTES CON GASTROENTERITIS ASOCIADA A ROTAVIRUS

La Tabla 9 nos resume la información concerniente a los principales hallazgos clínicos observados en los pacientes con gastroenteritis.-

En dicha Tabla se observa que los pacientes infectados por rotavirus no tienen ninguna característica clínica que permita diferenciar diarreas producidas por este germen de aquellas de origen bacteriano; inclusive, con respecto a la deshidratación, podemos reiterar que no parece haber diferencias en relación con el patógeno presente, aunque el porcentaje tiende a ser más alto en los pacientes infectados con bacterias. En los pacientes con rotavirus no se observaron, en general, síntomas respiratorios asociados a él; en 73% de los niños no se observó la relación cuadros respiratorios-rotavirus. El 86% de los niños con rotavirus no padeció enteritis.-

	Identificación de			
	Rotavirus		Bacteria	
Total estudiados	52		26	
Síntomas observados	N°	%	N°	%
Diarrea	52	100	26	100
Fiebre	25	48	14	53
Vómitos	28	52	13	50
<u>Aspecto de heces</u>				
Líquidas	29	56	17	65
Grumosas	15	29	6	23
Mucosas	8	15	3	12
<u>Estado nutritivo</u>				
Eutrófico	34	65	15	58
Distrófico	18	35	11	42
<u>Estado hidratación</u>				
Normal	27	52	7	27
Deshidratado	25	48	19	73

Tabla 9: Sintomatología en pacientes internados con gastroenteritis por rotavirus o bacterias.-

La Fig.8a nos muestra el número de días anteriores y posteriores al ingreso en que se observó la diarrea. El gráfico implica que cada paciente tuvo diarrea, por lo menos, 1,2,3, etc. días anteriores o posteriores a la admisión, pero no necesariamente en días consecutivos.-

En el grupo de niños con rotavirus en sus heces la diarrea se observó hasta 6 días antes de su ingreso, pero la media de esta observación era de 2 días. En la mayoría de los casos la diarrea persistió, usualmente, de 2 a 3 días posteriores a la admisión, siendo la media de la duración total de la diarrea, de 3 a 5 días.-

En los niños con bacterias, la aparición de la diarrea seguiría un patrón de aparición igual que el de la viral; sin embargo, 8 días después de su internación ésta persiste en el 30% de los niños.-

Con respecto a vómitos en niños con gastroenteritis (Fig. 8b), en el grupo de niños con rotavirus la duración media fue de 2 días anteriores a su internación, luego de lo cual desaparecieron en su mayoría en un término no mayor de 3 días; para esta fecha, tan sólo un 5.7% de los niños presentaba vómitos.-

En el grupo con patógenos bacterianos los vómitos se observaron en un gran número de los niños 2 días antes de la internación, pero luego de ésta, la mayoría de los pacientes no manifestaba vómitos o los mismos desaparecían en 24 horas.-

#### 4.7. ANTICUERPOS-ANTIROTAVIRUS EN CALOSTRO HUMANO

Tal como se estableció en Materiales y Métodos, se empleó un semipurificado de heces como antígeno. Para buscar anticuerpos se trabajó en la CIED en condiciones iguales a aquellas empleadas para la búsqueda de antígeno, pero en todos los casos se trató de mejorar la visualización mediante la

tinción especial para fotografía.-

Los resultados de 30 pacientes nos mostraron que 17 (57%) de ellos presentaban anticuerpos en calostro.- ,

#### 4.8. ESTUDIOS EN CONTACTOS DE PACIENTES CON DIARREA PRODUCIDA POR ROTAVIRUS

A fin de aclarar el posible modo de transmisión de rotavirus, se estudiaron dos familias de las cuales, uno de sus niños, había padecido diarrea producida por rotavirus.-

La primera familia estaba integrada por seis contactos mientras que, la otra, por tres.-

Sus hallazgos se ven en las Tablas 10a y 10b.-

Relación con paciente de 2 meses	Rotavirus en heces	Serología con NCDV		Cuadro Clínico asociado a gastroenteritis
		1°muestra	2°muestra	
Padre	-	1:8	1:16	no
Madre	+	1:16	1:16	no
Abuelo Pat.	+	1:8	1:8	no
Abuela Pat.	+	NH*	NH	no
Abuelo Mat.	-	NH	NH	no
Abuela Mat.	-	1:4	1:4	no

Tabla 10a: Principales hallazgos virales y serológicos en una familia de 7 integrantes donde el niño padeció diarrea producida por rotavirus.-

\*NH: no hecho.-

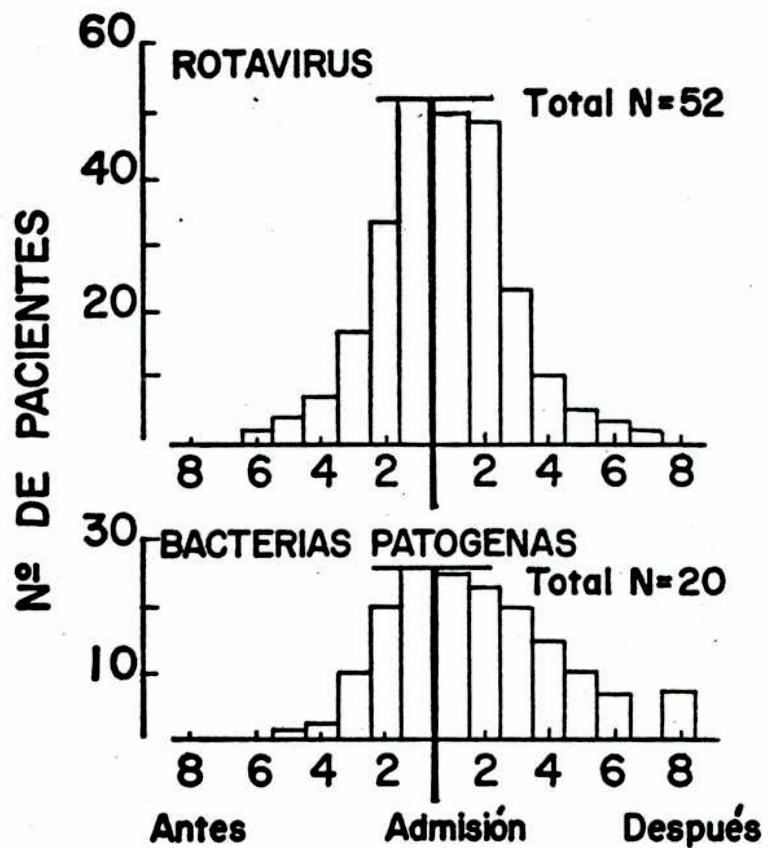


Figura 8a: Duración de la diarrea y número de pacientes antes y después de la internación por gastroenteritis.-

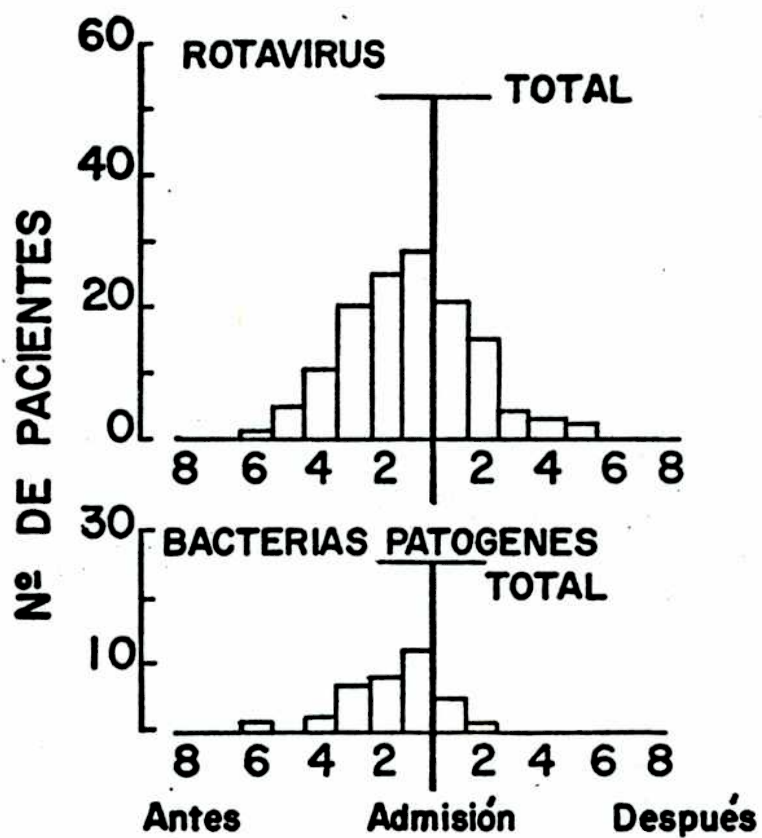


Figura 8b: Duración de los vómitos y número de pacientes antes y después de la internación por gastroenteritis.-

Relación con paciente de 3 meses	Rotavirus en heces	Serología con NCDV		Cuadro clínico aso- ciado a gastroente- ritis
		1°muestra	2°muestra	
Padre	+	1:8	1:8	no
Madre	-	1:8	1:8	no
Hermano de 4 meses	+	1:8	1:16	no

Tabla 10b: Principales hallazgos virales y serológicos en una familia de 4 integrantes donde uno de los niños padeció diarrea producida por rotavirus.-

Estas Tablas nos permiten observar que, en la mayoría de familiares de niños con gastroenteritis, fue posible identificar rotavirus en heces por CIED y/o ME: 3 en la familia constituida por 6 contactos (50%) y 2 en la que posee 2 contactos (75%). Casi todos los familiares de ambos grupos estudiados presentaron títulos previos, generalmente de 1:8. En ningún caso de los contactos con hallazgos de rotavirus en heces se observó sintomatología asociada.-

#### 4.9. MORFOLOGIA DE ROTAVIRUS

La observación al microscopio electrónico de preparaciones purificadas de rotavirus nos permitió ver partículas virales completas e incompletas (Foto 6). Las partículas virales completas presentaban un diámetro aproximado de 80 nm, y aquellas en las cuales la cápside externa se había perdido, presentaban un diámetro de 70 nm. En algunas de las partículas se evidenció la penetración del acetato de uranilo al interior del virión, indicando que éstas no poseían ácido nucleí-

///...



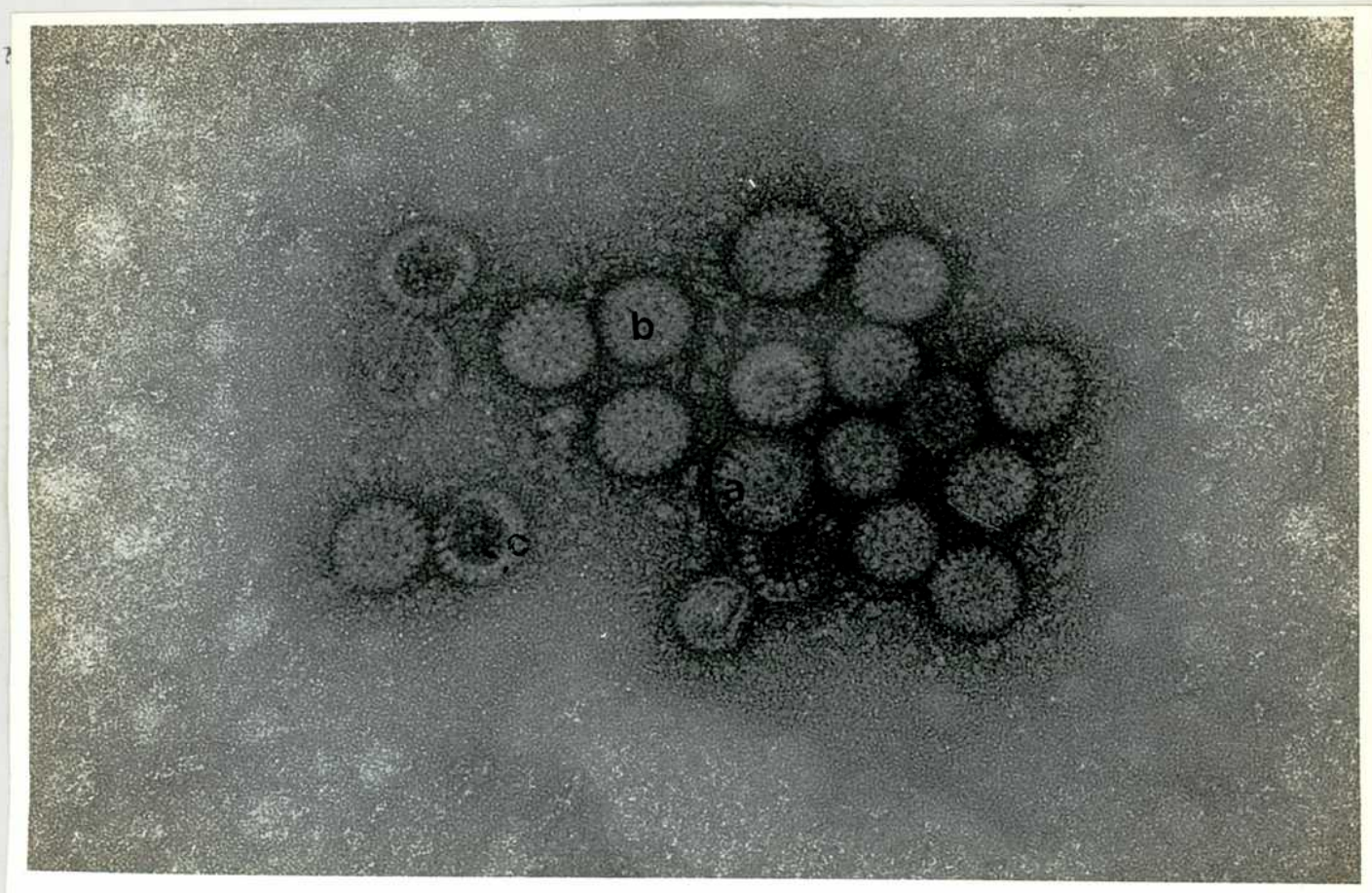


Foto 6: Fotografía de rotavirus al Microscopio Electrónico mostrando partículas virales: doble cápside (a), simple cápside (b), partículas vacías (c) (x 250.000).-



///...

co y constituyendo las llamadas partículas "vacías". En ellas se observó claramente el aspecto de rueda dentada que le dio el nombre a este grupo viral. En ocasiones fue posible observar estructuras tubulares aplanadas (Foto 7).-

#### 4.10. DENSIDAD DE FLOTACION OBTENIDA

Del gradiente isopícnico en ClCs hecho con rotavirus obtuvimos, en diversas ocasiones, dos bandas que se identifican claramente en el tubo de gradiente (Foto 8).-

Realizando lecturas a 260 nm, 280 nm y de densidad de todas las fracciones recogidas luego del gradiente, se vio que las bandas correspondían: una, a una densidad de flotación de 1.367 g/cm<sup>3</sup>, y la otra, a 1.378 g/cm<sup>3</sup> (Fig.9). El contenido de ambas se observó al microscopio electrónico: en la de bandeado a 1.367 se pudo ver, en su gran mayoría, partículas virales de doble cápside mientras que, en la de 1.378, simple cápside en su mayoría.-

#### 4.11. IODINACION DE ROTAVIRUS. DENSIDAD DE FLOTACION DE ROTAVIRUS

En este experimento se pudo ver que el rotavirus iodinado y colocado en gradiente de ClCs bandea a una densidad de flotación de 1.367 g/cm<sup>3</sup>, exactamente igual que el virus no iodinado, lo que permitiría iodinar virus en momentos en que se posee poco material para ser visualizado por O.D.(Fig.10).-

#### 4.12. ANALISIS DE LAS PROTEINAS DE ROTAVIRUS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Aquellas preparaciones de rotavirus que se observaron como purificadas (sin restos de membranas de células bacteria-

///...

