

constantes controlando la temperatura del sistema a menos de 20 grados centígrados. Ya que para este propósito no se contaba con una cámara de electroforesis con temperatura regulada, se diseñó un sistema de reflujo constante de agua fría manteniendo el sistema en refrigeración.

Los resultados de estos experimentos muestran una buena separación de bandas de DNA de cadena simple y muestran también que las cepas con genotipos P[8] presentan mayor estabilidad ya que no se detectó variabilidad entre estos genotipo. Estos resultados muestran que en 45 cepas analizadas, se observó solo un modelo de migración, donde todos los cDNA de cadena simple migraron a la misma distancia, lo que sugiere que no presentan diferencias entre la secuencia de nucleótidos (figura 11).

Sin embargo, cuando este mismo proceso se realizó para las 12 cepas de rotavirus que se aislaron con electroferotipo corto y resultaron genotipos P[4], se puede apreciar una diferencia significativa en la migración entre los mismos genotipos (figura 12), asimismo, a diferencia de los genotipos P[8], en

los genotipos P[4], dos diferentes perfiles de migración bien marcados aparecen cuando se someten a electroforesis bajo condiciones de SSCP. En la figura 13 se puede apreciar como las dos cepas que corren en los carriles 7 y 8 migran mas

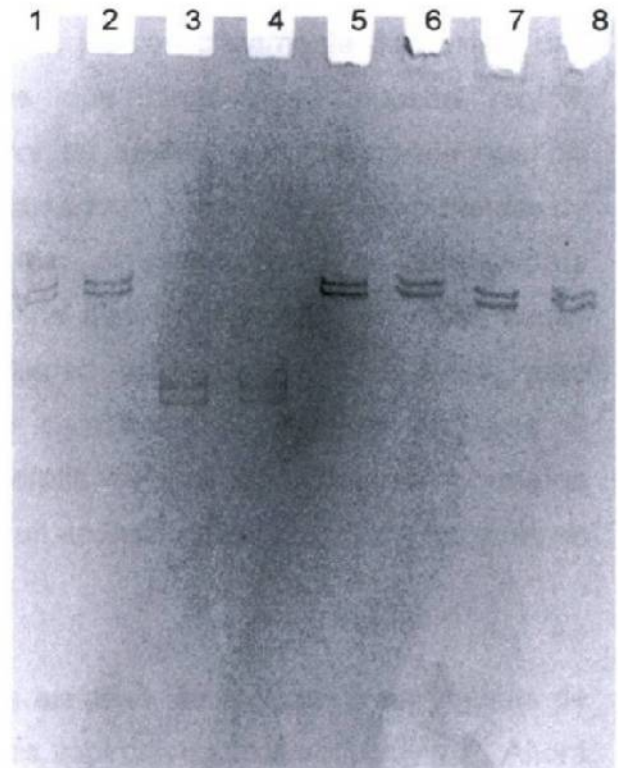


Figura 13: Análisis por SSCP del producto de RT-PCR de cepas de rotavirus de Infantes con gastroenteritis. Líneas 1-2 y 5-8 productos de 483 bases genotipos P[4]; líneas 3-4, productos de 345 bases genotipos P[8].

lejos que las representadas por los carriles 1, 2, 5 y 6 donde se muestra diferencias en migración. Lo que indica variabilidad entre estos genotipos.

## **Serotipos**

Los resultados obtenidos a través de los estudios de polimorfismo de los genes de las proteínas de superficie de los rotavirus, indican claramente que existe una fuerte homogeneidad entre las cepas que circulan en nuestra región, principalmente de los genotipos P[8]. Por tal motivo, y considerando que las variaciones genéticas no siempre se reflejan a nivel antigénico en las proteínas de superficie, el siguiente paso fue estudiar el polimorfismo antigénico para establecer si la misma estabilidad genética que se presentan en estas cepas también se correlaciona con homogeneidad antigénica. Por lo tanto, para responder lo anterior, realizamos una caracterización de los serotipos G representados por la proteína VP7 y los serotipos P representados por la proteína VP4 de las cepas colectadas, seguida de un análisis de los epítopes presentes en estas proteínas.

Para determinar el serotipo de las cepas aisladas, se estableció un sistema de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales específicos de serotipo G y P. Ahora bien, considerando que el electroferotipo predominante fue el denominado electroferotipo largo, y que fueron pocas las variaciones en migración de los genes que codifican para las proteínas de superficie, se eligieron 341 muestras para la serotipificación mediante este sistema de ELISA, las cuales corresponden a las cepas aisladas hasta 1999, mientras que las muestras de la temporada 2000 se analizaron por el sistema de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos de serotipo.

Aunque los resultados de estos análisis muestran la presencia de los cuatro serotipos G que son considerados los mas importantes desde el punto de vista epidemiológico, se observa la predominancia de los serotipos G1 y G3 (tabla 2), ya que de 341 cepas analizadas 166 (48.6%) correspondieron al serotipo G1 (46.3%) como cepa infectante y en ocasiones en coinfección con el serotipo G3 (2.3%), mientras que 162 (47.5%) resultaron ser serotipo G3 con 151 (44.3%) de infecciones individuales y 11 (3.2 %) en coinfección con otros serotipos incluyendo G1, G2 y G4. Estos resultados también muestran solo 2 (0.5% ) cepas que resultaron ser serotipo G2 (una con electroferotipo corto) y 3 (0.8 %) serotipo G4 (tabla 2 y 3).

Tabla 2: Frecuencia de serotipos de rotavirus aislados de infantes con gastroenteritis. Presencia de serotipos en muestras fecales

Serotipos G						
	G1	G2	G3	G4	ND	Total
Frecuencia	166 (48.6%)	2	162 (47.5%)	3	19 (5.5%)	341

Tabla 3: Frecuencia de serotipos de rotavirus aislados de infantes con gastroenteritis. Coinfecciones con predominancia de serotipos G1 y G3

Serotipos G									
	G1	G2	G3	G4	G1,G3	G2,G3	G3,G4	ND	Total
<b>No. cepas</b>	158 (46.3%)	1	151 (44.3%)	1	8 (2.3%)	1	2	19 (5.6%)	341

En base al mismo criterio de variabilidad genética, se eligieron 197 muestras para determinar la variabilidad de serotipos P y de los epítopes presentes en la proteína VP4. Los resultados de ELISA revelan que 159 (91%) cepas corresponden al serotipo P1A, únicamente una cepa reaccionó con el anticuerpo específico de P1B, mientras que 13 (7%) muestras presentaron reacción dual con P1A y P1B (tabla 4).

Tabla 4: Serotipos P aislados de heces de infantes con una infección por rotavirus

Serotipos					
	P1A	P1B	P1A,P1B	ND	Total
Frecuencia	159 (91%)	1	13 (7%)	24 (12.1%)	197

Estudios adicionales de estas cepas reveló que las principales combinaciones de los serotipos en las cepas predominantes correspondieron a G1, P1A y G3 P1A, por lo que el serotipo P1A resultó estar presente en la mayoría de las cepas aisladas independientemente del serotipo G. Estos resultados aumentan el interés por estudiar esta proteína, con el objetivo de determinar su estabilidad en las muestras de campo.

### Caracterización de epítopes

Considerando lo anterior, el siguiente objetivo fue determinar por ELISA los epítopes presentes en esta proteína (VP4). Para lograr este propósito, se utilizaron 11 anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes en la proteína de superficie VP4, cuatro de ellos relacionadas al serotipos P1A, uno al serotipo P1B, 5 al

serotipo P2 y y uno al serotipo P3 que además presenta reacción cruzada con el serotipo P1A (tabla 5).

Tabla 5: Anticuerpos monoclonales utilizados para identificar los epítopes correspondientes en la proteína VP4 de las cepas de estudio

<b>Anticuerpo Monoclonal</b>	<b>Serotipo que identifican</b>
1A10, F:45, 2A3, 2G1,	P1A
RV:5	P1B
HS6, HS9, HS10, HS11, ST3	P2
2G1	P3

Los análisis de los resultados obtenidos muestran 9 distintos modelos de reactividad con cepas que reaccionaron hasta con 3 anticuerpos monoclonales (tabla 6).

Tabla 6: Caracterización Molecular de la Proteína VP4 de Cepas de Rotavirus Aisladas de Infantes con Gastroenteritis.

Serotipo	Epítoto									Total
	1A10 2A3 2G1	1A10 2A3	1A10 2G1	1A10 F:45-4	1A10	1A10 F:45-4 RV5:2	F:45-4 RV5:2	F:45-4	RV5:2	
P1A	41 (23.6%)	6 (3.4%)	1 (.005%)	67 (38.7%)	11 (6.3%)			33 (19%)		159
P1A, P1B						7 (0.04%)	6 (0.03%)			13
P1B									1	1
<b>Total</b>	41	6	1	67	11	7	6	33	1	173

No obstante, en concordancia con los resultados de los estudios de polimorfismo genético, los epítotoes relacionados a los serotipos P1A son los que con mayor frecuencia reaccionaron con las cepas estudiadas, de estos epítotoes resaltan 1A10 y F:45 que fueron los epítotoes con mayor distribución, ya que de 173 cepas analizadas el epítoto 1A10 fue posible detectarlo en 133 (77%) de ellas, mientras

que el epítipo F:45:4 se detectó en 113 (65%) de las cepas aisladas, seguidos de 2A3 con 47 (27%) y 2G1 con 42 (24%) (tabla 7).