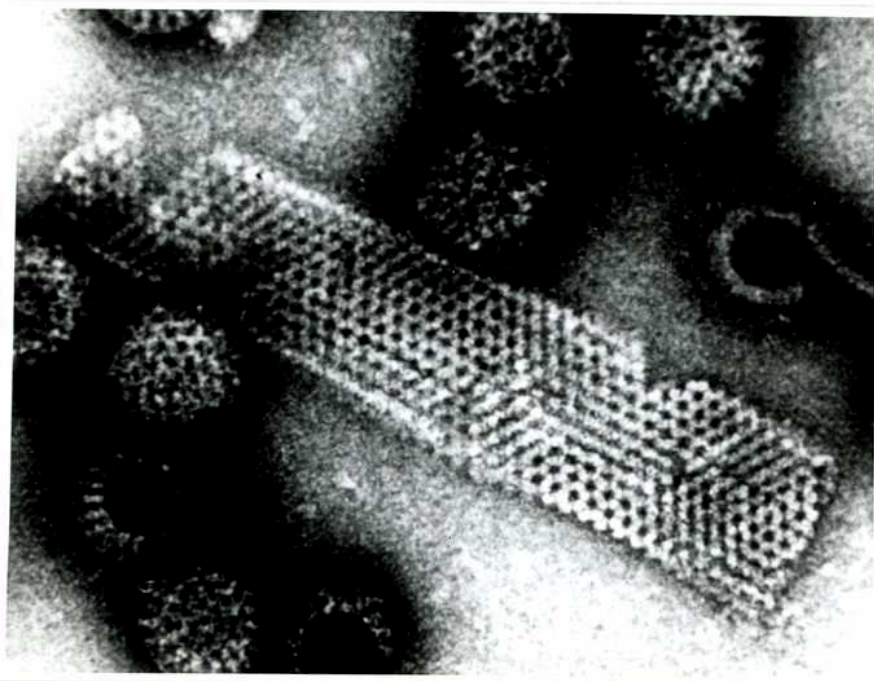


Foto 7: Estructuras tubulares aplanadas de rotavirus observadas al Microscopio Electrónico.-

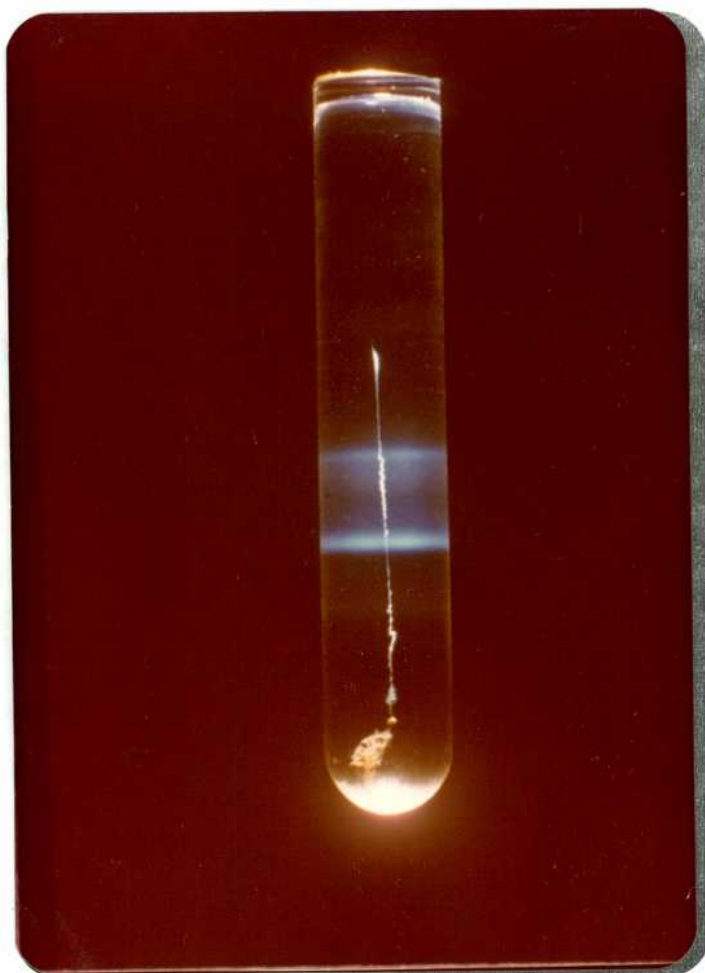


Foto 8: Bandas obtenidas en un tubo luego de realizar un gradiente de ClCs por ultracentrifugación durante 48 hs. a 100.000xg. La banda superior corresponde a partículas virales doble cápside (DC) y la inferior a partículas virales simple cápside (SC).-

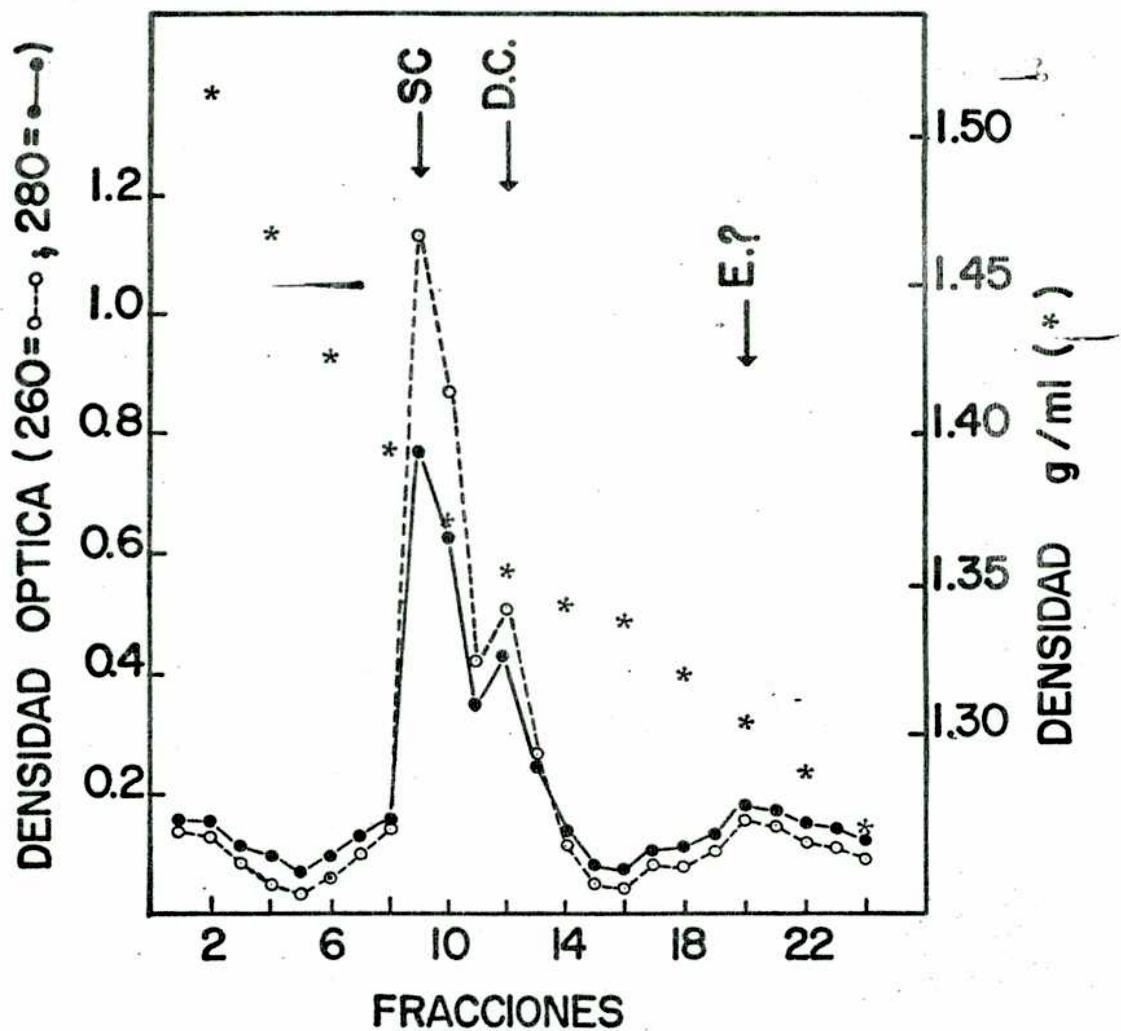


Figura 9: Centrifugación de rotavirus en gradiente isopícnico de ClCs (SC: simple cápside, DC: doble cápside). Muestra recogida por punción en parte inferior del tubo de Foto 8.-

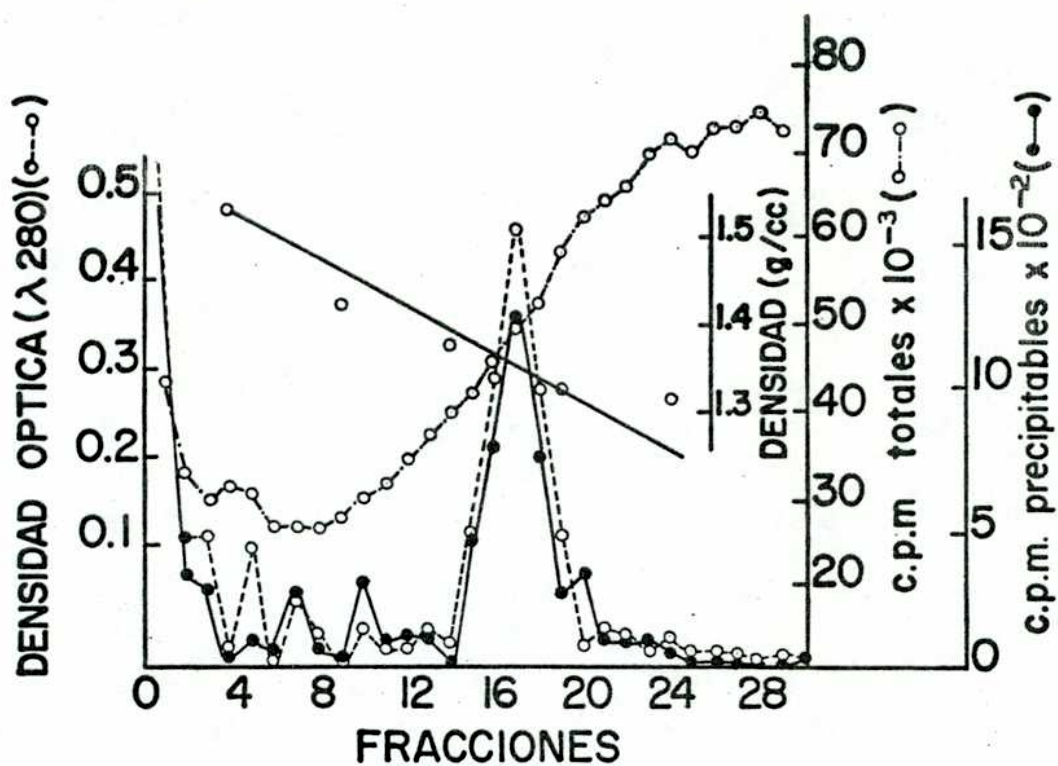


Figura 10: Centrifugación de rotavirus iodinado en gradiente isopícnico de ClCs.-

///...

nas, flagelo ni ningún otro tipo de contaminante) fueron seleccionadas para electroforesis en gel de poliacrilamida obteniéndose, en repetidas ocasiones, ocho bandas de polipéptidos (Foto 9) que, leídas al densitómetro, muestran ocho picos cuyos pesos moleculares oscilan entre 102.500 y 43.000.-

Graficamos y obtuvimos valores de una de las diversas preparaciones (Fig.11, Tabla 11).-

En Fig.11 Pico	Peso Area (mg)	% del total	Corresponde a polipéptido	Peso molecular del rotavirus
1	1.85	0.82		
1'	4.30	1.90	1	102.500
2	16.55	7.30		
2'	13.70	6.00	2	95.000
3	5.95	2.60	3	83.000
4	7.50	3.31	4	63.000
5	20.10	11.50	5	57.000
6	71.10	31.30		
6'	32.75	14.40	6	50.000
7	36.90	16.30	7	48.000
8	10.10	4.50	8	40.000

Tabla 11: Area, % y Peso Molecular estimado para los polipéptidos de rotavirus de un paciente internado con gastroenteritis.-

#### 4.13. ANALISIS DEL GENOMA DE ROTAVIRUS EN GELES DE AGAROSA

La técnica descrita en Materiales y Métodos para observar el patrón de corrida del genoma de rotavirus fue desarrollado y puesto a punto especialmente para este trabajo.