Tabla 7: Epítipes presentes en la proteína VP4 de rotavirus aislados de una infección natural

Serotipo	Epítipo					Total
	1A10	2A3	2G1	F45:4	RV5:2	
P1A	133 (77%)	47 (27%)	42 (24%)	113 (65%)		335 (97.6)
P1B					8 (4.6%)	8
<b>Total</b>	133	47	42	113	8	343

Aunque estos resultados también muestran que la mayoría de las cepas fueron reconocidas por al menos dos de los anticuerpos monoclonales que detectan los epítipes predominantes 1A10 y F:45-4, de la totalidad de las 173 cepas, en 74 (42%) de ellas se detectó la presencia de forma conjunta de estos dos epítipes predominantes donde en 7 de ellas también se encontró reacción con el anticuerpo monoclonal que reconoce al serotipo P1B. Estos resultados muestran



la importancia del epítipo 1A10 seguido de F:45-4, los cuales se consolidan como los principales epítipes de muestras de campo aislados de nuestra región (tabla 8).

Tabla 8: Frecuencia de epítipes en el serotipo P1A de la proteína VP4 de rotavirus aislado de infantes con infección natural

Serotipo	Epítipo			Total
	1A10	F45:4	1A10, F45:4	
P1A	59 (34.3 %)	39 (22.6 %)	74 (43%)	172

### Respuesta inmune

Para determinar que los epítipes predominantes en la proteína VP4 son los más importantes para el posible desarrollo y evaluación de una vacuna contra rotavirus, el siguiente objetivo fue realizar caracterización de la especificidad de la respuesta inmune de anticuerpos. Para este propósito, se obtuvieron muestras de sangre de

infantes con rotavirus y se analizó la seroconversión de anticuerpos neutralizantes a través de una prueba de neutralización de reducción de focos infecciosos en células de riñón de mono MA104.

La primera fase de este estudio incluyó determinar la seroconversión de los anticuerpos neutralizantes presentes en 71 sueros pares. Para determinar la seroconversión de anticuerpos se utilizó como referencia cepas de rotavirus con serotipo dual G y P conocidos. Estas cepas correspondieron a G1,P1A; G2,P1B, G3,P1A, y G4,P2A.

Los resultados de estos experimentos de neutralización con los sueros de los infantes se muestran en las figuras 14 y 15, donde además de una respuesta homotípica, se observó una seroconversión de anticuerpos hacia cepas distintas de la cepa infectante, ya que cuando la cepa responsable de la infección fue serotipo G1 en 16 (66.6%) de 24 sueros se observaron títulos de anticuerpos hacia otros serotipos G, de los cuales 12 (50%) de los sueros reaccionaron con el serotipo dual G3,P1A mientras que 4 (17%) de ellos lo hizo con serotipo G2, P2A.

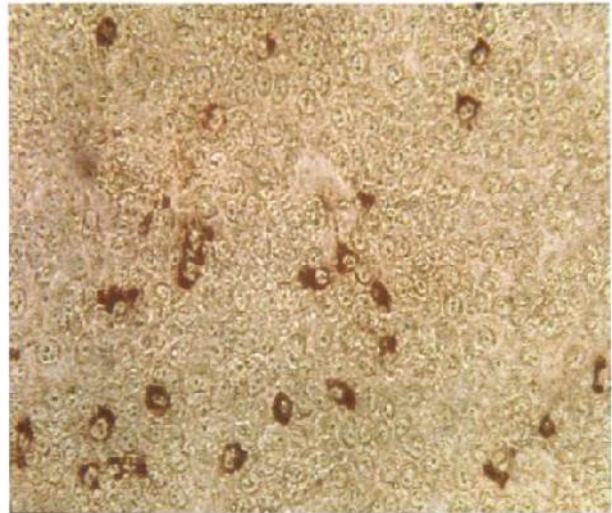


Figura 14: Titulación de focos infecciosos en células MA104 utilizando cepas de referencia en los procesos de infección.

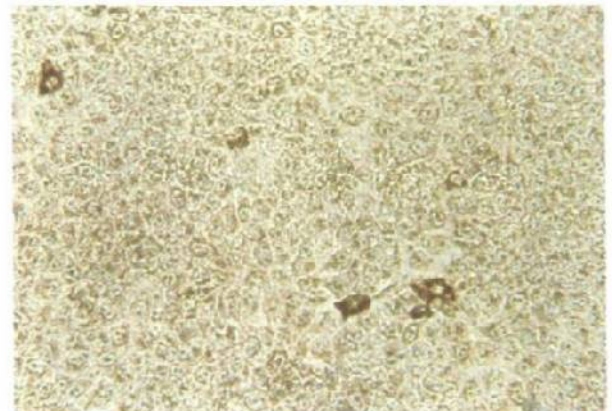


Figura 15: Neutralización de focos infecciosos. Las células MA104 se infectaron con cepas conocidas en presencia de suero de infantes con gastroenteritis

Por otro lado cuando el serotipo infectante fue G3, de 47 sueros analizados 25 (53%) reaccionaron con el serotipo G1,P1A, mientras que 5 (11%) sueros reaccionaron con el serotipo G4, P2A lo que indica una marcada respuesta heterotípica hacia las dos proteínas de superficie (tabla 9).

Tabla 9: Seroconversión de anticuerpos neutralizantes a las cepas Wa, S2, P y ST3 en suero de infantes infectados con serotipos G1 y G3.

Serotipo Infectante	No. de sueros probados	Wa G1,P1A	S2 G2,P1B	Price G3.P1A	ST3 G4,P2A	ND	Total
G1	24	13 (54%)	0	12 (50%)	4 (17%)	7 (29%)	24
G3	47	25 (53%)	3 (6%)	35 (74%)	5 (11%)	9 (19%)	47
<b>Total</b>	71	38 (54%)	3 (4%)	47 (66%)	9 (13%)	16	71

Un análisis mas exhaustivo de estos resultados revelaron que la respuesta homotípica para G1 sólo se dio en 4 (16%) de los sueros probados ya que reaccionaron únicamente con su cepa homóloga, mientras que 9 (37.5%) de ellos reaccionaron además de la cepa homóloga, con cepas con serotipo G y P distinto. De la misma manera, 12 (25.5%) sueros reaccionaron de manera homotípica únicamente para G3, mientras que 23 (54.7%) sueros reaccionaron de manera conjunta con la cepa homóloga y con serotipos distintos a G3 (tabla 10).

Tabla 10: Seroconversión homotípica y heterotípica de anticuerpos neutralizantes a las cepas Wa, S2, P y ST3 en suero de infantes infectados con serotipos G1 y G3.

Serotipo	No. de Sueros Probados	Wa	Price	ST3	Wa, Price	P, ST3	Wa, S2, Price	Wa, Price ST3	Wa, S2, P, ST3	ND	Total
G1	24	4 16.6%	2 8.3%	1 4.1%	7 29.1%	1 4.1%	0	2 8.3%	0	7 29.1%	24
G3	47	3 6.3%	12 25.5%	0	16 34%	1 2.1%	2 4.2%	3 6.3%	1 2.1%	9 19.1%	47
Total	71	7 9.8%	14 19.7%	1 1.4%	23 32.3%	2 2.8%	2 2.8%	5 7.0%	1 1.4%	16 22.5%	71

Después de mostrar que en los sueros de los infantes existió seroconversión de anticuerpos de forma heterotípica, y considerando que las cepas de referencia además de presentar serotipo G también presentan serotipo P, fue nuestro interés el determinar hacia cual de los dos proteínas de superficie, ya sea VP4 o VP7 va dirigida la principal respuesta de los anticuerpos presentes en el suero. Por tal

motivo, los siguientes experimentos de neutralización se realizaron utilizando cepas de rotavirus rearreglantes producidas en células MA104, por coinfección de cepas de rotavirus de origen humano y animal. De tal manera que para la realización de este experimento se contaba con cepas que expresaban VP7 de origen Humano con VP4 de origen animal y viceversa.

Cuando analizamos de esta manera la seroconversión específica a la proteína VP7, encontramos que de 47 sueros analizados de infantes que fueron infectados con serotipo G3, 26 (62.5%) de ellos mostraron reactividad para los serotipos probados. De los anteriores, 21 (44.5%) de ellos, presentaron anticuerpos específicos a la cepa infectante con serotipo G3, mientras que otros cuatro (8.5%), neutralizaron cepas tanto de serotipo G1 y G3 y solamente un (2.1%) suero fue capaz de neutralizar de manera conjunta una cepa con serotipo G2 y otra con serotipo G3. Esto puso en evidencia que la respuesta de anticuerpos neutralizantes fue principalmente homotípica para el serotipo G3 (tabla 11)

Tabla 11: Número de sueros con seroconversión de anticuerpos neutralizantes a los serotipos G de la proteína de superficie VP7

Serotipo Infectante	No. de sueros probados	G1	G3	G1,G3	G2,G3	G1,G3,G4	Total
G1	24	2 (8.3%)	4 (16.6%)	7 (29.1%)	0	2 (8.3%)	15 (62.5%)
G3	47	0	21 (44.5%)	4 (8.5%)	1 (2.1%)	0	26 (55.6%)
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>2 (2.8%)</b>	<b>25 (35.2%)</b>	<b>11 (15.4%)</b>	<b>1 (1.4%)</b>	<b>2 (2.8%)</b>	<b>41 (57.7%)</b>

Cuando analizamos estos mismos sueros para la proteína VP4, encontramos que 38 (80.8%) de ellos reaccionaron a alguno de las cepas probadas, aunque es importante resaltar que la presencia de anticuerpos fue casi exclusiva para el serotipo P1A ya que 37 (78.7%) sueros mostraron capacidad neutralizante para esta proteína (tabla 12) .

Tabla 12: Número de sueros con seroconversión de anticuerpos neutralizantes a los serotipos P de la proteína de superficie VP4

Serotipo Infectante	No. de sueros probados	P1A	P1B	P1A;P1B	Total
G1	24	17 (70.8%)	0	1	18
G3	47	34 (72.3%)	1	3	38
<b>Total</b>	71	51 (71.8%)	1 (1.4%)	4 (5.6%)	56 (78.8%)

De la misma forma, estos experimentos de neutralización mostraron que cuando la cepa infectante fue serotipo G1, el comportamiento fue similar ya que aunque existió seroconversión tanto a la cepa homóloga G1, como a las cepas con

serotipo G3 y G4, la principal respuesta de anticuerpos se detectó hacia el serotipo P1A, ya que de 24 sueros probados 18 (75%) mostraron reactividad contra este serotipo (tabla 11 y 12).