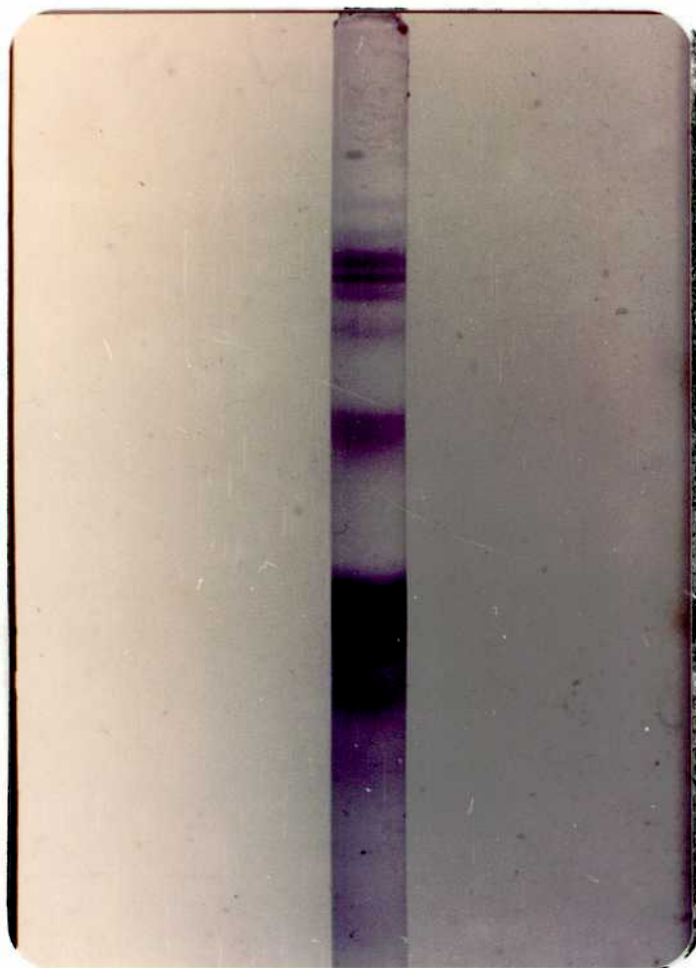


Foto 9: Gel de poliacrilamida para polipéptido de rotavirus. Muestra obtenida y procesada según se vio en Materiales y Métodos.-



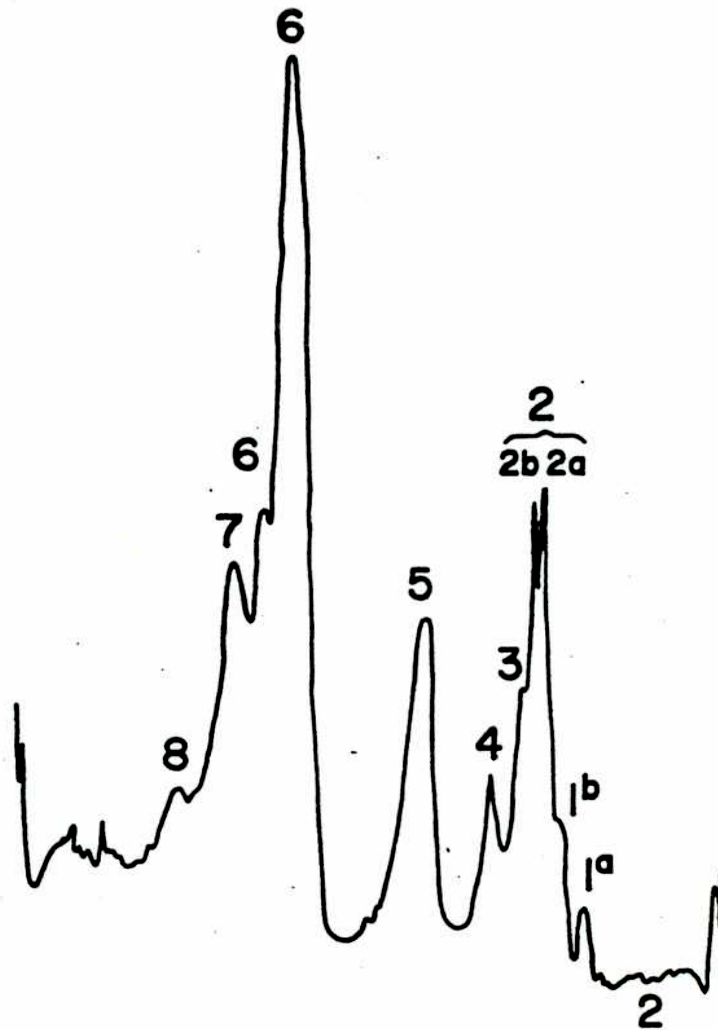


Figura 11: Trazado al densitómetro de polipéptidos de rotavirus en gel de poliacrilamida. Este caso se refiere a lo visto en Foto 9.-  
El trazado comienza con el tope del gel a la derecha.-



Las modificaciones permitieron realizar slabs horizontales que aún no han sido descriptos para este tipo de estudios.-

Analizando el genoma de rotavirus de 20 heces observamos que, en todos los casos, éste se separó en 9 bandas (Foto 10). Se visualizó un patrón de corrida de RNA predominante que se muestra en la Foto 10 en A,B,C,D,F,G,H,I. Este patrón de corrida electroforética de RNA de rotavirus predominante presentó similitud con los hallazgos de Espejo y col.(1977) mientras que existían diferencias con lo observado por Kalica y col. (1976) y por Schnagl y Holmes (1976). En nuestro caso, al igual que en el de Espejo y col., las bandas 2 y 3 se resolvieron en 2 bandas bien identificables, mientras que las componentes 7, 8 y 9 de Kalica y col.(1976), resueltas en 2 bandas, lo hicieron en una única banda (la N°7) en nuestro caso. La banda observada cerca del lugar de siembra fue considerada contaminante.-

Este patrón de corrida electroforética observado en la mayoría de las muestras, comparado con lo observado por Espejo y col.(1977), correspondería a su componente 2 l (2 large).-

Hemos dicho anteriormente que existió un patrón predominante; sin embargo, se observaron diferencias respecto de él. Estas diferencias se visualizan claramente en la Fig.10 en E: se presentaban la corrida electroforética de las bandas 3,4, 5 y 6, las que corren a mayor distancia con respecto al mismo número de banda de las otras muestras.-

Al analizar la bibliografía existente no se halló igual patrón de corrida electroforética. En base a esto, hemos denominado a este nuevo tipo de rotavirus hallado "JC" (derivado del nombre del paciente del cual fue aislado).-

En algunas ocasiones, las bandas 8 y 9 no fueron visibles. Estas bandas comprenden moléculas de RNA pequeñas y, por ende, requieren una alta concentración de RNA para ser visibles.

Nuestra "semipurificación" para realizar geles de agarosa no permite, en ciertas ocasiones, poseer gran cantidad de RNA y, por lo tanto, se acepta como válida la observación de las 7 bandas restantes para establecer la comparación del genoma de RNA de rotavirus de distintos pacientes.-

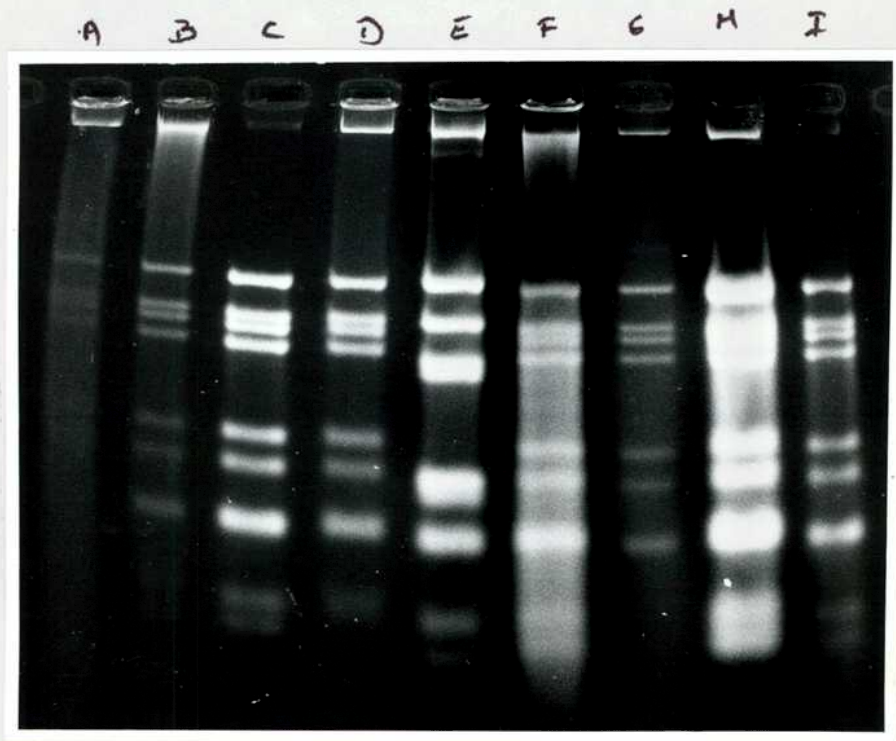


Foto 10: Slab horizontal de agarosa para RNA de rotavirus. Foto tomada luego de una corrida electroforética de 16 hs. y posterior tinción con Bromuro de Etidio y observación con U.V., short wave. (Foto tomada con rollo Kodak TXP 135).-

#### IV. DISCUSION Y COMENTARIOS

## 5) CONSIDERACIONES GENERALES

A través de este trabajo se ha visto que, durante 18 meses, rotavirus fue el germen más identificado (34%) en los niños internados con gastroenteritis en una sala del Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez", encontrándose rotavirus tan sólo en 3 niños controles (2.5%), mientras que bacterias se identificaron en el 20% de los niños internados.-

Estos hallazgos se han visto corroborados por el estudio serológico de 56 pacientes con rotavirus en sus heces, donde el 82% presentaba respuesta inmunológica y, el 14%, demostraba haber tenido, en algún momento, contacto con el virus.-

De los niños con gastroenteritis pero sin identificación de virus en heces, sólo 3 casos (8.7%) manifestaban, por serología, infección reciente, y otros 3, contacto previo (Tabla 8). Estos datos permitirían establecer que, para nuestra población, ROTAVIRUS ES, PROBABLEMENTE, EL AGENTE ETIOLOGICO MAS IMPORTANTE EN LA GASTROENTERITIS AGUDA.-

Este trabajo confirma, para nuestro país, los hallazgos hechos por otros investigadores en diversas regiones del mundo: Bishop y col.(1974) en Australia, Flewett y col.(1975) en E.U.A., Baldacci y col.(1979) en Brasil, Konno y col.(1977) en Japón, Schoub y col.(1979) en Sud Africa, De Torres y col.(1978) en Venezuela y Tufvesson y col.(1976) en Suecia, quienes reportan a los rotavirus como el agente etiológico más importante de la gastroenteritis aguda.-

Además, la alta concordancia entre los hallazgos serológicos y la detección de rotavirus por ME y/o CIED durante el desarrollo de esta investigación confirmaría el rol de los rotavirus en las gastroenteritis agudas. Esto ha sido claramente observado, tal como dijimos, en la Tabla 8 donde, de 56 casos con gastroenteritis producida por rotavirus, el 82% presentó evidencia serológica de infección reciente mientras que, de 34

niños con gastroenteritis debida a otras causas, sólo un 9% tuvo conversión serológica para NCDV. Este 9% de conversión serológica puede deberse a los lógicos errores de eficiencia de identificación por CIED y/o ME. Creemos que el 14 y el 9% de casos de diarrea por rotavirus u otro germen respectivamente, con títulos estables entre los períodos agudo y convalesciente pueden deberse, en el primer grupo, a una reinfección por rotavirus o bien a una toma retardada de la primera muestra de sangre mientras que, para el segundo grupo de niños, es más confiable suponer que, anteriormente, hubo gastroenteritis por rotavir.-

Kapikian y col.(1974), Flewet y col.(1974), Bryden y col.(1974) y otros han encontrado, también, coincidencias entre los resultados de detección de rotavirus en heces y respuesta serológica.-

Hemos visto que otros virus, como Adenovirus, que también ha sido asociado a la gastroenteritis por autores como Flewet y col.(1975) y Richmond y col.(1979), no parecen ser, entre nosotros, una causa importante de gastroenteritis: fue encontrado en un 2.2% de los niños con diarrea y en un 0.8% de los controles (Tabla 5). A pesar de estos hallazgos, no podemos excluir, aún, la contribución que este virus pueda tener como causa de enfermedad entérica; el papel real de estos virus merece ser investigado más detenidamente.-

Los otros virus, como Coronavirus o "Picovirus", fueron detectados, en nuestro estudio, en un porcentaje muy bajo, y en base a esto, parecería que estos grupos virales no tienen tanta importancia, al menos entre nosotros, como causa de gastroenteritis. Creo que su investigación debe continuarse a través de métodos más sensibles o por personas especializadas en el uso del microscopio electrónico que, con mayor criterio, pueden realizar buenas observaciones, en especial, de los vi-

///...