Considerando estos resultados y que el principal epítotope encontrado en las cepas de estudio con serotipo P1A fue el epítotope 1A10, el siguiente experimento consistió en determinar si este epítotope presente en la mayoría de las cepas aisladas durante el estudio también es el principal epítotope inmunodominante.

Para comprobar lo anterior, realizamos un ensayo de ELISA de competencia entre el suero y anticuerpos monoclonales anti-epítotope VP4, donde el suero de los infantes compitió con los anticuerpos monoclonales para neutralizar a las cepas de rotavirus con serotipo P1A. Para realizar este experimento, Se eligieron 10 sueros pares, así como los anticuerpos monoclonales específicos del epítotope 1A10 (el cual se detectó con mayor frecuencia entre las cepas analizadas), RV5:2 (que detecta al epítotope presente en el serotipo P1B), HS6 (para detectar el epítotope presente en el serotipo P2) y 1E4 (que se ha detectado de manera dual en cepas con serotipo P1A y P2).

Los resultados de estos experimentos muestran que los anticuerpos presentes en los sueros de los infantes infectados predominan aquellos que son específicos para el epítotope 1A10, ya que en el 100% de los sueros probados fue posible demostrar competencia entre el suero y los anticuerpos monoclonales (tabla 13). Esta competencia fue positiva al obtener una absorbancia menor de 0.2 a 405 nanómetros en el lector de ELISA, inclusive en dos cepas con reactividad dual P1A, P1B. Estos resultados apoyan fuertemente a la proteína VP4 como la más importante en generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes y a 1A10 como el epítotope inmunodominante entre las cepas probadas, ya que además de la estabilidad antigénica de esta epítotope en la proteína y la estabilidad genética determinada por los experimentos de SSCP, indican que esta proteína puede ser un fuerte candidato para la elaboración de una vacuna contra rotavirus.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la eficiencia de una vacuna a largo plazo contra rotavirus, lo constituye la falta de estabilidad antigénica del agente biológico que se requiere controlar. En este sentido, existen muchas evidencias de que los virus son agentes infecciosos que pasan por mutaciones o rearrreglos genómicos de tal forma que las variedades pueden no persistir en el tiempo y por lo tanto, los cambios que se generan en una cepa silvestre pueden ocasionar la falla de una vacuna en proteger contra la enfermedad que producen (Trabelsi et al., 2000; Unicomb et al., 1999; Offit et al., 1986; Ciarlet et al., 1997).

Por tal motivo, el objetivo general de esta investigación, se enfocó principalmente en establecer las características genéticas y antigénicas de las cepas de rotavirus que circulan en nuestra región, y correlacionar las cepas encontradas con la respuesta de anticuerpos neutralizantes, con el objetivo de establecer las bases moleculares de la respuesta inmune ante una infección natural por los rotavirus.

La primera fase del estudio, consistió en analizar los modelos electroforéticos de los genes cognatos de las cepas aisladas. Aunque existen muchos reportes alrededor del mundo donde se establece que durante un brote epidémico se pueden encontrar diferentes modelos de migración en sistemas continuos de electroforesis (Beards et al., 1982; Ghosh et al. 1989; Himagawa et al., 1993), en el presente trabajo, encontramos tres distintos modelos de comportamiento. Antes de la temporada 1998-1999, los modelos de migración se presentaron con una gran estabilidad (figura 3). Sin embargo, durante los dos brotes consecutivos registrados en el periodo 1998-2000, se pudo detectar ocho diferentes modelos electroforéticos con diferencias en migración de casi la totalidad de los genes cognato. Es de resaltar que a diferencia de los aislados que se registraron antes de la temporada 1999-2000, en esta ocasión circuló en nuestra región el electroferotipo corto, situación que no se había presentado en los últimos años ya que en los registros de los aislados de rotavirus en el área metropolitana de



Monterrey, N.L. que datan desde 1991, sólo habíamos encontrado una cepa con estas características en el año de 1993 (Contreras et al., 1995).

Aunque la introducción de una nueva variedad de rotavirus entre la población susceptible representa *per se* una gran importancia epidemiológica, el enfoque de este primer análisis estuvo dirigido en estudiar la variabilidad genética de las cepas aisladas y establecer una correlación con la variabilidad antigénica de esas mismas cepas. Por tal motivo el estudio se enfocó principalmente en los genes responsables de la antigenicidad de los rotavirus. Estudios en muchas regiones han demostrado que estos genes corresponden al segmento 4 que codifica para la proteína VP4 y a los segmentos 7, 8, o 9 que dependiendo de la cepa viral, codifica para la proteína VP7, aunque en la mayoría de los casos esta responsabilidad recae en el segmento 9 (Gault et al., 1999; Estes et al., 1996; Iturriza-Gómara et al., 2001).

Los datos presentados en este estudio indican una mayor variabilidad en la migración electroforética de los genes de VP7 que para VP4, estos resultados concuerdan con los encontrados en nuestra región en estudios previos (Contreras et al., 1995). Sin embargo, en el presente estudio, nosotros encontramos por vez primera variabilidad en la migración del segmento 4 indicando la presencia de nuevas variedades genéticas (figura 3). Por tal motivo, para realizar una investigación mas exhaustiva, fue nuestro interés determinar los genotipos de las cepas con estos diferentes modelos de migración y ampliar estos estudios para determinar si estas variabilidades en migración estaban relacionadas a cambios genotípicos y/o intragenotípicos.

En este sentido, nuestros resultados también están acordes a las muchas evidencias experimentales que existen de la relación entre los electroferotipos largos con el genotipo P[8], así como los electroferotipos cortos con el genotipo P4 (Flores et al., 1986; Gorziglia et al., 1988), ya que en esta investigación siempre se dio esta relación cuando analizamos los diferentes electroferotipos. Sin embargo,

un dato valioso que aporta este trabajo es el encontrado en los estudios por SSCP para detectar las variedades intratípicas de los genotipos y establecer el grado de variabilidad a este nivel entre las cepas que circulan en nuestra región. Aunque existe reportes del polimorfismo intragenotípico en diferentes cepas virales (Mayrand et al., 2000; Emeny et al., 1999; Wang et al., 1998), este es el primer reporte de la variación intragenotípica en genotipos P4 de los rotavirus. Cuando analizamos de esta manera tanto los genotipos P[8] como P4, encontramos variabilidad en la migración del DNA de una cadena, sólo de los genotipo P4, mientras que los genotipos P[8] permanecieron completamente estables. Aunque estos resultados hacen evidente que es necesario realizar más estudios genéticos con el genotipo P4, también indican una fuerte estabilidad entre los genotipo P[8] los cuales son los predominantes en la mayor parte del mundo incluyendo nuestra región (Gentsch et al., 1992; Gentsch et al., 1996; Fischer et al., 2000) y por su propia estabilidad, se convierten en fuertes candidatos para incluir cepas de esta naturaleza en la elaboración de una vacuna contra rotavirus. Asimismo, aunque existen datos de variedades intragenotípicas en cepas virales distintas a rotavirus, esta es la primera ocasión que se registra por análisis de SSCP estabilidad en los genotipos P[8] y fuerte variabilidad entre los genotipos P4.

A la par de los análisis genéticos, en este estudio también se realizó una caracterización antigénica de las cepas aisladas. Considerando que los serotipos G que más prevalecen entre las diferentes poblaciones del mundo son los serotipos G1 al G4 (Steele et al., 1995; Frühwirth et al., 2000), se puede decir que nuestra región se encuentra dentro de este contexto, ya que los serotipos que prevalecieron durante todo el estudio fueron serotipos G1, y G3. Sin embargo, es importante mencionar que aunque el serotipo G2 es uno de los serotipos que junto con G1, G3 y G4 se aíslan con más frecuencia en infantes con gastroenteritis (Hussein et al., 1993; Adah et al., 2001), en la temporada 1999-2000, apareció este serotipo G2 en el 18% de las cepas analizadas. Por lo que se recomienda reforzar las medidas de vigilancia para determinar la importancia de este serotipo en futuros brotes epidémicos.

Por su parte, ya que el gen que codifica para la proteína de superficie VP4 se segrega de manera independiente y al igual que VP7 es capaz de inducir una buena respuesta de anticuerpos neutralizantes, el siguiente objetivo en la caracterización antigénica fue el determinar la reactividad de esta proteína con un conjunto de anticuerpos monoclonales. En este estudio, encontramos ocho distintos modelos de reactividad, incluyendo cepas que reaccionaron con tres anticuerpos monoclonales. Asimismo, observamos que siete cepas reaccionaron de forma dual con el anticuerpo 1A10 (que reconoce al serotipo P1A) y RV:5 (anticuerpo que reconoce P1B) y otras seis cepas reaccionaron a su vez con el anticuerpo F:45 (que reconoce a P1A) y con RV:5, lo que refuerza los datos documentados en otros estudios que indican la dificultad de utilizar los anticuerpos monoclonales de VP4 para identificar los serotipos (Coulson et al., 1993; Unicom et al., 1999). Sin embargo, considerando que los anticuerpos 1A10 y F45 reaccionan con el serotipo P1A y que el genotipo P[8], son los predominantes en este estudio, se puede decir que al menos en nuestra región, las cepas vacunales que se produzcan para controlar la gastroenteritis por rotavirus deberían contar con uno de estos epítopes para garantizar una buena protección entre los infantes.

En este sentido, para evaluar si los epítopes anteriores son importantes en inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes, nosotros obtuvimos muestras de sangre de infantes con una infección por rotavirus y analizamos la seroconversión de anticuerpos neutralizantes a través de una prueba de neutralización de reducción de focos infecciosos. Asimismo, analizamos también esta respuesta de anticuerpos en los infantes infectados, con el objetivo de observar que proteína es la más importante desde el punto de vista inmunológico y si los anticuerpos que se generan contra esta proteína van dirigidos principalmente contra los referidos epítopes.