///...

rus pequeños.-

En el análisis de las gastroenteritis en nuestra ciudad debemos tener en cuenta el rol de las bacterias. En la Introducción establecimos que, trabajos llevados a cabo por Lubin, Girola y Grinstein (1961) y por López y col.(1975) entre otros, reportaron que, en nuestro medio, las bacterias eran identificadas en un bajo porcentaje en niños con gastroenteritis, oscilando entre un 20 y un 30%.-

En este estudio hemos hallado que, a semejanza de los antes publicados, a un 20% de niños internados con gastroenteritis les fueron aisladas bacterias patógenas en sus heces. Sin embargo, en 10 niños (18%) de los 180 estudiados, rotavirus estaba asociado a bacterias y, por ende, a priori no es posible establecer si ambos, conjuntamente, o alguno de ellos, aisladamente, es el agente causal de la gastroenteritis. Esta asociación llevó a replantear los porcentajes de aislamiento de germen productor de diarrea y, por ello, se estableció que el real porcentaje de identificación de bacterias patógenas como único agente causal de la gastroenteritis era de un 14% mientras que, el de rotavirus, correspondía a un 29% (Tabla 6).-

De 2 de estos 10 pacientes teníamos ambas muestras de sangre y, en 1 de ellos, encontramos seroconversión mientras que, el otro, no presentaba títulos.-

Estos hallazgos permiten plantear que, posiblemente, de haberse conocido el rol de los rotavirus en este tipo de infecciones al realizarse los trabajos antes mencionados, se habría encontrado asociación rotavirus-bacterias patógenas y, por ende, los porcentajes de aislamientos de bacterias como único germen habrían sido, al igual que ha sucedido en este trabajo, menores.-

De lo expuesto anteriormente ROTAVIRUS ha sido, de cualquier

manera, el germen más identificado como único agente (29%) mientras que, las bacterias, lo han sido sólo en un 14%. En el 47% de los niños con gastroenteritis no fue posible identificar germen (Tabla 6). Creo que esta alta cifra de no identificación de patógeno es realmente importante y podría deberse a las dificultades metodológicas para la detección de rotavirus. Es sabido que, para realizar una correcta visualización al microscopio electrónico, es necesaria una concentración mínima de virus de  $10^6$  partículas (ml.de heces)y, para la CIED, aunque en menor cantidad, también es necesario un mínimo indispensable por debajo del cual no se halla germen y, posiblemente, muchos niños al momento de toma de su muestra, deberían haber estado excretando menor cantidad de virus de la necesaria para realizar estos diagnósticos. Por otra parte, según vimos en la Fig.8a, algunas muestras fueron tomadas después de 4 días de evolución de la diarrea, lo que pudo determinar que no se demostrara un agente patógeno en ellas dado que se ha descrito que es posible identificar rotavirus en heces en un rango de 1 a 9 días posteriores a la aparición de la enfermedad (Rodríguez y col.,1977).-

Habría sido interesante poder determinar si, en controles sanos, existieron bacterias enteropatógenas pero, dadas las condiciones humanas y técnicas de este trabajo, esto no fue posible.-

#### 5.1. ACERCA DE LAS TECNICAS UTILIZADAS PARA DIAGNOSTICO DE ROTAVIRUS

Desde su descubrimiento, la Microscopía Electrónica ha sido, por excelencia, la técnica más utilizada para identificación de rotavirus. Sin embargo, presenta el inconveniente de no permitir su utilización en ciertos centros de investigaciones o en hospitales que no cuentan con respaldo económico

///...

ria, inadecuada y, generalmente, costosa.-

Para rotavirus, la CIED ha demostrado, en el presente trabajo, reunir excelentemente estas cualidades. Por otro lado, no podemos afirmar que los casos en los que se observó rotavirus sólo por ME son falsos negativos de la CIED, así como tampoco que los positivos sólo por CIED son falsos positivos como consecuencia de la concentración mínima necesaria para estos análisis y a la cual ya nos hemos referido; así es como se observó que, en 8 muestras positivas para rotavirus por ME, de haberse estimado la cantidad relativa de virus observado y haberse clasificado de 1+ a 5+, les habríamos acordado un valor de 1+, lo que explicaría por qué las 8 muestras son positivas por ME y negativas por CIED.-

## 5.2. INCIDENCIA MENSUAL Y FACTORES METEOROLOGICOS

La infección por rotavirus durante 18 meses (Agosto de 1978-Enero de 1980, ambos inclusive) ha permitido visualizar una evidente relación entre la identificación de rotavirus y las distintas épocas del año o temperaturas (Figs.4 y 5). Sin embargo, debe hacerse la salvedad de que este estudio corresponde a 18 meses, por lo tanto, no autoriza a establecer conclusiones definitivas, pero sí creo que es un lapso considerable que permite hacer inferencias válidas.-

Está claro que, según dijimos antes, existe una marcada variación estacional con aumento de aislamientos de rotavirus en los meses más fríos y una disminución en los meses cálidos, es decir que, en nuestra población, el nombre "gastroenteritis de invierno" dado a rotavirus está perfectamente atribuido.-

Esta variación estacional en la aparición de rotavirus se ve claramente (Fig.4) en: a) verano de 1978-1979 donde, en Diciembre, se obtuvo 0% de aislamiento junto con 5 y 13% en Ene-

///...



para su adquisición. Debido a esto, los virólogos han tratado de buscar un medio más adecuado, además de económico, que permita el diagnóstico de rutina de este virus.-

En la Introducción se mencionaron los métodos por los cuales se ha buscado identificar rotavirus (Tabla 2) y, de ellos, tal cual lo establecimos, quizás los más aceptados en la actualidad sean ELISA y CIED. ELISA es una técnica muy nueva aún y no estandarizada lo que, en una rutina, no permitiría resultados confiables. CIED ha sido una técnica empleada para diagnóstico de otras enfermedades tales como hepatitis, meningitis, etc.-

Para la identificación de rotavirus por CIED existen experiencias previas de Middleton y col.(1976) y de Tufvesson y col.(1976) que han reportado una concordancia entre sus resultados y los de ME de un 70 a un 90%.-

Durante el desarrollo de esta investigación, además del estudio epidemiológico, se trató de evaluar esta técnica como posible forma de diagnóstico de rutina en hospitales de nuestro medio ya que, ninguno de ellos posee medios materiales y humanos como para utilizar el Microscopio Electrónico.-

Los resultados obtenidos de los niños internados con gastroenteritis permiten observar que, en el 72.5% de ellos, se identificó rotavirus por ambos métodos, lo que demuestra que la CIED es un método sensible y que puede reemplazar a la ME. Además, en cualquier servicio hospitalario donde se recibe gran número de niños con cuadros diarreicos, es importante contar con técnicas rápidas, sensibles, de fácil implementación y, proporcionalmente, de bajos costos que brinden al médico la posibilidad de tener adecuados diagnósticos epidemiológicos, que le permitan adoptar una acertada actitud clínica que representaría un beneficio económico para el paciente y para la comunidad al evitar una medicación innecesaria-

///...

///...

ro y Febrero respectivamente; b) invierno de 1979 donde, en Julio, se aisló rotavirus en un 80% y, en Junio y Agosto, en un 50 y un 54% respectivamente; c) verano de 1979-1980 donde, en Enero, se observó un 14% de aislamiento.-

En Resultados hemos dicho que, en Noviembre de cada año, existe un extraño aumento de identificación de rotavirus que no sabemos a qué circunstancias atribuir; es necesario analizar un nuevo Noviembre para ver si este extraño hecho se repite; en esta estación del año podría haberse esperado observar, de acuerdo con los resultados obtenidos, entre un 10 y un 25% de identificación.-

Estos resultados obtenidos coinciden con los descriptos por otros investigadores, Kapikian y col.(1976), Konno y col.(1978), Birch y col.(1977), Middleton y col.(1977) y otros quienes, en diferentes países, han encontrado que los rotavirus se presentan con una alta incidencia -hasta del 90%- en los meses de invierno y con un 0 a un 10% en los de verano.-

He querido ver si, independientemente de la temperatura, otros factores climáticos, como humedad y precipitaciones, registraban alguna incidencia sobre el aumento o disminución de rotavirus. Estos valores están graficados en las Figs.12a y 12b. De los análisis de estos gráficos está claro que ninguno de ellos está asociado a la aparición de rotavirus. La humedad, en general, es elevada en la ciudad de Buenos Aires y, salvo raras excepciones, sus promedios mensuales nunca han sido menores del 50%. El promedio mensual de humedad fue obtenido de manera igual a la explicada en Resultados para la temperatura es decir, se realizó el promedio mensual, del promedio diario, de la humedad máxima y mínima (Fig.12a). Se ve claramente que la humedad, es más bien,

poco fluctuante y , por lo tanto, este factor es independiente de la aparición de rotavirus.-

Paralelamente, las precipitaciones (Fig.12b) parecen estar bastante disociadas de la incidencia de rotavirus; no es posible asociar una pluviometría baja con una incidencia importante de rotavirus. En consecuencia, el único factor meteorológico que realmente parece estar asociado a la frecuencia de incidencia de rotavirus es la temperatura (Fig.12c).-

En este capítulo hemos mencionado y analizado la incidencia de las bacterias en las gastroenteritis y hemos visto el bajo porcentaje de aislamientos durante el desarrollo de este trabajo y de otros.-

En la Fig.6 hemos comparado el aislamiento de bacterias con respecto al de rotavirus durante 18 meses y hemos dicho que, según lo observado, la identificación de bacterias no posee una frecuencia cíclica de aumento o disminución. En Diciembre de 1979, mes con incidencia de rotavirus de 0%, las bacterias patógenas fueron identificadas en un 41%; sin embargo, este hecho no se repitió en el verano siguiente, por lo tanto, y de acuerdo con la bibliografía hasta la actualidad, lo esperado habría sido un nuevo aumento en el porcentaje de aislamiento de bacterias; sería necesario un año más de este estudio para ver si el aislamiento de bacterias cumple no un rol cíclico con aumento en verano y disminución en invierno o que, simplemente, las bacterias se aíslan siempre en porcentaje aproximado y lo que en realidad ocurre es una disminución del porcentaje de rotavirus.-

No existe, en general, bibliografía que haya estudiado y comparado mensualmente la frecuencia de rotavirus y bacterias por más de 12 meses; generalmente, esta incidencia fue estudiada sólo por ese lapso.-

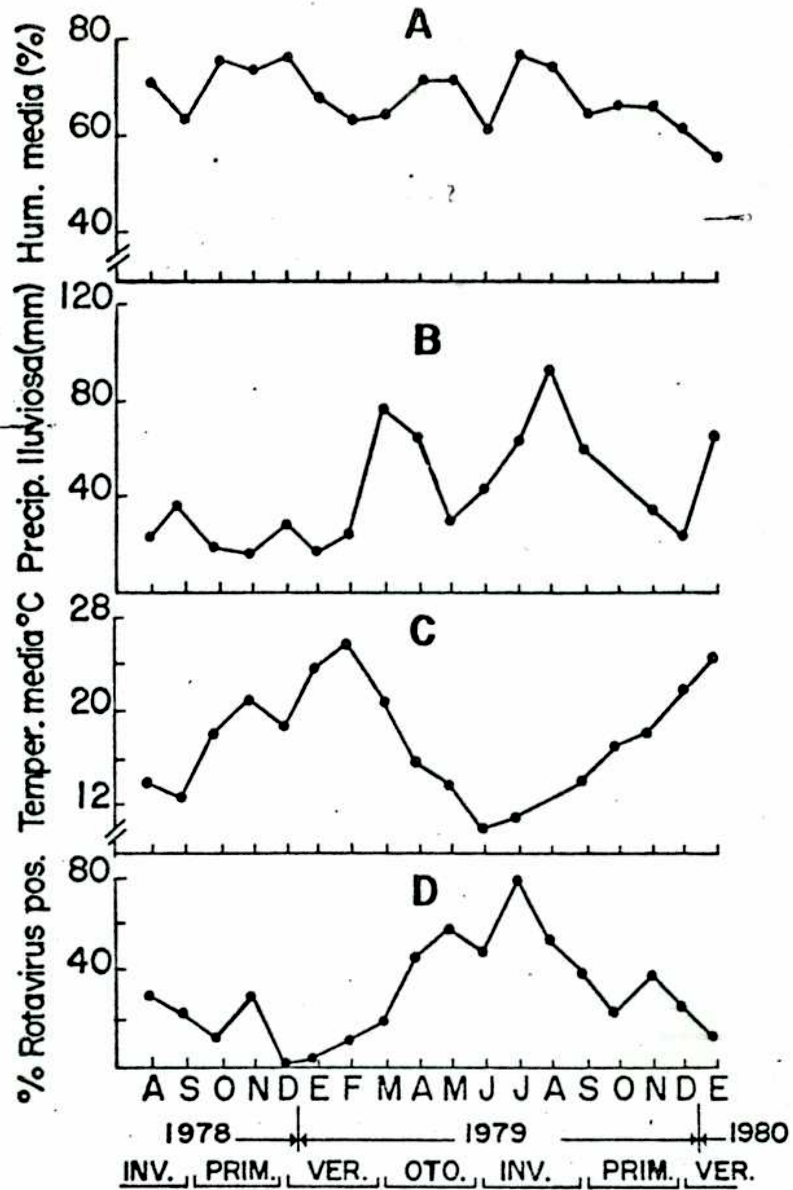


Figura 12: Relación entre humedad, precipitaciones, temperatura e incidencia de rotavirus en el lapso comprendido entre Agosto de 1978 y Enero de 1980.-.

- A- Humedad media mensual.-
- B- Precipitaciones.-
- C- Temperatura media mensual.-
- D- Incidencia mensual de rotavirus.-

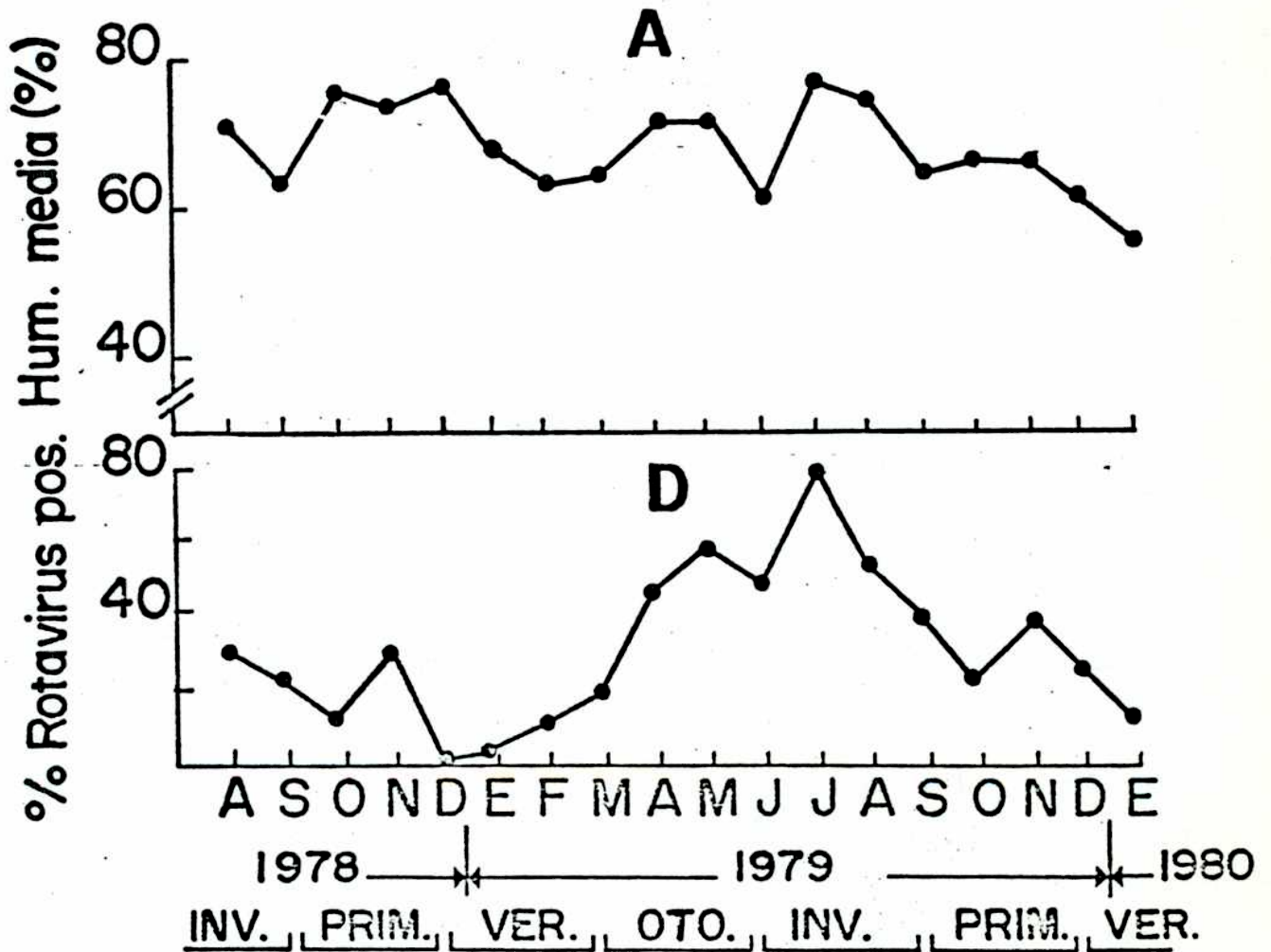


Figura 12 A Relación entre Humedad Media Mensual e incidencia de Rotavirus. De Figura 12