Considerando que los principales serotipos G que encontramos en la cepa de estudio fueron G1 y G3 en combinación con el serotipo P1A, observamos que

tanto las cepas infecciosas con serotipo G1 y G3 fueron capaces de inducir una respuesta heterotípica, a uno o más serotipos, aunque el principal modelo observado fue que cepas con serotipo G1 evocaron respuesta de anticuerpos neutralizantes contra G3 y viceversa. Por su parte, la principal respuesta de anticuerpos observada contra la proteína VP4 fue predominantemente homotípica para los serotipos P.

Ya que los resultados de estudios previos no han dejado claro cual de las dos proteínas de superficie son las más inmunodominantes (Clark et al., 1990; Ward et al., 1988), el siguiente paso fue analizar la respuesta de anticuerpos contra VP4 y comparar esta respuesta con la obtenida para VP7.

A diferencia de la respuesta heterotípica de VP7, en este estudio encontramos que VP4 induce preferentemente una respuesta homotípica, ya que el 77% de los infantes seroconvirtieron a VP4 P1A mientras que sólo el 7% seroconvirtieron a P1B. No obstante, es importante considerar que el serotipo P1A se encuentra presente en las cepas de rotavirus con serotipo G1, G3 o G4 por lo que este tipo de seroconversión puede neutralizar cepas con estas características serotípicas y así, esta respuesta homotípica podría ser de gran relevancia en la protección contra tres de los serotipos G más importantes desde el punto de vista epidemiológico.

Para entender mejor la naturaleza de esta respuesta de anticuerpos hacia VP4 y ver el papel que juegan los epítopes predominantes entre las cepas que causaron la infección, el siguiente paso fue estudiar la respuesta de anticuerpos neutralizantes pero ahora mediante una prueba de ELISA de competencia contra los epítopes que previamente identificamos sobre los serotipos G y P.

En acuerdo con estudios previos, nosotros también observamos una buena correlación entre la técnica de neutralización de focos infecciosos y la prueba de ELISA de competencia, ya que los resultados fueron muy similares entre ambas

pruebas (Matson et al., 1992). En este caso el epítope que fue reconocido en mayor magnitud por el suero de infantes infectados con G1 y G3 fue el epítope 4F8 el cual es un epítope presente en los serotipos G3. La posible explicación de la competencia del suero de infantes infectados con G1 es que este virus pudo haber inducido una respuesta heterotípica contra G3 de acuerdo a los datos presentados en la tabla 9 y a los estudios desarrollados por otros investigadores (Green et al., 1990).

Por su parte, considerando a VP4 los dos epítopes más frecuentemente reconocidos fueron 1A10 y 1E4 donde 1A10 se ha encontrado a ser específico para P1A y el 1E4 se puede localizar en cepas con serotipo P1A y P2A por lo que es considerado que puede inducir una respuesta heterotípica. Sin embargo, en el presente estudio los sueros de niños que respondieron a 1E4 no pudieron neutralizar a la cepa ST3 (P2A), por lo que la competencia de este suero pudo ser debido a las cepas con serotipo P1A que se caracterizan por llevar este epítope y por lo tanto la respuesta fue del tipo homotípica

Aunque en este trabajo se encontró que los infantes infectados desarrollaron una respuesta tanto homotípica como heterotípica, se puede apreciar que la proteína de interés puede ser VP4 en virtud de que la respuesta predominante, aunque es de naturaleza homotípica, neutraliza tres de las principales cepas que circulan entre la población infantil.

En resumen, los estudios desarrollados para determinar los epítopes predominantes indican a 1A10 y 1E4 como los más importantes. Asimismo, considerando también los resultados del presente trabajo con respecto a la estabilidad del genotipo P8 el cual está relacionado al serotipo P1A, y de que la respuesta inmunológica va dirigida contra estos dos epítopes que con mayor frecuencia fueron detectados, la estrategia para mejorar una vacuna antirotavirus deberá ser dirigida a incrementar su potencial de protección al desarrollarla con virus rearreglantes que expresen en su superficie este serotipo. Si además, se

incluyen cepas rearrreglantes con los serotipos que están cobrando importancia epidemiológica entre la población abierta, se aumentarían las expectativas de protección entre la población infantil.

En conclusión, y para estar en concordancia en una vacuna tetravalente, uno de los virus rearrreglantes deberá expresar en su superficie el serotipo P1A, de esta manera la respuesta inmune inducida podrá neutralizar a las cepas de rotavirus con los serotipo G1, G3 y G4. Otra cepa deberá expresar al serotipo G2 (el cual esta relacionado al genotipo P4 detectado en este estudio) y dos cepas más con el serotipo G8 y G9 respectivamente que últimamente han ganado importancia epidemiológica (Cunliffe et al., 2001; O'Halloran et al., 2000; Palombo et al., 2000; Santos et al., 1998), lo anterior, en lugar de la vacuna tetravalente preparada contra los serotipos G1 al G4, que aunque fue retirada por efectos secundarios de tipo intusección, la protección estaba limitada a estos serotipos, por lo que un nuevo diseño con los serotipos mencionados aumentaría considerablemente las expectativas de éxito en la protección de un mayor número de infantes alrededor del mundo.

## REFERENCIAS

Adah, M. I., A. Wade, and K. Taniguchi. 2001. Molecular Epidemiology of Rotaviruses in Nigeria: Detection of Unusual Strains with G2P[6] and G8P[1] Specificities. *J. Clin. Microbiol.* 39:3969-3975.

American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases. 1998. Prevention of Rotavirus Disease: Guidelines for Use of Rotavirus Vaccine. *Pediatrics.*102:1483–1491

Arias, C. F., S. López, J. D. Mascarenhas, P. Romero, P. Cano, Y. B. Gabbay, R. B. de Freitas, and A. C. Linhares. 1994. Neutralizing Antibody Immune Response in Children with Primary and Secondary Rotavirus Infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:89-94

Arista, S., E. Vizzi, C. Alaimo, D. Palermo, and A. Cascio. 1999. Identification of Human Rotavirus Strain with the P [14] Genotype by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37:2706-2708.

Beards, G., J. N. Pilford, M. E. Thouless, and T. H. Flewett. 1980. Rotavirus Serotype by Serum Neutralization. *J. Med. Virol.*

Beards, G. M. 1982. Polymorphism of Genomic RNAs Within Rotavirus Serotypes and Subgroups. *Arch. Virol.* 75:65-70.

Bern, C., J. Martines, I. de Zoysa, R.I. Glass. 1992. The Magnitude of the Global Problem of Diarrhea Disease: A Ten year update. *Bull World Health Organ.* 70:705–714

Bernstein, D. I., V. E. Smith, D. S. Sander, K. A. Pax, G. M. Schiff, and R. L. Ward. 1990. Evaluation of WC3 Rotavirus Vaccine and Correlates of Protection in Healthy Infants. *J. Infect. Dis.* 162:1055–1062.

Bernstein, D. I., R. I. Glass, G. Rodgers, B. L. Davidson, and D. A. Sack. 1995. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *JAMA.* 273: 1191 - 1196.

Bishop, R. F. 1973. Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa from Children with Acute Non-bacterial Gastroenteritis. *Lancet.* 1:1281-3

Bonsdorf, C. H. V., and L. Svensson. 1988. Human Serogroup C Rotavirus in Finland. *Scand. J. Infect. Dis.* 20:475–478.

Bresee, J. S., R. I. Glass, B. Ivanoff, and J. R. Gentsch. 1999. Current Status and Future Priorities for Rotavirus Vaccine Development, Evaluation and Implementation in Developing Countries. *Vaccine* 17:2207–2222.

- Bridger, J. C. 1994. A Definition of Bovine Rotavirus Virulence J. Gen. Virol. 75: 2807 - 2812.
- Brussow, H., I. Walther, V. Fryder, J. Sidoti, and A. Bruttin. 1988. Cross-neutralizing Antibodies Induced by Single Serotype Vaccination of Cows with Rotavirus J. Gen. Virol. 69: 1647 - 1658
- Brussow, H., P. A. Offit, and J. Sidoti. 1991. Neutralizing Antibodies to Heterologous Animal Rotavirus Serotypes 5, 6, 7 and 10 in Sera from Ecuadorian Children. J. Clin. Microbiol. 29:869-873.
- Butz, A. M., P. Fosarelli, J. Dick, T. Cusack, R. Yolken. 1993. Prevalence of Rotavirus on High-risk Fomites in Day-care Facilities. Pediatrics. 92:202-5.
- Centers for Diseases Control and Prevention. 1999. Rotavirus Vaccine for the Prevention of Rotavirus Gastroenteritis Among Children: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Morb Mortal Wkly Rep.48:1-23
- Chan, W.-K., M. E. Penaranda, S. E. Crawford, and M. K. Estes. 1986. Two Glycoproteins are Produced from the Rotavirus Neutralization Gene. Virology 151:243-252.
- Chang, H-G. H., P.F. Smith, J. Ackelsberg, D. L. Morse, and R. I. Glass. 2001. Intussusception, Rotavirus Diarrhea, and Rotavirus Vaccine Use Among Children in New York State Pediatrics. 108: 54 - 60.
- Chasey, D. 1977. Different Particle Types in Tissue Culture and Intestinal Epithelium Infected with Rotavirus. J. Gen. Virol. 37:443-451.
- Choi, A. H. C., M. Basu, M. M. Mcneal, J. Flint, J. I. Vancott, J. D. Clements, and R.I. Ward. 2000. Functional Mapping of Protective Domains and Epitopes in the Rotavirus VP6 Protein. J. Clin. Microbiol. 74: 11574-11580
- Ciarlet, M., Y. Hoshino, and F. Liprandi. 1997. Single Point Mutations May Affect the Serotype Reactivity of Serotype G11 Porcine Rotavirus Strains: a Widening Spectrum? J. Virol. 1997 71: 8213-8220.
- Ciarlet, M., J. E. L. M. Iturriza-Gómara, F. Liprandi, J. J. Gray, U. Desselberger, and M. K. Estes. 2002. Initial Interaction of Rotavirus Strains with *N*-Acetylneuraminic (Sialic) Acid Residues on the Cell Surface Correlates with VP4 Genotype, Not Species of Origin. J. Virol. 76: 4087-4095
- Clark, H. F., F. E. Borian, and S. A. Plotkin. 1990. Immune Protection of Infants Against Rotavirus Gastroenteritis by a Serotype 1 Reassortant of Bovine Rotavirus WC3. J. Infect. Dis. 161:1099-1104.



- Contreras, J. F., G. E. Menchaca, L. Padilla-Noriega, R. S. Tamez, H.B. Greenberg, S. Lopez, and C. F. Arias. 1995. Heterogeneity of VP4 Neutralization Epitopes among Serotype P1A Human Rotavirus Strains. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2:506-508.
- Cook, S. M., R. I. Glass, C. W. LeBaron, M-S. Ho. 1990. Global Seasonality of Rotavirus Infections. *Bull World Health Organ.* 68:171-177
- Coulson, B., L. E. Unicomb, G. A. Pitson, and R. F. Bishop. 1987. Simple and Specific Enzyme Immunoassay Using Monoclonal Antibodies for Serotyping Rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 25:509-515
- Coulson, B., and C. Kirkwood. 1991. Relation of VP7 Amino Acid Sequence to Monoclonal Antibody Neutralization of Rotavirus Monotype. *J. Virol.* 65:5968-5974.
- Coulson, B. S. 1993. Typing of Human Rotavirus VP4 by an Enzyme Immunoassay Using Monoclonal Antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31:1-8.
- Coulson, B. S., C. D. Kirkwood, P. J. Masendycz, R. F. Bishop. And G. Gerna. 1996. Amino Acids Involved in Distinguishing between Monotypes of Rotavirus G Serotypes 2 and 4. *J. Gen. Virol.* 77:239-245.
- Crawford, M., K. Estes, M. Charlet, Ch. Barone, Ch. M. O'Neal, J. Cohen, and M. E. Conner. 1999. Heterotypic Protection and Induction of a Broad Heterotypic Neutralization Response by Rotavirus-Like Particles. *Journal of Virology.* 73:4813-4822.
- Crawford, S.E., Sh. K. Mukherjee, M. K. Estes, J. A. Lawton, A. I. Shaw, R. F. Ramig, and B. V. V. Prasad. 2001. Trypsin Cleavage Stabilizes the Rotavirus VP4 Spike *Journal of Virology.* 75:6052-6061
- Cuadras, M. A., E. Méndez, and C. F. Arias. 1998. A New Cysteine in Rotavirus VP4 Participates in the Formation of an Alternate Disulfide Bond. *J. Clin. Microbiol.* 79:2673-2677.
- Cunliffe, N. A., J. S. Gondwe, S. M. Graham, B. D. Thindwa, W. Dove, R. L. Broadhead, M. E. Molyneux, and C. A. Hart. 2001. Rotavirus Strain Diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 39:836-843.
- Desselberger, U. 1996. Genome Rearrangements of Rotaviruses. *Adv. Virus Res.* 46:69-95.
- Diwakarla, Ch. S., and E. A. Palombo. 1999. Genetic and Antigenic Variation of Capsid Protein VP7 of Serotype G1 Human Rotavirus isolated. *J. Gen Virol.* 80:341-344.

- Delem, A., M. Lobmann, and N. Zygraich. 1984. A Bovine Rotavirus Developed as a Candidate Vaccine for Use in Humans. *J. Biol. Stand.* 12:443–445.
- DeMol, P., G. Zissis, J.-P. Butzler, A. Mutwewingabo, and F. E. Andre'. 1986. Failure of Live Attenuated Oral Rotavirus Vaccine. *Lancet* ii:108.
- Dunn, S. J., R. L. Ward, M. M. McNeal, T. L. Cross, and H. B. Greenberg. 1993. Identification of a New Neutralization Epitope on VP7 of Human Serotype 2 Rotavirus and Evidence for Electropherotype Differences Caused by Single Nucleotide Substitution. *Virology.* 197:397–404
- Dyall-Smith, M. L., I. Lazdins, G. W. Tregear, and Holmes. 1986. Location of the Major Antigenic Sites Involved in Rotavirus Serotype-Specific Neutralization. *Proceeding of the National Academy Science. USA.* 83:3465-3468
- Emeny, R.T., J. R. Herron, L. F. Xi, L. A. Koutsky, N. B. Kiviat, and C. M. Wheeler. 1999. Comparison of Variant-Specific Hybridization and Single-Strand Conformational Polymorphism Methods for Detection of Mixed Human Papillomavirus Type 16 Variant Infections. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3627-3633.
- Esparza, J., M. Gorziglia, F. Gil, and H. Römer. 1980. Multiplication of Human Rotavirus in Cultured Cells: an Electron Microscopic study. *J. Gen. Virol.* 47:461-472
- Estes, M. K., and J. Cohen. 1989. Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiol. Rev.* 53:410-449
- Estes, M. K. 1996. Rotaviruses and their replication, p. 731–761. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fundamental virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Fischer, T. K., H. Steinsland, K. Mølbak, R. Ca, J. R. Gentsch, P. Valentiner-Branth, P. Aaby, and H. Sommerfelt. 2000. Genotype Profiles of Rotavirus Strains from Children in a Suburban Community in Guinea-Bissau, Western Africa *J. Clin. Microbiol.* 2000 38: 264-267.
- Fischer, T. K., P. Valentiner-Branth, H. steinsland, M. Perch, G. Santos, P. Aaby, K. Mølbak, and H. Sommerfelt. 2002. Protective Immunity after Natural Rotavirus Infection: a Community Cohort Study of Newborn Children in Guinea-bissau, West Africa *the Journal of Infectious Diseases.* 186:593-597
- Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, J. C. Bridger, J. M. Derrick. 1974. Relation between Viruses from Acute Gastroenteritis of Children and Newborn Calves. *The Lancet.* 61-63.
- Flores, J., K. Midhtun, Y. Hocino, K. Green, M. Gorziglia, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1986. Conservation of the Fourth Gene among Rotavirus Recovered

from Asymptomatic Newborn Infants and its Possible Role in Attenuation. *Journal of Virology*. 60: 972-979.

Flores, J., I. Perez-Schael, M. Blanco, L. White, D. Garcia, M. Vilar, W. Cunto, R. Gonzalez, C. Urbina, J. Boher, M. Mendez, and A. Z. Kapikian. 1990. Comparison of Reactogenicity and Antigenicity of M37 Rotavirus Vaccine and Rhesus-rotavirus-based Quadrivalent Vaccine. *Lancet* 336:330-334.

Franco, M. A., and H. B. Greenberg. 2000. Immunity to Homologous Rotavirus Infection in Adult Mice. Elsevier Science

Frühwirth, M., S. Brösl, H. Ellemunter, I. Moll-Schüler, A. Rohwedder, and I. Mutz. 2000. Distribution of Rotavirus VP4 Genotypes and VP7 Serotypes among Nonhospitalized and Hospitalized Patients with Gastroenteritis and Patients with Nosocomially Acquired Gastroenteritis in Austria *J. Clin. Microbiol.* 38: 1804-1806.

Frühwirth, M., W. Karmaus, I. Moll-Schüler, S. Brösl, and I. Mutz. 2001. A Prospective Evaluation of Community Acquired Gastroenteritis in Pediatric Practices: Impact and Disease Burden of Rotavirus Infection *Arch. Dis. Child.* 84:393 - 397

Fuentes-Pananá, E., S. López, M. Gorziglia, and C. F. Arias. 1995. Mapping the Hemagglutination Domain of Rotaviruses. *Journal of Virology*. 69:2629-2632.

Gault, E., R. Chikhi-Brachet, S. Delon, N. Schnepe, P. Begue, and A. Garbarg-Chenon. 1999. Distribution of Human Rotavirus G Types Circulating in Paris, France, During the 1997-1998 Epidemic: High Prevalence of Type G4.. *J. Clin. Microbiol.* 37:2393-2375.

Gault, E., N. Schnepf, D. Poncet, A. Servant, S. Teran, and A. Garbarg-Chenon 2001. A Human Rotavirus with Rearranged Genes 7 and 11 Encodes a Modified NSP3 Protein and Suggests an Additional Mechanism for Gene Rearrangement *Journal of Virology* 75:7305-7314

Gentsch, J. R., R. I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, V. K. Das. And M. K. Bhan. 1992. Identification of Group A Rotavirus gene 4 Types by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:1365-1373.

Gentsch, J. R., P. Woods, M. Ramachandran, B. K. Das, J. P. Leite, A. Alfieri, R. Kumar, M. K. Bhan, and R. I. Glass. 1996. Review of G and P Typing Results from a Global Collection of Rotavirus Strains: Implications for Vaccine Development. *J. Infect. Dis.* 174:30-36.

Glass, R.I., P. E. Kilgore, R.C. Holman. 1996. The Epidemiology of Rotavirus Diarrhea in the United States: Surveillance and Estimates of Disease Burden. *J Infect Dis.*174:S5-11.