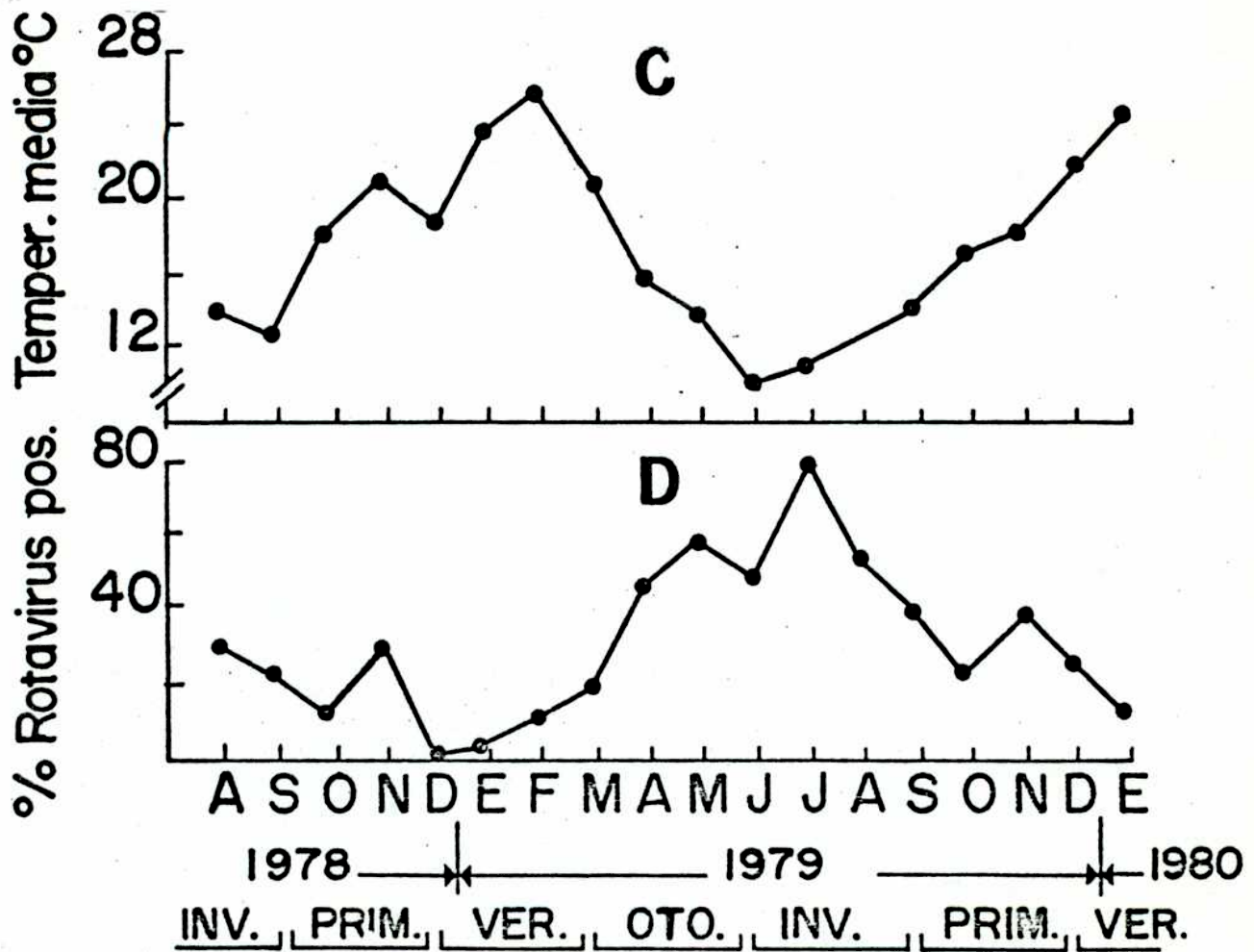


Figura 12 C Relación entre temperatura media y identificación de rotavirus en heces. Del Grafico 12

Todos estos datos refieren a un ciclo también en las bacterias, con un aumento en los meses de verano, donde disminuye la identificación de rotavirus, y una disminución de aislamientos en invierno, donde rotavirus se identifica hasta en un 90% (Cruickshank y col., 1976; Birch y col., 1977).-

### 5.3. ROTAVIRUS Y EDAD

Las edades han tenido un rol importante en este trabajo. Hemos visto (Fig.7) que los porcentajes de niños internados con gastroenteritis por rotavirus son mayores en aquellos niños menores de 6 meses de edad. Salvo raras excepciones (Baldacci y col., 1979), los investigadores han hallado que, en general, las infecciones ocurren en niños mayores de 6 meses; a partir de esto, los resultados de positividad, según la edad del niño, son variables. Así es que De Torres (1977) halla rotavirus en un 59% de niños de 13 a 24 meses; Davidson y col.(1975) reportan mayor frecuencia de rotavirus en niños del grupo de edad 6-12 meses(68%);Bryden y col.(1974) encuentran mayor positividad en el grupo de edad 2-3 años (62%). En nuestro caso, el 71% de niños con rotavirus era menor de 6 meses de edad. Por tal motivo, se analizó la historia de alimentación materna y se halló que, de los 37 niños con edades entre 0 y 6 meses, 30 (81%) no referían recibir leche materna al momento de la internación. En la Introducción hemos hablado detalladamente del rol de una buena alimentación materna para evitar infecciones. A pesar de no poseer una buena técnica de diagnóstico, nuestro análisis en calostro humano muestra que el 57% de ellos posee anticuerpos antirotavirus; de haberse empleado un antígeno para CIED o una técnica más sensible, es muy posible que estos hallazgos fueran superiores a los logrados. Yolken y col.(1978) y



Cukor y col.(1979) refieren hallazgos de 100% y 80% de anticuerpos antirotavirus en calostro, respectivamente. De esto podemos inferir que, de haber recibido adecuada alimentación materna, el porcentaje de niños menores de 6 meses internados con gastroenteritis habría sido menor, independientemente de las condiciones socio-económicas.

La relativa falta de contacto de estos niños con otros o, en general, con el resto de la población dada su edad, ha planteado repetidamente el modo de transmisión de este virus.-

A pesar de haberse considerado imposible, Meurman y Laine (1977) y Lycke y col.,(1978) describen gastroenteritis por rotavirus en adultos. A partir de esto, se cree que los adultos convivientes podrían ser factores importantes en la transmisión de rotavirus a niños (Kim y col., 1977; Hang y col., 1978).-

En este estudio encontramos que, analizando dos familias completas, ambas presentaban alguno de sus miembros con rotavirus en sus heces al momento de internación del paciente. En la primera, el 50% y en la segunda el 75% de los familiares presentaban virus. Sin embargo, al hacerse el estudio serológico, se vio que estos integrantes presentaban niveles de anticuerpos de infección previa y, además, ninguno de ellos manifestó sintomatología clínica asociada a gastroenteritis.-

De estos resultados está claro que hubo portadores asintomáticos en ambas familias y que ellos son, probablemente, los responsables de la infección en estos niños. La gastroenteritis asintomática o subclínica en los adultos puede deberse, tal como lo manifestaron los resultados serológicos, a una experiencia previa con el virus. Se observó que el 87% de los familiares manifestaban un contacto previo con el virus. Sin embargo, algunos de ellos fueron portadores, lo que indicaría que los anticuerpos en sangre no son suficientes para evitar

reinfecciones, al menos subclínicas, y que sería necesario un estímulo gastrointestinal para producción de IgA secretoria.-

#### 5.4. SINTOMATOLOGIA CLINICA

Además de la diarrea, los signos más frecuentemente reportados en niños con gastroenteritis por rotavirus han sido vómitos y fiebre y, a veces, los vómitos han iniciado el cuadro clínico.-

Nuestros resultados (Tabla 9) han mostrado que no hubo diferencias clínicas significativas que permitan diferenciar una diarrea bacteriana de una producida por rotavirus, llamándonos la atención sólo el hecho de que los niños con bacterias eran en su mayoría, deshidratados (73%) mientras que, en la infección por rotavirus, había una distribución normal entre niños normo-hidratados y niños deshidratados.-

Los vómitos y la diarrea son dos parámetros que han sufrido una diferencia entre ambos tipos de gastroenteritis; sin embargo, no es posible ser concluyente al respecto debido a que, una única experiencia, no es válida. Estos datos pueden ser tenidos en cuenta sólo para futuras observaciones o comparaciones.-

Hemos visto que la diarrea bacteriana ha sido, generalmente, de una evolución más larga (Fig.8a), no así su aparición que, tanto en la producida por rotavirus como en la producida por bacterias, es de aproximadamente 4 días anteriores a la internación.-

En cambio se ha visto que los vómitos (Fig.8b) preceden a la internación en ambos tipos de diarrea en igual tiempo; sin embargo, en las gastroenteritis bacterianas evolucionan favorablemente en 24 horas o menos mientras que, en las virales,

pueden demorar hasta 3 ó 4 días, aproximadamente, en desaparecer.-

Con respecto a la clínica de gastroenteritis por rotavirus, los resultados son escasos, contradictorios, y no todos toman iguales indicadores de la gastroenteritis (Baldaçci y col., 1979; Rodríguez y col., 1977; Delage y col., 1978). Considero que habría que esperar más tiempo y contar con más trabajos para poder obtener conclusiones al respecto.-

## 5.5. ESTUDIO FISICO-QUIMICO DE ROTAVIRUS HUMANO

### 5.5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Nuestras observaciones al Microscopio Electrónico de las partículas virales de rotavirus han permitido ver las estructuras de doble cápside, de simple cápside y las partículas vacías (Foto 6) e, inclusive, fue posible observar, en algunas preparaciones, que los viriones mostraron una tendencia a partirse por la mitad para formar "2 hemicápsides" (Foto 11).-

Las formaciones tubulares aplanadas observadas en nuestras preparaciones (Foto 7) muestran el arreglo de las unidades estructurales planteado por Esparza y Gil en 1978. Aproximándonos a esta formación tubular (Foto 12) se visualizan perfectamente las estructuras hexagonales.-

Hemos observado que las preparaciones en gradientes de ClCs cuya densidad era de 1.367 g/cm<sup>3</sup> correspondían, en su mayoría, a doble cápside, y esto es similar a los resultados obtenidos y reportados por Rodger y col. en 1975 y difieren de los de Kapikian y col. (1976), quienes encuentran mayor porcentaje de partículas completas a una densidad de 1.374 g/cm<sup>3</sup> en ClCs.-

En los gradientes de ClCs de densidad de 1.376 a 1.378

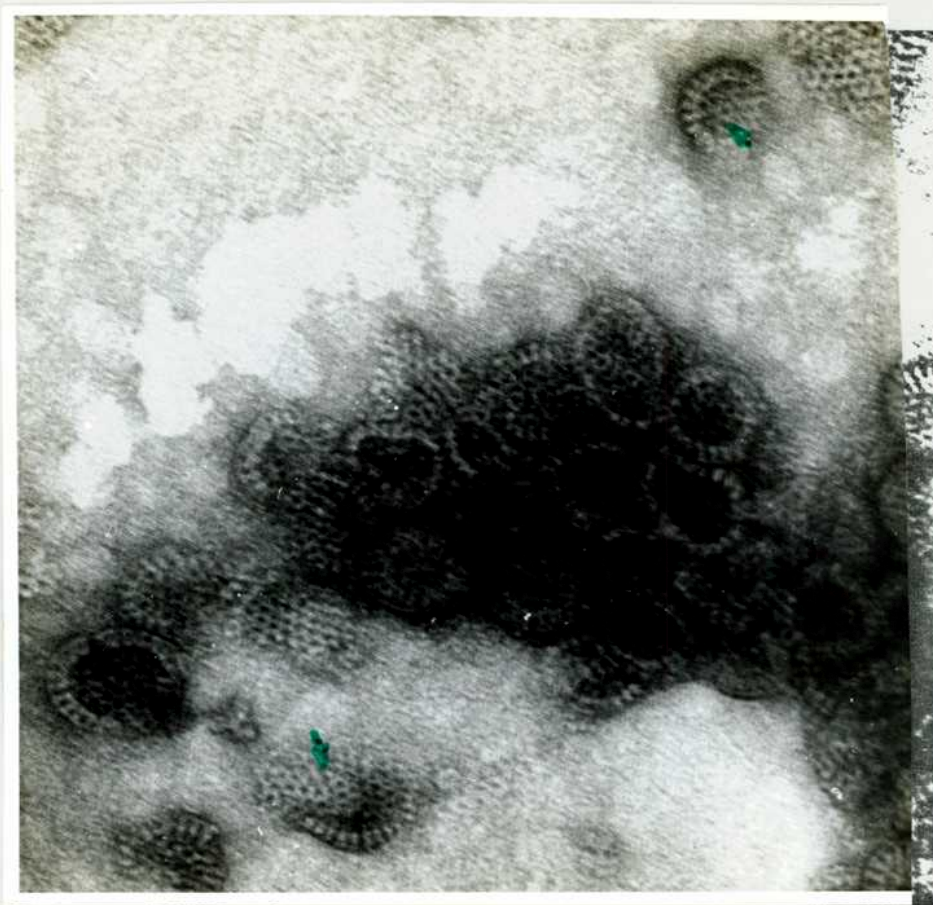


Foto 11: Viriones mostrando tendencia a partirse por la mitad y formar hemicápsides.-

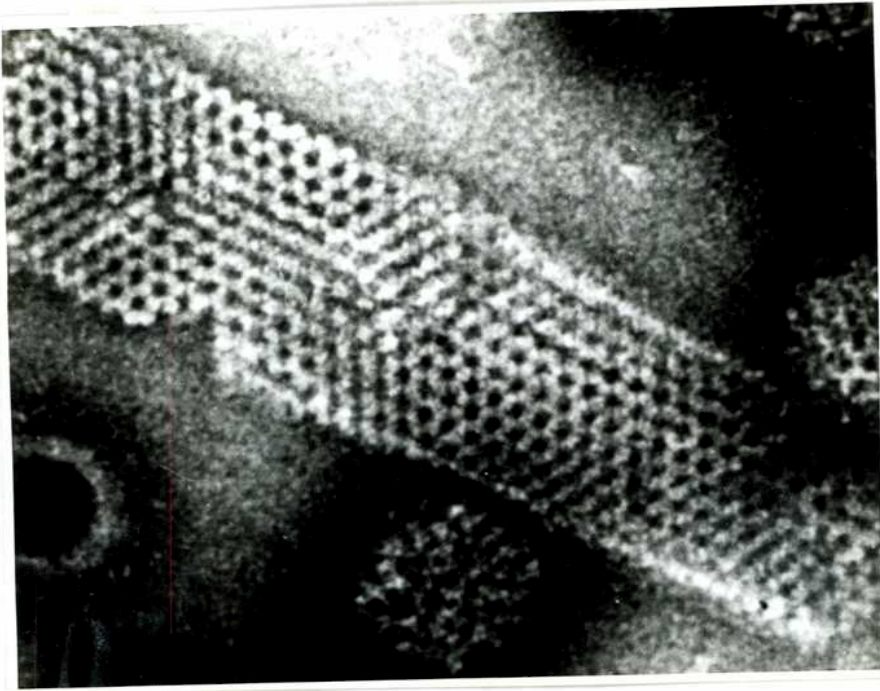


Foto 12: Aproximación de estructuras tubulares  
(Foto 7).-

g/cm<sup>3</sup> observamos un mayor número de partículas de simple cápside, lo que también coincide con lo reportado por Rodger y col. en 1975.-

Kapikian y col. (1975) consiguen el mayor número de partículas vacías en fracciones de gradientes de ClCs de densidad 1.286 g/cm<sup>3</sup>. Este experimento se repitió un número considerable de veces y, en base a ello, pienso que se puede considerar que la densidad de rotavirus de doble cápside y lleno es de 1.365-1.367 g/cm<sup>3</sup> y que las partículas de simple cápside tienen una densidad de 1.377-1.378 g/cm<sup>3</sup>.-

#### 5.5.2. ANALISIS DE LOS POLIPEPTIDOS

Para ejemplificar los resultados del análisis de polipéptidos de rotavirus obtenidos en este trabajo, tomamos un caso que, con pequeñas diferencias, se repitió en la mayoría de los otros estudiados.-

Rodger y col. (1975) y Rodger y col. (1977) reportaron la presencia de 8 bandas de polipéptidos con las proteínas más abundantes en 2 y en 5; además, observamos que diferían de las corridas electroforéticas de polipéptidos de rotavirus bovino, donde éste se separaba en 9 bandas.-

En nuestras preparaciones hemos observado similar número de bandas (Foto 9), pero diferencias en pesos moleculares y en porcentaje total con lo reportado por Rodger y col. (1975).-

En la Tabla 12 se comparan los valores estimados para los pesos moleculares según el presente trabajo (ver Tabla 11) con los postulados por Rodger y col. (1975).-

Polipéptido	Peso molecular de rotavirus estimado según:	
	Rodger y col.(1975)	Este tráb.
1	127.000	102.500
2	103.000	95.000
3	97.000	83.000
4	88.000	63.000
5	68.000	57.000
6	32.000	50.000
7	26.000	48.000
8	21.000	40.000

Tabla 12: Pesos moleculares de los polipéptidos de rotavirus humano estimados según Rodger y col.(1975) y este trabajo.-

En el presente trabajo, las proteínas más abundantes resultaron ser las que corresponden a las bandas 6 y 7.-

Recientemente, Matsuno y col.(1979), mediante el uso de marcación con amino ácido C<sup>14</sup>, glucosamina C<sup>14</sup> y autorodigrafía, logró resolver, en un excelente trabajo, los pesos moleculares de rotavirus bovino en 8 bandas, los que coinciden, en algunas características, con los de Rodger y col.(1975) en Tabla 3.-

Dadas las diferencias observadas, considero que los estimados por nosotros en este trabajo pueden haber sufrido errores de cálculo o de técnica; sin embargo, creo necesario repetir, en el futuro, estos experimentos a través de métodos más sensible y de mayor especificidad como lo es el marcaje de rotavirus completo y disociado marcado con I<sup>125</sup> y, si de esto no se observaran diferencias, para poder determinar más precisamente la composición polipeptídica total, serían otros factores los que se analizarían.-

La demostración en Resultados de que rotavirus puede ser iodinado sin que se produzca una destrucción del virus nos indica la factibilidad de lo propuesto.-

### 5.5.3. RNA EN ROTAVIRUS HUMANO

Hemos dicho que, en el curso de este trabajo, se desarrolló una técnica para electroforesis de RNA de rotavirus que es sencilla, sensible y de fácil implementación, y que ha permitido comparar simultáneamente hasta 12 heces purificadas y tratadas. Esta técnica ha demostrado poseer una excelente resolución en comparación con los trabajos de Schnagl y Holmes (1976), de Kalica y col.(1976) y de Espejo y col.(1977). El análisis y la comparación de las bandas obtenidas se han realizado detalladamente en el punto 4.13.-

Hemos observado diferencias en los patrones de corrida del genoma de rotavirus de distintos pacientes y los hechos aquí presentados han permitido establecer que, en nuestra población, existen, al menos, dos tipos de rotavirus: uno de ellos ha sido predominante y, analizando la bibliografía, el patrón de corrida electroforética de su RNA coincide con el componente 2 l (2 large) descrito por Espejo y col.(1977); en el otro, el patrón de corrida electroforética de su RNA no ha sido descrito hasta la actualidad por ningún investigador; este nuevo tipo de rotavirus hallado ha sido denominado "JC".-

20 casos analizados es un número escaso para establecer conclusiones, pero sí podemos inferir que, en nuestra población, existen, al menos, dos tipos de rotavirus, siendo uno de ellos predominante. Más estudios deberán llevarse a cabo para establecer conclusiones al respecto.-

Durante el desarrollo de esta investigación 2 niños fueron reinternados con gastroenteritis observándose que, ambas inter-

///...



///...

naciones, se debían a una reinfección por rotavirus y, desafortunadamente, el material, dado el momento en que estas reinfecciones ocurrieron, se perdió.-

## V. CONCLUSIONES

En el desarrollo de este trabajo de tesis ha quedado demostrado el importante rol que cumplen los rotavirus en las gastroenteritis agudas de nuestra población. Se ha visto, a través de los datos presentados que, en esta enfermedad, su incidencia es mayor que la de las bacterias. Se han presentado datos serológicos que apoyan firmemente esta afirmación.-

Hemos visto que los resultados obtenidos por la técnica de CIED son comparables a aquellos por ME y, por lo tanto, dado su bajo costo, esta técnica es perfectamente adaptable a trabajos de investigación y de diagnóstico.-

La infección por rotavirus, según se ha visto, presenta en nuestra población, al igual que en otras partes del mundo, una marcada variación estacional con aumento de identificación de rotavirus durante los meses fríos y disminución en los meses cálidos. Pero, en contraposición con la mayoría de los investigadores, nuestra población de mayor riesgo de infección por rotavirus son los niños menores de 6 meses, y ha quedado demostrado que esto se debe, fundamentalmente, a una mala alimentación en la que, la leche materna, ha sido totalmente excluida de la dieta.-

Al cabo de 18 meses de estudio no hemos podido ver ninguna sintomatología clínica que permita a un médico individualizar una diarrea viral por rotavirus de una bacteriana. No creemos, a pesar de las diferencias observadas, que la duración de diarrea y vómitos sean parámetros adecuados para determinar el tipo de infección.-

Hemos determinado los PM de los polipéptidos de algunos pacientes y hemos observado diferencias con lo ya publicado. Muy posiblemente, hemos cometido algún error en los cálculos y/o la metodología empleada. En el futuro deberán realizarse expe-

///...

///...

rimentos con técnicas más sensibles con el fin de verificar si nuestros datos son errores de metodología o, simplemente, diferencias no esperadas.-

Los patrones de RNA fueron claramente visualizados por un nuevo y simple método de electroforesis y se han visto diferencias en la corrida del RNA de rotavirus de las heces analizadas. En base a esto, creemos visualizar el predominio de un tipo de rotavirus en nuestra población, el 2 1 (2 large) según Espejo y col.(1977), y la presencia de otro tipo, no descrito aún por ningún investigador, y que hemos denominado "JC". Por lo tanto, podemos inferir, en nuestra población, la presencia de dos tipos de rotavirus.-

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Adler, J.L.; Zickl, R.  
Winter vomiting disease.  
J.Infect.Dis.119: 668-673, 1969.-
- Amano, Y.; Katagiri, S.; Ishida, N.; Watanabe, Y.  
Spontaneous degradation of reovirus capsid into subunits.  
J.Virol.8: 805-808, 1971.-
- Appleton, H.; Buckley, M.; Thun, B.T., y col.  
Virus-like particles in winter vomiting disease.  
Lancet 1: 405-411, 1977.-
- Baldacci, E.R.; Candeias, J.A.N.; Brevigheri, J.C.; Elerogrisi, S.J.  
Etiología viral e bacteriana de caso de gastroenterite infantil: una caracteriçao clínica.  
Rev.Saúde Publ.S.Paulo 13: 47-53, 1979.-
- Banfield, W.G.; Kasnick, G.; Blackwele, J.H.  
Further observations on the virus of epizootic diarrhea of infant mice. An electron microscopy study.  
Virology 36: 411-421, 1968.-
- Behbehani, A.N.; Wenner, H.A.  
Infantile diarrhea. A study of etiologic role of viruses.  
Am.J.Disease Child.111: 623-629, 1966.-
- Behbehani, A.N.; Shafa, F.; Mirakitani, F.K., y col.  
Viral enteric infections among diarrheal and non-diarrheal infants in Teheran.  
J.Trop.Med Hyg.72: 149-152, 1969.-
- Bhatia, V.N.  
Role of entero viruses in infantile diarrhea.  
Indian J.Med.Sci.24: 742-744, 1970.-
- Birch, C.J.; Lewis, F.A.; Kennet, M.L., y col.

A study of the prevalence of rotavirus infection in children with gastroenteritis admitted to an infectious disease Hospital.

J.Med.Virol.1: 69-77, 1977.-

- Bishop, R.F.; Davidson, G.P.; Holmes, I.H.; Ruck, B.J.  
Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis.  
Lancet 2: 1281-1283, 1973.-
- Bishop, R.F.; Davidson, G.P.; Holmes, I.H.; Ruck, B.J.  
Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis.  
Lancet 1: 149-151, 1974.-
- Blacklow, H. ; Dolin, R.; Fedoor, D.S.; Dupont, H.; Northrup, R.S.; Hornick, R.B.; Channock, R.M.  
Acute infectious non-bacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis.  
Ann.Int.Med.76: 993-1008, 1972.-
- Breitman, F.; O'Donnell, J.C.; Rubeglio, E.  
Estudios sobre microflora intestinal con diarrea persistente o cronificada.  
Rev.Hosp.Niños 67: 160-165, 1975.-
- Bryden, A.S.; Davies, H.A.; Hadley, R.E., y col.  
Rotavirus enteritis in the West Midlands during 1974.  
Lancet 2: 241-243, 1975.-
- Carlson, J.A.K.; Middleton, P.J.; Szymanski, M.T., y col.  
Fatal rotavirus gastroenteritis.  
Am.J.Dis.Child.132: 477-479, 1978.-
- Caul, E.O.; Paver, W.K.; Clarke, S.K.R.  
Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis.

- Lancet 1: 1192-1193, 1975.-
- Chrystie, I.L.; Totterdell, B.M.; Banatvala, J.E.  
Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn.  
Lancet 2: 1176-1178, 1978.-
  - Clarke, S.K.R.; Cook, G.T.; Egglestone, S.I., y col.  
A virus from epidemic vomiting disease.  
Brit.Med.J.3: 86-89, 1972.-
  - Cook, D.A.; Zbitnew, A; Dempster, G.; Gerard, J.V.  
Detection of antibody to rotavirus by counterimmunoelectrophoresis in human sera colostrum and milk.  
J.Pediat.93: 967-970, 1978.-
  - Cruickshank, J.G.; Zilberg, B.  
Winter diarrhea and rotavirus in Rhodesia.  
S.A.Med.J.50: 1895-1896, 1976.-
  - Cukor, G.; Blacklow, N.R.; Capozza, F.E., y col.  
Persistence of antibodies to rotavirus in human milk.  
J.Clin.Microbiol.9: 93-96, 1977.-
  - Davidson, G.P.; Bishop, R.F.; Townley, I.H., y col.  
Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children.  
Lancet 1: 242-246, 1975.-
  - Davidson, G.P.; Barnes, G.L.  
Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis.  
Acta Paediat.Scand.68: 181-186, 1979.-
  - Delage, G.; Mc Laughlin, B.; Berthiaume, L.  
A clinical study of rotavirus gastroenteritis.  
J.Paediat.83: 455-457, 1978.-



- De Torres, B.V., Comunicación Personal.  
Tesis Magister Scientiarum en Biología.  
I.V.I.C. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Julio 1977.-
- De Torres, B.V.; Mazzali de Ilja, R.; Esparza, J.  
Epidemiological aspects of rotavirus infections in hospitalized Venezuela children with gastroenteritis.  
Am.J.Trop.Med.Hyg.27: 567-572, 1978.-
- Dolin, R.N.; Blacklow, H.; Du Pont, R.F., y col.  
Transmission of acute infectious non-bacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates.  
J.Infect.Dis.123: 307-312, 1971.-
- Dolin, R.; Blacklow, H. ...; Du Pont, R.F., y col.  
Biological properties of Norwalk agent of acute infectious non-bacterial gastroenteritis.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.140: 578-583, 1978.-
- Du Pont, L.; Formal, S.; Hornick, R.; Snyder, M.; Libonati, J.; Seaham, D.; Kahes, J.  
Pathogenesis of E.coli diarrhea.  
N.Engl.J.of Med.285: 890, 1971.-
- Elías, M.M.  
Separation and infectivity of two particles types of human rotavirus.  
J.Gen.Virol.37: 191-194, 1977.-
- Esparza, J.; Gil, F.  
A study on the ultrastructure of human rotavirus.  
Virology 91: 141-150, 1978.-
- Espejo, R.T.; Calderón, E.; González, N.  
Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis.