- Ghosh, S. K., and T. N. Naik. 1989. Detection of a Large Number of Subgroup 1 Human Rotaviruses with a "Long" RNA Electropherotype. *Arch. Virol.* 105:119-127.
- Gorrell, R. J., and R. F. Bishop. 1997. Production of Reassortant Viruses Containing Human Rotavirus VP4 and SA11 VP7 for Measuring Neutralizing Antibody Following Natural Infection *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:509 – 514
- Gorziglia, M., K. Green, K. Nishikawa, K. Taniguchi, R. Jones, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1988. Sequence of the Fourth Gene of Human Rotaviruses Recovered from Asymptomatic or Symptomatic Infections. *Journal of Virology.* 62:2978-2984.
- Gorziglia, M., K. Nishikawa, Y. Hoshino, and K. Taniguchi. 1990. Similarity of the Outer Capsid Protein VP4 of the Gottfried Strain of Porcine Rotavirus to That of Asymptomatic Human Rotavirus Strain. *Journal of Virology.* 64:414-418.
- Green, K. Y., K. Taniguchi, E. R. Mackow, and A. Z. Kapikian. 1990. Homotypic and Heterotypic Epitope-specific Antibody Responses in Adult and Infant Rotavirus Vaccinees: Implications for Vaccine Development. *J. Infect. Dis.* 161:667–679.
- Greenberg, H. B., J. Valdesuso, K. van Wyke, K. Midthun, H. Walsh, V. McAuliffe, R. G. Wyatt, A. R. Kalica, J. Flores, and Y. Hoshino. 1983. Production and Preliminary Characterization of Monoclonal Antibodies Directed at Two Surface Proteins of Rhesus Rotavirus. *J. Virol.* 47:267–275.
- Herring, A. J., N. F. Inglis, C. K. Ojeh, D. R. Snodgrass, and J. D. Menzies. 1982. Rapid Diagnosis of Rotavirus Infections by Direct Detection of Viral Nucleic Acid in Silver Stained Polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16:473-477
- Himagawa, H., T. Tanaka, K. Sekiguchi, F. Fukunaga, T. Anzai, N. Minamoto, and M. Kamada. 1993. Electropherotypes, Serotypes and Subgroups of Equine Rotaviruses Isolated in Japan. *Arch. Virol.* 131:169-176.
- Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1985. Independent Segregation of Two Antigenic Specificities (VP3 and VP7) Involved in Neutralization of Rotavirus Infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8701–8704.
- Hoshino, Y., K. Nishicawa, D. A. Benfield, and M. Gorziglia. 1994. Mapping of Antigenic Sites Involved in Serotype-Cross-Reactive Neutralization of Group A Rotavirus Outer Capsid Glycoprotein VP7. *Virology.* 199:233-237.
- Hoshino, Y., and A. Z. Kapikian. 1994. Rotavirus Antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 185:179–227.

Huang, J.-A., H.S. Nagesha, and I. H. Holmes. 1993. Comparative Sequence Analysis of VP4s from Five Australian Porcine Rotaviruses: Implication of an Apparent New Type. *Virology*. 196:319-327.

Hussein, H. A., A. V. Parwani, B. I. Rosen, A. Lucchelli, and L. J Saif. 1993. Detection of Rotavirus Serotypes G1, G2, G3, and G11 in Feces of Diarrheic Calves by Using Polymerase Chain Reaction-derived cDNA Probes *J. Clin. Microbiol.* 31: 2491-2496.

Hwa-Gan, H., C. Perry, F. Smith, J. Ackelsberg, D. L. Morse, and R. I. Glass. 2001. Intussusception, Rotavirus Diarrhea, and Rotavirus Vaccine Use Among Children in New York State Pediatrics. 108: 54-60.

Imai, M., K. Akatani, N. Ikegami, and Y. Furuichi. 1983. Capped and Conserved Terminal Structures in Human Rotavirus Double-stranded RNA Segments. *J. Virol.* 47:125-136.

Institute of Medicine. 1986. *New Vaccine Development: Establishing Priorities; Volume II, Diseases of Importance in Developing Countries.* Washington, DC: National Academy Press.

Iturriza-Gómara, M., D. Cubitt, U. Desselberger, and J. Gray. 2001. Amino Acid Substitution within the VP7 Protein of G2 Rotavirus Strains Associated with Failure To Serotype *J. Clin. Microbiol.* 39:3796-3798.

James, V. L., P. R. Lambden, E. O. Caul, S. J. Cooke, and I. N. Clarke. 1997. Seroepidemiology of Human Group C Rotaviruses in the UK. *J. Med. Virol.* 52:86-91.

Jiang, B., P. H. Dennehy, S. Spangenberg, J. R. Gentsch, and R. I. Glass. 1995. First Detection of Group C Rotavirus in Fecal Specimens of Children with Diarrhea in the United States. *J. Infect. Dis.* 172:45-50.

Joensuu, J., E. Koskenniemi, X. L. Pang, T. Vesikari, 1997. Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet.* 350:1205-9.

Kapikian, A. Z., J. Flores, Y. Hoshino, M. Gorziglia, K. Nishuikawa, R. M. Chanock and Perez-Schael. 1988. Prospects for Development of a Rotavirus Vaccine against Rotavirus Diarrhoea by a Jennerian and a Modified Jennerian Strategy. P. 217-239. In S.R. Norrby, J. Mills, E. Norrby, and L.J. Withon (ed.) *New Antiviral Strategies.* Churchill Livingstone. New York.

Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock. 1996. Rotaviruses, p. 1657-1708. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, *et al.* (ed.), *Fields virology.* Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.

- Kohli, E., L. Maurice, J. F. Vautherot, C. Bourgeois, J. B. Bour, J. Cohen and P. Pothier. 1992. Localization of Group-specific Epitopes on the Major Capsid Protein of Group A Rotavirus. *Journal of General Virology*. 73: 907-914
- Lanata, C. F., R. E. Black, B. Burton, K. Midthun, and B. Davidson. 1992. Safety, Immunogenicity, and Efficacy of One or Three Doses of the Rhesus Tetravalent Rotavirus Vaccine in Lima, Peru. *Vaccine* 10:273. (Abstract.)
- Larralde, G., B. Li, A. Z. Kapikian, and M. Gorziglia. 1991. Serotype-Specific Epitope (s) Present on the VP8 Subunit of Rotavirus VP4 Protein. *Journal of Virology*. 65:3213-3218.
- Larralde, G., and M. Gorziglia. 1992. Distribution of Conserved and Specific Epitopes on the VP8 Subunit of Rotavirus VP4. *J. Virol.* 66: 7438 – 7443
- Lawton, J. A., M. K. Estes, and B. V. V. Prasad. 1997. Three-dimensional Visualization of mRNA Release from Actively Transcribing Rotavirus Particles. *Nat. Struct. Biol.* 4:118–121
- Lawton, J. A., M. K. Estes, and B. V. V. Prasad. 1999. Comparative Structural Analysis of Transcriptionally Competent and Incompetent Rotavirus-Antibody Complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:5428-5433.
- Lazdins, I., B. S. Coulson, C. Kirkwood, M. Dyall-Smith, P. Masendycz, S. Sonza, and I. H. Holmes. 1995. Rotavirus Antigenicity is Affected by the Genetic Context and Glycosylation of VP7. *Virology*. 209:80-89
- Lewis, H. M., J. V. Parry, H. A. Davies, R. P. Parry, A. Mott, R. R. Dourmashkin, P. J. Sanderson, D. A. Tyrrell, and H.B. Valman. 1979. A Year's Experience of the Rotavirus Syndrome and its Association with Respiratory Illness *Arch. Dis. Child.* 54:339 - 346.
- Li, B., H. F. Clark, and V. Gouvea. 1993. Nucleotide Sequence of the VP4-Encoding Gene of an Unusal Human Rotavirus (HCR3). *Virology*. 196:825-830.
- Liprandi, F., I. Rodriguez, C. Pia, G. Larralde, and M. Gorziglia. 1991. VP4 Monotypes Specificities among Porcine Rotavirus. Strains of the Same VP4 Serotype. *Journal of Virology*. 65:1658-1661.
- Ludert, J. E., A. A. Krishnaney, J. W. Burns, P. T. Vo, and H. B. Greenberg. 1996. Cleavage of Rotavirus VP4 *in vivo*. *J. Gen. Virol.* 77:391-395.
- Ludert, J. E., B. B. Mason, J. angel, B. Tang, Y. Hoshino, N. Feng, P. T. Vo, E. M. Mackow, F. M. Ruggeri, and H. B. Greenberg. 1998. Identification of Mutations in the Rotavirus Protein VP4 that Alter Sialic-acid-dependent Infection *J. Gen. Virol.* 79:725-729

- Mackow, E. R., J. W. Barnett, H. Chan, and H. B. Greenberg. 1989. The Rhesus Rotavirus Outer Capsid Protein VP4 Functions as a Hemagglutinin and is Antigenically Conserved when Expressed by a baculovirus Recombinant. *J. Virol.* 63:1661-1668
- Madore, H. P., C. Christy, M. Pichichero, C. Long, P. Pincus, D. Vosefsky, A. Z. Kapikian, R. Dolin, and the Elmwood, Panorama, and Westfall Pediatric Groups. 1992. Field trial of Rhesus Rotavirus or Human-rhesus Reassortant Vaccine of VP7 Serotype 3 or 1 Specificity in Infants. *J. Infect. Dis.* 166:235-243.
- Masendycz, P.J., E. A. Palombo, R. J. Gorrel, and R. F. Bishop. 1997. Comparison of Enzyme Immunoassay, PCR, and Type-Specific cDNA Probe Techniques for Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types (4 Types). *J. Clin. Microbiol.* 35:3104-3108.
- Mattion, N. M., J. Cohen, and M. K. Estes. 1994. The Rotavirus Proteins, p. 169-249. *In* A. Z. Kapikian (ed.), *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Matson, D.O., M.K. Estes. 1990. Impact of Rotavirus Infection at a Large Pediatric Hospital. *J Infect Dis.* 162:598-604.
- Matson, D. O., M. L. O’Ryan, L. K. Pickering, S. Ciba, S. Nakata, P. Raj, and M. K. Estes. 1992. Characterization of Serum Antibody Responses to Natural Rotavirus Infections in Children by VP7-Specific Epitope-Blocking Assay. *J. Clin. Microbiol.* 30:1056-1061.
- Maunula, L., and Carl-Henrik von Bonsdorff 2002. Frequent Reassortments May Explain the Genetic Heterogeneity of Rotaviruses: Analysis of Finnish Rotavirus Strains. *Journal of Virology.* 76:11793-11800
- Mayrand, M. H., F. Coutlée, C. Hankins, N. Lapointe, P. Forest, M. de Ladurantaye, The Canadian Women's HIV Study Group, and M. Roger. 2000. Detection of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Consecutive Genital Samples Does Not Always Represent Persistent Infection as Determined by Molecular Variant Analysis *J. Clin. Microbiol.* 38:3388-3393.
- McNeal, M. M., J. L. VanCott, A. H. C. Choi, M. Basu, J. A. Flint, S. C. Stone, J. D. Clements, and R. L. Ward. 2002. CD4 T Cells Are the Only Lymphocytes Needed To Protect Mice against Rotavirus Shedding after Intranasal Immunization with a Chimeric VP6 Protein and the Adjuvant LT(R192G) *J. Virol.* 76: 560-568.
- Menchaca, G., L. Padilla-Noriega, M. Méndez-Toss, J. F. Contreras, F.I. Puerto, H. Guiscafré, F. Mota, I.I Herrera, R. Cedillo, O. Muñoz, R. Ward, Y. Hoshino, S. López, and C. F. Arias. 1998. Serotype Specificity of the Neutralizing-Antibody Response Induced by the Individual Surface Proteins of Rotavirus in Natural Infections of Young Children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:328-334.