- J.Clin.Microbiol.6: 502-506, 1977.-
- Flewett, T.H.; Bryden, A.S.; Davies, H.  
Virus particles in gastroenteritis.  
Lancet 2: 1497, 1973.-
  - Flewett, T.H.; Bryden, A.S.; Davies, H., y col.  
Relation between viruses from acute gastroenteritis of  
children and newborn calves.  
Lancet 2: 61-63, 1974 a.-
  - Flewett, T.H.; Bryden, A.S.; Davies, H.; Morris, C.A.  
Epidemic viral enteritis in a long stay children's ward.  
Lancet 1: 4-6, 1975.-
  - Flewett, T.H.  
Diagnosis of enteritis virus.  
Proc.Roy.Soc.Med.69: 693-696, 1976.-
  - Fukumi, H.; Hakaya, R.; Hatta, S., y col.  
An indication as to identify between the infectious diarrhea  
in Japan and the afebrile infectious non-bacterial gastro-  
enteritis by human volunteer experiments.  
Jpn.J.Med.Sci.Biol.10: 1-17, 1957.-
  - Goldblum, R.M.; Attlsted, S.; Carlson, B., y col.  
Antibody forming cells in human colostrum.  
Nature 257: 797-799, 1975.-
  - Gómez Barreto, J.; Palmer, E.; Nahmias, A.J., y col.  
Acute enteritis associated with reovirus-like agents.  
JAMA 235: 1857-1860, 1976.-
  - Gordon, I.; Ingraham, H.S.; Korns, R.F.  
Transmission of epidemic gastroenteritis to human  
volunteers by oral administration of fecal filtrate.  
J.Exp.Med.86: 409-422, 1947.-

- Grunwith, M.J.; Williams, T.  
Gastroenteritis in children: a two year report in Manitoba-  
I- Etiology.  
J.Infect.Dis.136: 239-247, 1977.-
- Gust, I.; Pringle, R.C.; Barnes, G.L., y col.  
Complement Fixing antibody response to rotavirus infection.  
J.Clin.Microbiol.5: 125-130, 1977.-
- Gutman, L.T.; Otlesen, E.A.  
An interfamilial outbreak of Yersinia enterocolitica  
enteritis.  
N.Engl.J.of Med.288: 1372, 1973.-
- Haug, K.W.; Onstavik, I.; Kuelstad, G.  
Rotavirus in families.  
Scand.J.Infect.Dis.10: 265-269, 1978.-
- Holmes, I.H.; Ruck, B.J.; Bishop, R.F.; Davidson, G.P.  
Infantile enteric viruses: morphogenesis and morphology.  
J.Virol.16: 937-943, 1975.-
- Holmes, I.H., Comunicación Personal.  
I.V.I.C. Instituto Venezolano de Investigaciones Científi-  
cas. Caracas, Venezuela, 1978.-
- Hruska, J.F.; Natter, M.F.D.; Menegus, M.A.; Steinhoff, M.  
C.  
RNA polymerase associated with human rotaviruses in diarrhea  
stools.  
J.Virol.26: 544-546, 1978.-
- Inglis, G.C.; Sommerville, R.G.; McClelland, D.B.L.  
Antirotavirus antibody in human colostrum.  
Lancet 1: 559-560, 1978.-
- Jordan, W.S.; Gordon, I.; Darance, W.R.

- A study of illness in a group Cleveland families. VII. Transmission of acute non-bacterial gastroenteritis to volunteers: evidence for two different transmissible agents. *J.Exp.Med.*98: 461-475, 1953.-
- Kalica, A.R.; Garon, C.F.; Wyatt, R.G., y col.  
Differentiation of human and calf reovirus-like agents associated with diarrhea using polyacrilamide gel electrophoresis of RNA.  
*Virology* 74: 86-92, 1976.-
  - Kalica, A.R.; Purcel, L.H.; Sereno, M.M., y col.  
A microtiter solid phase radioimmunoassay for detection of the human reovirus-like agent in stools.  
*J.Immunol.*118: 1275-1279, 1977.-
  - Kapikian, A.Z.; Gerin, J.L.; Wyatt, R.G., y col.  
Density in ClCs of the 27 nm "8 FII" a particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis: determination by ultracentrifugation and immune electron microscopy.  
*Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*142: 874-877, 1972.-
  - Kapikian, A.Z.; Wyatt, R.G.; Dolin, R., y col.  
Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis.  
*J.Virol.*10: 1075-1081, 1972.-
  - Kapikian, A.Z.; Kim, H.W.; Wyatt, R.G., y col.  
Reovirus-like agent in stools: Association with infantile diarrhea and development of serological tests.  
*Science* 185: 1049-1053, 1974.-
  - Kapikian, A.Z.; Cline, W.L.; Mebus, C.A., y col.  
New Complement Fixation Test for the human reovirus-like

- agent in infantile gastroenteritis.  
Lancet 1: 1056-1061, 1975.-
- Kim, H.W.; Brandt, C.D.; Kapikian, A.Z., y col.  
Human reovirus-like agent infection. Occurrence in adults' contacts of pediatrics patient with gastroenteritis.  
JAMA 238: 404-407, 1977.-
  - Kojima, S.; Fukumi, H.; Kusama, H., y col.  
Studies on the causative agent of infectious diarrhea; records of the experiments on human volunteers.  
Jpn.Med.J.1: 467-476, 1948.-
  - Konno, T.; Suzuki, H.; Imai, A.; Ishida, N.  
Reovirus-like agent in acute epidemic gastroenteritis in Japanese infants. Fecal shedding and serologic response.  
J.Infect.Dis.135: 259-266, 1977.-
  - Konno, T.; Suzuki, H.; Imai, A., y col.  
A long term survey of rotavirus infection in Japanese children with acute gastroenteritis.  
J.Infect.Dis.138: 569-576, 1978.-
  - Kurogi, H.; Inaba, Y.; Takohushi, E., y col.  
Cytopathic effect of Nebraska cell-diarrhea virus (Lincoln strain) on secondary bovine kidney cell monolayer.  
Nat.Inst.Anim.Hlt.Quart.16: 133-134, 1976.-
  - Laemmli, U.K.  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage.  
Nature (London) 227: 680-685, 1970.-
  - Larsen, S.A.; Homer, D.R.  
Relation of breast versus bottle feeding to hospitalization for gastroenteritis in a middle class U.S.population.  
J.Ped.92: 417-418, 1978.-

- Light, J.S.; Hodes, H.L.  
Studies on epidemic diarrhea of the newborn: Isolation of filtrable agent causing diarrhea in calves.  
Am.J.Pub.Hlth.33: 1451-1454, 1943.-
- Loening, U.E.  
The determination of the molecular weight of Ribonucleic Acid. Polyacrilamide gel electrophoresis.  
Biochem.J.113: 131-139, 1969.-
- Lombardi, G.H.; Roseto, A.M.; Stamboulían, D.; Barrera Oro, J.G.  
Virus of infantile gastroenteritis in Argentina.  
Lancet 2: 1131, 1975.-
- López, E.; Sarasqueta, P.; Kremenchuzky, L.; Rivarola, A.; Aguilar, D.; Mendilaharzu, F.  
Enteritis aguda (enterocolitis) en lactantes.  
Rev.Hosp.Niños 68: 206-214, 1975.-
- Lubin, A.H.; Girola, R.A.; Grinstein, S.  
Prevalence of the enteropathogenic bacteria isolated from infants with diarrhea in Buenos Aires.  
Am.J.Trop.Med.Hyg.12: 771-774, 1963.-
- Lycke, E.; Blonberg, J.; Berg, G., y col.  
Epidemic acute diarrhea in adults associated with infantile gastroenteritis virus.  
Lancet 2: 1056-1057, 1978.-
- Mathan, M.; Mathan, V.T.; Suraminathan, S.D., y col.  
Pleomorphic-like particles in human faeces.  
Lancet 1: 1068-1069, 1975.-
- Mathan, M.; Almeida, J.; Cole, J.  
An antigenic subunit present in rotavirus-infected faeces.

- J.Gen.Virol.34: 325-329, 1977.-
- Matsuno, S.; Mukoyama, A.  
Polypeptides of Bovine rotavirus.  
J.Gen.Virol.43: 309-316, 1979.-
  - Marchalonis, J.S.  
An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins.  
Biochem.J.113: 229-232, 1969.-
  - McLean, D.M.; Wong, K.S.K.; Bergman, S.K.A.  
Virions associated with acute gastroenteritis in Vancouver, 1976.  
C.M.A.J.117: 1035-1036, 1977.-
  - Mebus, C.A.; Underdahl, N.R.; Rhodes, M.B.; Twiehaus, M.J.  
Calf diarrhea (Scours) reproduced with a virus from field outbreak.  
The Agric.Exp.Stat.Res.Bull.N°233, 1969, Lincoln, Nebraska College of Agriculture, University of Nebraska.-
  - Mebus, C.A.; Stair, E.L.; Underdahl, N.R.; Twiehaus, M.J.  
Pathology of neonatal calf-diarrhea virus induced by a reo-like virus.  
Vet.Path.8: 490-505, 1971.-
  - Mebus, C.A.; Wyatt, R.G.; Sharpee, R.L., y col.  
Diarrhea in gnotobiotic calves caused by the reovirus-like agent of human infantile gastroenteritis.  
Infect.Immunol.14: 471-474, 1976.-
  - Mebus, C.A.; Wyatt, R.G.; Kapikian, A.Z., y col.  
Intestinal lesions induced in gnotobiotic calves by the virus of human infantile gastroenteritis.  
Vet.Path.14: 273-282, 1977.-

- Melnick, J.  
Enteroviruses viral infections of humans. Epidemiology and control.  
Edited by E.S.Evans. New York, Plenum Press: 136-208, 1976.-
- Meurman, O.H.; Laine, M.J.  
Rotavirus epidemic in adults.  
N.Engl.J.of Med.296: 1298-1299, 1977.-
- Middleton, P.J.; Szymanski, M.T.; Abott, G., y col.  
Orbivirus acute gastroenteritis of infancy.  
Lancet 1: 1241-1244, 1974.-
- Middleton, P.J.; Petric, M.; Hewitt, C.M., y col.  
Counter-immunoelectro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbi group) antigen and antibody.  
J.Clin.Pathol.29: 191-197, 1976.-
- Middleton, P.J.; Szymanski, M.T.; Petric, M.  
Virus associated with acute gastroenteritis in young children.  
Am.J.Dis.Child.131: 733-737, 1977.-
- Muchnik, G.R.; Grinstein, S.  
Contrainmunolectroforesis Discontinua y Microscopía Eelectrónica en el diagnóstico de gastroenteritis virales por rotavirus.  
Rev.Hosp.Niños 81: 227-230, 1978.-
- Muchnik, G.R.; Grinstein, S.  
Rotavirus in Buenos Aires, Argentina.  
Intervirol. En prensa.-
- Neuman, J.F.E.; Broun, F.; Bridger, J.C.; Woode, G.N.  
Characterization of infantile gastroenteritis virus.  
Nature (London) 258: 631-633, 1975.-



- Obijeski, J.F.; Palmer, E.L.; Martin, M.L.  
Biochemical characterization of infantile gastroenteritis virus (IGV).  
J.Gen.Virol.34: 485-497, 1977.-
- Organización Mundial de la Salud.  
Lucha contra las enfermedades diarreicas en América Latina.  
Crónica de la OMS 18: 302-306, 1964.-
- Organización Panamericana de la Salud.  
III Reunión Especial de Ministros de Salud Pública de las Américas.  
Documento básico de referencia. Pág.157. Washington, D.C., 1972.-
- Organización Panamericana de la Salud.  
Discusiones Técnicas de la XIX Conferencia Sanitaria Panamericana de la OPS.  
Estudios y estrategias necesarias para reducir la morbilidad y mortalidad por infecciones entéricas. Washington, D.C., 1975.-
- Parks, W.D.; Queiroga, L.T.; Melnick, J.L.  
Studies on infantile diarrhea in Karochi, Pakistan. II.  
Multiple virus isolation from rectal swabs.  
Am.J.Epidemiol.85: 469-478, 1967.-
- Pelon, W.  
Viral flora of the human alimentary tract.  
Am.J.Dig.Dis.10: 853-863, 1965.-
- Pelon, W.; Villarejos, V.H.; Rhim, J.S., y col.  
Cocksackie group B virus infection and acute diarrhea occurring among children in Costa Rica.  
Arch.Dis.Child.41: 636-641, 1966.-

- Petersen, M.W.; Spendlove, R.S.; Smart, R.A.  
Detection of neonatal calf-diarrhea virus, infant reovirus-like diarrhea virus and coronavirus using the fluorescent virus precipitin test.  
J.Clin.Microbiol.3: 376-379, 1976.-
- Phillips, S.  
Diarrhea current view of the pathophysiology.  
Gastroenterol.63: 495-500, 1972.-
- Pittard, W.B.  
Breast milk immunology.  
Am.J.Dis.Child.133: 83-87, 1979.-
- Puffer, R.R.; Serrano, C.V.  
Características de la Mortalidad en la Niñez.  
Informe de la Investigación Interamericana de Mortalidad en la Niñez. Publicación Científica de la OPS. Pág.262.  
Washington, D.C., 1973.-
- Ramos Alvarez, M.; Sabin, A.B.  
Enteropathogenic viruses and bacteria, role in summer diarrheal disease in infancy and early childhood.  
JAMA 167: 147-156, 1958.-
- Ramos Alvarez, M.; Olarte, M.  
Diarrheal disease in childhood.  
Am.J.Dis.Child.107: 218-231, 1964.-
- Reinman, H.A.; Price, A.H.; Hodges, J.H.  
The course of epidemic diarrhea, nausea and vomiting (Viral dysentery?).  
Proc. Soc.Exp.Biol.Med.59: 8-9, 1945.-
- Richmond, S.J.; Dunn, S.M.; Caul, E.O., y col.  
An outbreak of gastroenteritis in young children caused by

adenovirus.