- Mendez, E., C. F. Arias, and S. Lopez. 1992. Genomic Rearrangements in Human Rotavirus Strain Wa; Analysis of Rearranged RNA Segment 7. *Arch. Virol.* 125:331–338.
- Midthun, K., and A. Kapikian. 1996. Rotavirus Vaccines: an overview. *Clinical Microbiology Reviews.* 9: 423–434
- Murphy T. V., P.M. Gargiullo, M.S. Massoudi. 2001. Intussusception Among Infants Given an Oral Rotavirus Vaccine. *N. Engl J Med.* 344:564–572
- Nakagomi, O., M. Mochizuki, Y. Aboudy, I. Shif, I. Silberstein, and T. Nakagomi . 1992. Hemagglutination by a Human Rotavirus Isolate as Evidence for Transmission of Animal Rotaviruses to Humans *J. Clin. Microbiol.* 30:1011-1013
- Newman, R., J. Grupp-Phelan, D. Shay, R. Davis. 1999. Perinatal Risk Factors for Infant Hospitalization with Viral Gastroenteritis {Abstract}. *Pediatrics.*103:1.
- Offit, P. A., H. F. Clark, G. Blavat, and H. B. Greenberg. 1986. Reassortant Rotaviruses Containing Structural Proteins VP3 and VP7 from Different Parents Induce Antibodies Protective Against each Parental Serotype. *J. Virol.* 60:491–496.
- O'Halloran, F., M. Lynch, B. Cryan, H. O'Shea, and S. Fanning. 2000. Molecular Characterization of Rotavirus in Ireland: Detection of Novel Strains Circulating in the Population. *J. Clin. Microbiol.* 38:3370–3374.
- Padilla-Noriega, L., C. F. Arias, S. Lopez, F. Puerto, D. R. Snodgrass, K. Taniguchi and H. B. Greenberg. 1990. Diversity of Rotavirus Serotypes in Mexican Infants with Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 28:1114-1119.
- Padilla-Noriega, L. R. Werner-Eckert, E. R. Makow, M. Gorziglia, G. Larralde, K. Taniguchi, and H. Greenberg. 1993. Serologic Analysis of Human Rotavirus Serotypes P1A and P2 Using Monoclonal Antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31(3):622-628.
- Padilla-Noriega, L. M. Méndez-Toss, G. Menchaca, J. F. Contreras, P. Romero-Guido, F. I. Puerto, H. Guiscafré, F. Mota, I. Herrera, R. Cedillo, O. Muñoz, J. Calva, M. de L. Guerrero, B. S. Coulson, H. B. Greenberg, S. López, and C. F. Arias. 1998. Antigenic and Genomic Diversity of Human Rotavirus VP4 in Two Consecutive Epidemic Seasons in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 36:1688-1692.
- Palombo, E. A., H. C. Bugg, P. J. Masendycz, B. S. Coulson, G. L. Barnes, and R. F. Bishop. 1996. Multiple-gene Rotavirus Reassortants Responsible for an Outbreak of Gastroenteritis in Central and Northern Australia *J. Gen. Virol.* 77: 1223-1227.



Palombo, E. A., R. Clark, and R. F. Bishop. 2000. Characterisation of a European-like Serotype G8 Human Rotavirus Isolated in Australia. *J. Med. Virol.* 60:56–62.

Parashar U. D., P. E. Kilgore, R. C. Holman, M. J. Clarke, J. S. Bresee, R. I. Glass. 1998. Diarrheal Mortality in US Infants: Influence of Birth Weight on Risk Factors for Death. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 152:47–51

Patton, J. T., J. Hua, and E. A. Mansell. 1993. Location of Intrachain Disulfide Bonds in the VP5 and VP8 Trypsin Cleavage Fragments of the Rhesus Rotavirus Spike Protein VP4. *Journal of Virology.* 67:4848–4855.

Patton, J. T. 1995. Structure and Function of the Rotavirus RNA-bindingproteins. *J. Gen. Virol.* 76:2633–2644.

Patton, J. T., Z. Taraporewala, D. Chen, V. Chizhikov, M. Jones, A. Elhelu, M. Collins, K. Kearney, M. Wagner, Y. Hoshino, and V. Gouvea 2001. Effect of Intragenic Rearrangement and Changes in the 3' Consensus Sequence on NSP1 Expression and Rotavirus Replication *J. Virol.* 75:2076 - 2086.

Pérez, M. S., K. Perrin, D. Scardino, and R. E. Bégúé. 2002. Evaluation of Rotavirus Vaccine Effectiveness in a Pediatric Group Practice *Am. J. Epidemiol.* 156: 1049 - 1055.

Perez-Schael, I., M. Blanco, M. Vilar, D. Garcia, L. White, R. Gonzalez, A. Z. Kapikian, and J. Flores. 1990. Clinical Studies of a Quadrivalent Rotavirus Vaccine in Venezuelan infants. *J. Clin. Microbiol.* 28:553–558.

Pérez-Schael, I., M. J. Guntiñas, M. P. Vito Pagone, A. M. Rojas, R. González, W. Cunto, Y. Hoshino, and Albert Z. Kapikian. 1997. Efficacy of the Rhesus Rotavirus-Based Quadrivalent Vaccine in Infants and Young Children in Venezuela *N. Engl. J. Med.* 337: 1181 - 1187.

Prasad, B. V. V., R. Rothngel, C. Q. Y. Zeng, J. Jakana, J. A. Lawton, W. Chiu, M. K. Estes. 1996. Visualization of Ordered Genomic RNA and Localization of Transcriptional Complexes in Rotavirus. *Nature.* 382:471–473

Prasad, B. V. V., and M. K. Estes. 1997. Molecular Basis of Rotavirus Replication: Structure-function Correlations, p. 239–278. In W. Chiu, M. Burnett, and R. Garcea (ed.), *Structural Biology of Viruses*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Rennels, M. B. R. I. Glass, P. H Dennehy, D. I. Bernstein, M. E Pichichero, E. T. Zito, M. E. Mack, B. L. Davidson, and A. Z. Kapikian. 1996. Safety and Efficacy of High-dose Rhesus-human Reassortant Rotavirus Vaccines--report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group *Pediatrics.* 97:7-13.

Richardson, S. C., K. Grimwood, and R. F. Bishop. 1993. Analysis of homotypic and heterotypic serum immune responses to rotavirus proteins following primary rotavirus infection by using the radioimmunoprecipitation technique. *J. Clin. Microbiol.* 1993 31: 377-385

Rodriguez, W. J., H. W. Kim, C. D. Brandt. 1980. Rotavirus Gastroenteritis in the Washington, DC, Area: Incidence of Cases Resulting in Admission to the Hospital. *Am. J. Dis. Child.* 134:777-9.

Rodriguez W. J., H. W. Kim, C. D. Brandt. 1987. Longitudinal Study of Rotavirus Infection and Gastroenteritis in Families Served by a Pediatric Medical Practice: Clinical and Epidemiologic Observations. *Pediatr. Infect Dis. J.* 6:170-6.

Santos, N., M. Riepenhoff-Talty, H. F. Clark, P. Offit, and V. Gouvea. 1994. VP4 Genotyping of Human Rotavirus in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 32:205-208

Santos, N., R. C. Lima, C. F. Pereira, and V. Gouvea. 1998. Detection of Rotavirus Types G8 and G10 among Brazilian Children with Diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 36:2727-2729.

Santos, N., R. C. C. Lima, C. M. Nozawa, R. E. Linhares, and V. Gouvea. 1999. Detection of Porcine Rotavirus Type G9 and of a Mixture of Types G1 and G5 Associated with Wa-Like VP4 Specificity: Evidence for Natural Human-Porcine Genetic Reassortment. *J. Clin. Microbiol.* 37:2734-2736.

Santosham M, R. H. Yolken, R. G. Wyatt. 1985. Epidemiology of Rotavirus Diarrhea in a Prospectively Monitored American Indian population. *J Infect Dis*;152:778-83.

Santosham M, L.H. Moulton, R. Reid, J. Croll, R. Weatherbolt, R. Ward. 1997. Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in native American populations. *J. Pediatr.* 131:632-638.

Scrimshaw N. S., Weanling Diarrhoea - a Synergism of Infection and Nutrition. *Interactions of Nutrition and Infection. WHO Monogram Ser. No 57: 216-261*

Sereno, M. M., and M. I. Gorziglia. 1994. The Outer Capsid Protein VP4 of Murine Rotavirus Strain Eb Represents a Tentative New P Type. *Virology.* 199:500-504.

Sekiya, T. 1993. Detection of Mutant Sequences by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Mutant. Res.* 288:79-83

Sereno, M.M., and M. I. Gorziglia. 1994. The Outer Capsid Protein VP4 of Murine Rotavirus Strain Eb Represents a Tentative New P Type. *Virology* 199:500-504

Shaw, R. D., P. T. Vo, P. A. Offit, B. S. Coulson, and H. B. Greenberg. 1986. Antigenic Mapping of the Surface Proteins of Rhesus Rotavirus. *Virology.* 155:433-451

- Shaw, R. D., K. J. Fong, G. A. Losonsky, M. M. Levine, Y. Maldonado, R. Yolken, J. Flores, A. Z. Kapikian, P. T. Vo, and H. B. Greenberg. 1987. Epitope-Specific Immune Response to Rotavirus Vaccination. *Gastroenterology*. 93:941-950.
- Shaw, A. I., R. Rothnagel, C. Q.-Y. Zeng, J. A. Lawton, R. F. Raming, M. K. Estes, and B. V. V. Prasad. 1996. Rotavirus Structure: Interactions between the structural Proteins. *Arch. Virol. [Suppl]* 12:21-27.
- Staat, M. A., P. H. Azimi, T. Berke, N. Roberts, D. I. Bernstein, R. I. Ward, L. K. Pickering, D. O. Matson. 2002. Clinical Presentations of Rotavirus Infection Among Hospitalized Children. *Pediatr Infect Dis J*. 21:221-227
- Steele, A. D., M. C. Van Niekerk, and M. J. Mphahlele. 1995. Geographic Distribution of Human Rotavirus VP4 Genotypes and VP7 Serotypes in Five South African Regions. *J. Clin. Microbiol.* 33:1516-1519.
- Steele, A. D., and V. I. A. James. 1999 Seroepidemiology of Human Group C Rotavirus in South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 4142–4144
- Svensson, L. 1992. Group C Rotavirus Requires Sialic acid for Erythrocyte and Cell Receptor Binding. *J. Virol.* 66: 5582-5585.
- Taniguchi, K., Y. Morita, T. Urasawa, and Sh. Urasawa. 1987. Cross-Reactive Neutralization Epitopes on VP3 of Human Rotavirus: Analysis with Monoclonal Antibodies and Antigenic Variants. *Journal of Clinical Microbiol.* 61: 1726-1730.
- Taniguchi, K., W. L. Maloy, K. Y. Green, Y. Hoshino, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanok, and M. Gorziglia. 1988. Identification of Cross-Reactive and Serotype 2-Specific Neutralization Epitopes on VP3 of Human Rotavirus. *J. Virol.* 62:2421-2426
- Taniguchi, K., T. Urasawa, N. Kobayashi, M. Gorziglia, and Sh. Urasawa. 1990. Nucleotide Sequence of VP4 and VP7 Genes of Human Rotaviruses with Subgroup I Specificity and Long RNA Pattern: Implication for New G Serotype Specificity. *Journal of Virology*. 64:5640-5644.
- Taniguchi, K., K. Nishikawa, N. Kobayashi, T. Urasawa, H. Wu, M. Gorziglia, and Sh. Urasawa. 1994. Differences in Plaque Size and VP4 Sequences Found in SA11 Virus Clones Having Simian Authentic VP4. *Virology*. 198:325-330.
- Tomkins A. M. 1981. Nutritional Status and Severity of Diarrhea Among Pre-school Children in Rural Nigeria. *The Lancet*, April 18 : 860-862
- Trabelsi, A., I. Peenze, C. Pager, M. Jeddi, and D. Steele. 2000. Distribution of Rotavirus VP7 Serotypes and VP4 Genotypes Circulating in Sousse, Tunisia, from 1995 to 1999: Emergence of Natural Human Reassortants. *J. Clin. Microbiol.* 2000 38: 3415-3419

Tsunemitsu, H., B. Jiang, and L. J. Saif. 1992. Detection of Group C Rotavirus Antigens and Antibodies in Animals and Humans by Enzyme-linked Immunosorbent Assays *J. Clin. Microbiol.* 30:2129 - 2134

Tucker, A. W., A. C. Haddix, J. S. Bresee, R. C. Holman, U. D. Parashar, R. I. Glass. 1998. Cost-Effectiveness Analysis of a Rotavirus Immunization Program for the United States. *JAMA.* 279:1371-6.

Unicomb, L. E., B. S. Coulson, and R. F. Bishop. 1989. Experience with an Enzyme Immunoassay for Serotyping Human Group A Rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 27: 586-588.

Unicomb, L. E., G. Podder, J. R. Gentsch, P. A. Woods, K. Z. Hasan, A. S. G. Faruque, M. J. Albert, and R. I. Glass. 1999. Evidence of High-frequency Genomic Reassortment of Group A Rotavirus Strains in Bangladesh: Emergence of type G9 in 1995. *J. Clin. Microbiol.* 37:1885–1891.

Urasawa, T., K. Taniguchi, N. Kobayashi, K. Mise, A. Hasegawa, Y. Yamazi, and S. Urasawa. 1993. Nucleotide Sequence of VP4 and VP7 Genes of a Unique Human Rotavirus Strain Mc35 With Subgroup I and Serotype 10 Specificity. *Virology.* 195:766-771

Ushijima, H., K-Q. Xin, S. Nishimura, Sh. Morikawa, and T. Abe. 1994. Detection and Sequencing of Rotavirus VP7 Gene from Human Materials (Stool, Sera, Cerebrospinal Fluids, and Throat Swabs) by Reverse Transcription and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:2893-2897

Vesikari, T., T. Rautanen, T. Varis, G. M. Beards, and A. Z. Kapikian. 1990. Clinical Trial in Children Vaccinated between Two and Five Months of age. *Am. J. Dis. Child.* 144:285–289.

Vesikari, T., T. Ruuska, A. Delem, F. E. Andre<sup>o</sup>, G. M. Beards, and T. H. Flewett. 1991. Efficacy of Two Doses of RIT 4237 Bovine Rotavirus Vaccine for Prevention of Rotavirus Diarrhoea. *Acta Paediatr. Scand.* 80:173–180.

Vesikari, T. 1993. Clinical Trials of Live oral Rotavirus Vaccines: the Finnish Experience. *Vaccine* 11:255–261.

Ward, R. L., D. R. Knowlton, G. M. Schiff, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg. 1988. Relative Concentrations of Serum Neutralizing Antibody to VP3 and VP7 Proteins in Adults Infected with a Human Rotavirus. *J. Virol.* 62:1543–1549.

Ward, R. L., J. M. M. McNeal, J. D. Clemens, D. A. Sack, M. Rao, N. Huda, K. Y. Green, A. Z. Kapikian, B. Coulson, R. Bishop, H. B. Greenberg, G. Gerna, and G. M. Schiff. 1991. Reactivities of Serotyping Monoclonal Antibodies With Culture-Adapted Human Rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 29: 449-456.

Ward, R. L., M. M. McNeal, D. S. Sander, H. B. Greenberg, and D. I. Bernstein. 1993. Immunodominance of the VP4 Neutralization Protein of Rotavirus in Protective Natural Infections of Young Children. *J. Virol.* 67:464–468.

Ward, R. L., A. Z. Kapikian, K. M Goldberg, D. R Knowlton, M. W Watson, and R. Rappaport. 1996. Serum Rotavirus Neutralizing-antibody Titers Compared by Plaque Reduction and Enzyme-linked Immunosorbent Assay-based Neutralization Assays. *J. Clin. Microbiol.* 34: 983-985

Wen, L., S. Nakayama, Y. Yamanishi, o. Nishio, Z.-Y. Fang, o. Nakagomi, K. Araki, S. Nishimura, A. Hasegagua, W. E. G. Müller, and H. Ushijima. 1997. Genetic variation in the VP7 Gene of Human Rotavirus Serotype 3 (G3 Type) Isolated in China and Japan *Arch. Virol.* 142:1481-1489.

Woode, G. N., J. C. Bridger, J. M. Jones, T. H. Flewett, A. S. Bryden, H. A. Davies, and G. B. B. White. 1976. Morphological and Antigenic Relationships between Viruses (Rotaviruses) from Acute Gastroenteritis of Children, Calves, Piglets, Mice, and Foals. *Infection and Immunity.* 14:804-810.

Wang, Yu-Ming., C. R. Stuart, O. Laeyendecker, J. R. Ticehurst, and D. L. Thomas. 1998. Assessment of Hepatitis C Virus Sequence Complexity by Electrophoretic Mobilities of Both Single-and Double-Stranded DNAs *J. Clin. Microbiol.* 36: 2982-2989.

Wyatt, R. G., C. A. Mebus, R. H. Yolken, A. R. Kalica, H. D. James, Jr., A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1975. Rotaviral Immunity in Gnotobiotic calves: Heterologous Resistance to Human Virus Induced by Bovine virus. *Science* 203:548–550.

Wyatt, R. G., H. D. James, Jr., A. L. Pittman, Y. Hoshino, H. B. Greenberg, A. R. Kalica, J. Flores, and A. Z. Kapikian. 1983. Direct Isolation in Cell Culture of Human Rotaviruses and their Characterization into Four Serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 18:310-317

Zao, C. L., W. N. Yu, C. L. Kao, K. Taniguchi, C. Y. Lee, and C. N. Lee. 1999. Sequence Analysis of VP1 and VP7 Genes Suggests Occurrence of a Reassortant of G2 Rotavirus Responsible for an Epidemic of Gastroenteritis *J. Gen. Virol.* 80:1407-1415

Zissis, G., J. P. Lambert, P. Marbehant, D. Marissens, M. Lobman, P. Charlier, A. Delem, and N. Zygraich. 1983. Protection Studies in Colostrumdeprived Piglets of a Bovine Rotavirus Vaccine Candidate Using Human Rotavirus Strains for Challenge. *J. Infect. Dis.* 148:1061–1068.