Lancet 1: 1178-1180, 1979.-

- Rodger, S.M.; Schnagl, R.D.; Holmes, I.H.  
Further biochemical characterization including the detection of surface glycoproteins of human, calf and simian rotavirus.  
J.Virol.24: 91-99, 1977.-
- Rodríguez, W.J.; Kim, H.W.; Arrabio, J.O., y col.  
Clinical features of acute gastroenteritis associated to human reovirus-like agent in infants and young children.  
J.Pediat.91: 188-192, 1977.-
- Roseto, A.; Escaig, J.; Delain, E., y col.  
Structure of rotaviruses as studied by the Freeze Drying technique.  
Virol.98: 471-475, 1979.-
- Ruboglio, E.; Schugurensky, A., Comunicación Personal.  
Laboratorio de Bacteriología, Hospital de Niños de Buenos Aires "Ricardo Gutiérrez", 1979.-
- Scherrer, R.; Benard, S.  
Application d'une technique immunoenzymologique (ELISA) à la detection du Rotavirus Bovin et des anticorps dirigés contre lui.  
Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur) 128A: 495-510, 1977.-
- Schnagl, R.D.; Holmes, I.H.  
Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (Rotavirus).  
J.Virol.19: 267-270, 1976.-
- Schoub, B.D.; Koornhoff, H.J.; Lecatsas, G., y col.  
Viruses in acute gastroenteritis in black infants.  
Lancet 1: 1093-1094, 1975.-

- Schreiber, D.S.; Trier, J.S.; Blacklow, N.B.  
Recent advances in gastroenteritis.  
Gastroenterol.73: 174-183, 1978.-
- Seaver, J.L.  
Application of a microtechnique to viral serological investigations.  
J.Immunol.88: 320-329, 1969.-
- Spratt, M.C.; Marks, M.I.; Gomersall, M., y col.  
Nosocomial infantile gastroenteritis associated with mini-rotavirus and calicivirus.  
J.Pediat.93: 922-926, 1978.-
- Tajima, M.  
Morphology of transmissible gastroenteritis in pigs. A possible member of the Coronavirus.  
Archiv.für die gesamte Virusforschung 29: 105-109, 1970.-
- Thornhill, T.S.; Wyatt, R.G.; Kalica, A.R., y col.  
Detection by immunoelectron microscopy of 26-27 nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis.  
J.Infect.Dis.135: 20-27, 1977.-
- Tomasi, T.B.; Beinenstock, J.M.  
Secretory immunoglobulins.  
Adv.Immunol.9: 1-4, 1968.-
- Tufvesson, B.; Johnsson, T.  
Immunoelectrosmophoresis for detection of reo-like virus. Methodology and comparison with Electron microscopy.  
Acta Path.Microbiol.Scand.Sect.B 84: 225-228, 1976a.-
- Tufvesson, B.; Johnsson, T.  
Ocurrence of a reo-like virus in young children with acute

gastroenteritis.

Acta Path.Microbiol.Scand.Sect.B 84: 22-28, 1979.-

- Vásquez, C.; Tournier, P.  
New interpretation of the reovirus structure.  
Virology 24: 128-130, 1964.-
- Wallis, C.; Melnick, J.L.  
Enhanced detection of Australia Antigen in serum hepatitis patients by Discontinuous Counter-Immunoelectrophoresis.  
Appl.Microbiol.21: 867-869, 1971.-
- Wenman, W.M.; Hinde, D.; Felthman, S.; Gunwith, M.  
Rotavirus infections in adults.  
N.Engl.J.of Med.301: 303-306, 1979.-
- Wyatt, R.G.; Dolin, R.; Blacklow, H., y col.  
Comparison of three agents of acute infectious non-bacterial gastroenteritis by cross challenge in volunteers.  
J.Infect.Dis.129: 709-713, 1974a.-
- Yolken, R.H.; Wyatt, R.G.; Mata, L., y col.  
Secretory antibody directed against rotavirus in human milk-measurement by means of enzyme-linked immunosorbent assay.  
J.Pediat.93: 916-921, 1978.-
- Yolken, R.H.; Wyatt, R.G.; Zissis, G., y col.  
Epidemiology of human rotavirus type 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay.  
N.Engl.J.of Med.299: 1156-1161, 1978.-
- Yow, M.D.; Melnick, J.L.; Phillips, C.A., y col.  
An etiological investigation of infantile diarrhea in Houston during 1962-1963.  
Am.J.Epidemiol.83: 255-261, 1966.-
- Yow, M.D.; Melnick, J.L.; Blattner, R.J., y col.

The association of viruses and bacteria with infantile diarrhea.

Am.J.Epidemiol.92: 33-39, 1970.-

- Zissis, G.; Lambert. J.P.

Different serotypes of human rotaviruses.

Lancet 1: 38-39, 1978.-

## INDICE

I. Introducción . . . . .	7
1) La gastroenteritis como problema en Salud Pública. .	8
1.1. Mecanismos de transmisión. . . . .	10
2) Etiología de las gastroenteritis . . . . .	12
2.1. Las bacterias como causa de gastroenteritis agu- das. . . . .	12
2.2. Virus como agentes causales de la gastroenteri- tis. . . . .	15
2.2.1. Primeros hallazgos experimentales. . . . .	15
2.2.2. Agentes del grupo de "Norwalk" . . . . .	18
2.2.3. Rotavirus y Gastroenteritis. . . . .	20
2.2.3.1. Consideraciones clínicas y epidemiológicas . .	20
2.2.3.2. Aspectos moleculares de rotavirus. . . . .	28
2.2.3.2.a. Morfología . . . . .	28
2.2.3.2.b. Proteínas. . . . .	34
2.2.3.2.c. RNA. . . . .	35
2.2.4. Otros virus asociados con gastroenteritis. . . .	36
2.2.4.1. Adenovirus . . . . .	36
2.2.4.2. Coronavirus. . . . .	37
2.2.4.3. "Pequeños" virus . . . . .	38
II. Materiales y Métodos. . . . .	39
3) Pacientes y muestras . . . . .	40
3.1. Estudios familiares. . . . .	42
3.2. Estudios de calostro . . . . .	42
3.3. Investigación de rotavirus por Microscopía Elec- trónica (ME) . . . . .	42
3.4. Investigación de rotavirus por Contrainmunoelec- troforesis Discontinua (CIED). . . . .	43

3.4.1. Del antisuero antirotavirus humano . . . . .	47
3.5. Fijación de Complemento para diagnóstico de anticuerpos antirotavirus. . . . .	47
3.5.1. Cultivo de "Nebraska calf-diarrhea virus". . . . .	47
3.5.2. Reacción de Fijación de Complemento (FC) . . . . .	49
3.6. Investigación bacteriológica . . . . .	50
3.7. Purificación de rotavirus. . . . .	51
3.8. Iodinación de rotavirus. . . . .	52
3.9. Determinación de los polipéptidos de rotavirus . . . . .	52
3.10. Análisis del RNA genómico de rotavirus en geles de agarosa. . . . .	53
III. Resultados . . . . .	56
4) Identificación de gérmenes . . . . .	57
4.1. Asociación rotavirus-bacterias . . . . .	58
4.2. Técnicas de identificación de rotavirus. . . . .	61
4.3. Incidencia mensual de las infecciones por rotavirus. . . . .	64
4.4. Incidencia de rotavirus según las edades de los pacientes. . . . .	69
4.5. Hallazgos serológicos en pacientes con gastroenteritis. . . . .	69
4.6. Síntomas clínicos en pacientes con gastroenteritis asociada a rotavirus . . . . .	72
4.7. Anticuerpos-antirotavirus en calostro humano . . . . .	74
4.8. Estudios en contactos de pacientes con diarrea producida por rotavirus. . . . .	75
4.9. Morfología de rotavirus. . . . .	78
4.10. Densidad de flotación obtenida. . . . .	80
4.11. Iodinación de rotavirus. Densidad de flotación de rotavirus. . . . .	80



4.12. Análisis de las proteínas de rotavirus en geles de poliacrilamida . . . . .	80
4.13. Análisis del genoma de rotavirus en geles de agarosa. . . . .	85
IV. Discusión y Comentarios . . . . .	90
5) Consideraciones generales. . . . .	91
5.1. Acerca de las técnicas utilizadas para diagnóstico de rotavirus. . . . .	94
5.2. Incidencia mensual y factores meteorológicos . . . . .	96
5.3. Rotavirus y edad . . . . .	103
5.4. Sintomatología clínica . . . . .	105
5.5. Estudio físico-químico de rotavirus humano . . . . .	106
5.5.1. Consideraciones generales. . . . .	106
5.5.2. Análisis de los polipéptidos . . . . .	109
5.5.3. RNA en rotavirus humano. . . . .	111
V. Conclusiones . . . . .	113
VI. Bibliografía. . . . .	116
Indice. . . . .	134
Indice de gráficos. . . . .	137

INDICE DE GRAFICOS

Tabla 1:	Mortalidad por enfermedades diarreicas entre menores de 5 años de edad, 1968-1971, en 15 ciudades de las Américas . . . . .	10
Cuadro I:	Mecanismos básicos de la transmisión de las infecciones entéricas. . . . .	11
Cuadro II:	Etiología de las gastroenteritis agudas en niños. . . . .	12
Cuadro III:	Patogenia de diarreas bacterianas por los gérmenes más comunes ; . . . . .	15
Tabla 2:	Eficiencia y practicidad de los métodos disponibles para detección de rotavirus humano obtenido de heces . . . . .	25
Figura 1:	Diagrama de estructura de rotavirus humano, visto en Foto 1, del modelo de Esparza y Gil, 1978 . . . . .	30
Foto 1:	Modelo de ultraestructura de rotavirus humano visto desde el eje de 5 pliegues (según Esparza y Gil, 1978) . . . . .	31
Figura 2:	Diagrama de estructura de rotavirus humano, visto en Foto 2, del modelo de Esparza y Gil, 1978 . . . . .	32
Foto 2:	Modelo de ultraestructura de rotavirus humano visto desde el eje de 3 pliegues (según Esparza y Gil, 1978) . . . . .	33
Tabla 3:	Pesos moleculares estimados para polipéptidos de rotavirus humano y de ternero, y su localización en la doble cápside . . . . .	34

Tabla 4:	Pesos moleculares estimados para los segmentos del genoma de rotavirus . . . . .	36
Figura 3:	Dibujo esquemático de elementos necesarios para realizar una Contrainmuno-electroforesis Discontinua . . . . .	46
Tabla 5:	Identificación de virus en heces de niños con gastroenteritis y controles. . . . .	58
Foto 3:	Rotavirus, visto al Microscopio Electrónico. . . . .	59
Foto 4:	Adenovirus, visto al Microscopio Electrónico. . . . .	60
Tabla 6:	Identificación de rotavirus y bacterias como únicos agentes o en asociación. . . . .	61
Foto 5:	Bandas de precipitación en gel de agarosa luego de realizar una Contrainmuno-electroforesis Discontinua . . . . .	62
Tabla 7a:	Resultados obtenidos por Contrainmuno-electroforesis Discontinua (CIED) y por Microscopía Electrónica (ME) en 180 niños internados con gastroenteritis. . . . .	63
Tabla 7b:	Resultados obtenidos por Contrainmuno-electroforesis Discontinua (CIED) y por Microscopía Electrónica (ME) en 120 niños sanos. . . . .	64
Figura 4:	Incidencia mensual de rotavirus. . . . .	66
Figura 5:	Relación entre la incidencia de rotavirus y temperaturas . . . . .	67
Figura 6:	Incidencia mensual de rotavirus y bacterias . . . . .	68

Figura 7:	Incidencia de rotavirus según las edades . . . . .	70
Figura 7a:		71
Tabla 8:	Comparación de los hallazgos en heces y la respuesta serológica (medida por FC con NCDV) en 90 pacientes internados con gastroenteritis . . . . .	72
Tabla 9:	Sintomatología en pacientes internados con gastroenteritis por rotavirus o bacterias. .	73
Tabla 10a:	Principales hallazgos virales y serológicos en una familia de 7 integrantes donde el niño padeció diarrea producida por rotavirus. . . . .	75
Figura 8a:	Número de días y cantidad de pacientes con gastroenteritis por rotavirus y bacterias que reportaron diarrea. . . . .	76
Figura 8b:	Número de días y cantidad de pacientes con gastroenteritis por rotavirus y bacterias que reportaron vómitos. . . . .	77
Tabla 10b:	Principales hallazgos virales y serológicos en una familia de 4 integrantes donde uno de los niños padeció diarrea producida por rotavirus. . . . .	78
Foto 6:	Rotavirus: doble cápside y simple cápside . .	79
Foto 7:	Estructuras tubulares aplanadas (rotavirus) . . . . .	81
Foto 8:	Bandas observadas en los tubos luego de realizar ultracentrifugación en gradiente de ClCs . . . . .	82

Figura 9:	Gráfico de mediciones de las fracciones recogidas luego de realizar ultracentrifugación en gradiente de ClCs. . . . .	83
Figura 10:	Ròtavirus iodinado y gradiente de ClCs . . . . .	84
Tabla 11:	Area, % y Peso Molecular estimado para los polipéptidos de rotavirus de un paciente internado con gastroenteritis . . . . .	85
Foto 9:	Bandas de polipéptidos observadas luego de realizar una corrida electroforética en geles de poliacrilamida. . . . .	86
Figura 11:	Densitometría de geles de polipéptidos de rotavirus. . . . .	87
Foto 10:	Bandas de RNA de rotavirus observadas luego de realizar una corrida electroforética en geles de agarosa mediante slabs horizontales. . . . .	89
Figura 12:	Relación entre precipitaciones, humedad e incidencia de rotavirus humano . . . . .	99
Figura 12a:		100
Figura 12b:		101
Figura 12c:		102
Foto 11:	Hemicápsides de rotavirus. . . . .	107
Foto 12:	Aproximación de estructuras tubulares (Foto 7). . . . .	108
Tabla 12:	Pesos moleculares de los polipéptidos de rotavirus humano según Rodger y col.(1975) y este trabajo . . . . .	110