



## Caracterización Molecular de Rotavirus en la Ciudad de Santafé de Bogotá, Colombia. Determinación de Electroferotipos y Tipificación de una Cepa por RT-PCR

ADRIANA CORREA,<sup>1</sup> YOLANDA SOLARTE,<sup>1</sup> JOSÉ BARRERA,<sup>2</sup> DARIO MOGOLLÓN,<sup>3</sup> MA. FERNANDA GUTIÉRREZ<sup>1\*</sup>

*Pontificia Universidad Javeriana.<sup>1</sup> Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria.<sup>2</sup> Instituto Colombiano Agropecuario.<sup>3</sup>*

\*Autor para la correspondencia: Cra 7N. 43-82 of 111 Edif. Felix Restrepo Departamento de Microbiología, Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Tel: 57 (1) 288 37 88 ext 274. FAX: 57 (1) 2 85 05 03. E mail mfgutier@javeriana.edu.co

**ABSTRACT.** 131 diarrheic samples obtained from children taken to the emergency room of the Misericordia Hospital in Santafé de Bogotá were cultivated for rotavirus. These virus were found to be etiologic agents for the diarrhea in 42 (32%) of the patients. In order to characterize electrophoretically the rotavirus they were cultured in cell line MA-104, total RNA was extracted and subjected to electrophoresis in SDS-PAGE and then the retrotranscription polymerase chain reaction. Eight different electrophoretic patterns were found. All patterns correspond to group A. Eight positive PAGE samples and the control type RRV were cultured in cell line MA-104. Viral growth was found only in the control and four of the samples. Total RNA was extracted from all five infected cultures and gene 9, which codifies for protein VP7 was amplified. All four samples and the control were shown to be G3. The finding of eight different electrophoretic types, all of them belonging to group A, show a diversity in co-circulating rotavirus strains. These findings contribute to a better understanding of viral acute gastroenteritis natural history and should help in developing new epidemiological vigilance strategies, prevention and control of rotavirus in children population of Santafé de Bogotá.

**Key Words:** Rotavirus, RT-PCR, Electrophoretic Types.

**RESUMEN.** Con el objeto de caracterizar por electroforesis cepas de rotavirus circulantes en niños de la ciudad de Bogotá y tipificar por medio de RT-PCR, la proteína VP7 se analizaron 131 muestras diarreicas de niños que asistieron a consulta de Urgencias del Hospital de la Misericordia, en la ciudad de Bogotá. Se realizaron cultivos virales en la línea celular MA-104, electroforesis de RNA en SDS-PAGE (Electroferotipos) y RT-PCR (Retrotranscripción y reacción en cadena de polimerasa). Los rotavirus fueron detectados como agente causal en 42 (32%) de estos pacientes. Se encontraron ocho patrones electroforeticos. Las muestras analizadas presentaron un patrón correspondiente al grupo A. Ocho muestras positivas por PAGE y la cepa control RRV fueron aisladas en cultivos celulares de la línea MA-104 obteniendo crecimiento en sólo cuatro de ellas y en la cepa control. El RNA total extraído de los cinco cultivos infectados fue utilizado para amplificar el gen 9 que codifica para la proteína VP7. Con la técnica de RT-PCR se lograron tipificar cuatro cepas clínicas y una de referencia como G3. La presencia de ocho diferentes patrones electroferotípicos, todos del grupo A demuestran la diversidad electroforética de las cepas de Rotavirus co-circulantes. La metodología descrita y los resultados obtenidos, redundarán en un mayor conocimiento de la historia natural de la GEA, y contribuirán al desarrollo de estrategias de vigilancia epidemiológica, prevención y control de los rotavirus en la población infantil de Santafé de Bogotá.

**Palabras Clave:** Rotavirus, RT-PCR, Electrophoretic Types.

### INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis aguda (GEA) producida por rotavirus, es uno de los principales problemas de salud durante los primeros años de vida en los niños del mundo entero. En países en vías de desarrollo donde las condiciones de saneamiento no son las adecuadas y la contaminación orofecal es constante, se hace más difícil su control. Los estu-

dios de detección, antigenicidad y tipificación molecular se han convertido en una prioridad en el mundo. A través de estas técnicas es posible evaluar en forma más precisa la infección, la naturaleza de sus variantes y su circulación en un área determinada.

Son pocos los estudios sobre el comportamiento epidemiológico y molecular de este virus en nuestra población, algunos sólo informan la prevalencia de la enfermedad que



oscila entre un 15 y un 48%.<sup>2,22</sup> Los resultados de investigaciones reportadas por Guerrero et al. y Bermeo en 1994 realizadas con muestras diarreicas de niños de la ciudad de Bogotá, reportan cocirculación de cepas en un mismo grupo de individuos en un mismo periodo de tiempo.<sup>6,10</sup>

Caracterizar molecularmente el rotavirus es necesario para entender su patogenia y a su vez, da un conocimiento para la elaboración de la vacuna que tanto necesitan nuestros infantes.

La caracterización del rotavirus por cepas puede darse tanto por la proteína VP7, que determina el serotipo G, por la proteína VP4, que da el serotipo P, como por los cambios electroforéticos que pueden comprometer el tamaño de cualquiera de los 11 segmentos del RNA viral, lo cual se hace evidente en la electroforesis. Cada parámetro de caracterización es independiente, de tal manera que pueden encontrarse un serotipo G con cualquier serotipo P y cualquier patrón electroforético, no obstante existen asociaciones comunes como por ejemplo, G2P2 que es de patrón corto.

El concepto de cocirculación puede entenderse como la presencia de dos o mas cepas virales circulantes de manera simultanea en una misma región en un mismo periodo de tiempo.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar con técnicas de biología molecular las cepas de rotavirus encontradas utilizando para esto la electroforesis y la RT-PCR y así dar un primer paso en la serotipificación de las cepas circulantes en esta población.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de las muestras.** Para el presente estudio, 131 muestras de materia fecal fueron obtenidas de niños menores de 5 años que ingresaron a la consulta de urgencias del Hospital de la Misericordia de Santafé de Bogotá por presentar sintomatología de GEA. En la recolección de las muestras se tuvieron en cuenta datos como la edad del paciente, sexo y los resultados del examen coproscópico (pH, déficit de disacaridasas, moco, grasas).

Las muestras fueron recolectadas durante un periodo de un año entre Junio de 1995 a Junio de 1996 y fueron almacenadas a -70°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Como cepas de referencia se utilizaron la Wa, DS-1, P, W161 y 69M de origen humano y la RRV de simio, obtenidas de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta (EEUU).

**Extracción del RNA a partir de muestras de materia fecal y electroforesis en geles de poli(acrilamida).** El protocolo utilizado para la obtención del RNA, fue el de Chomczynski y Sacchi.<sup>8</sup> Para el análisis electroforético, 30 µg de RNA viral se colocaron en los geles de poli(acrilamida) en condiciones no desnaturizantes.<sup>11</sup> La electroforesis del RNA, se realizó a 120 V por 14 h en una cámara de electroforesis vertical. Los geles se tificaron con nitrato de plata<sup>7</sup> y se fotografiaron utilizando una película a color

ASA 100.<sup>18</sup>

**Detección del efecto citopático y amplificación viral.** Para el cultivo viral se utilizó la línea celular MA-104 derivada de riñón de mono rhesus obtenida de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) y del laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud. En ella se inocularon ocho muestras positivas, previamente centrifugadas para eliminar la presencia de contaminantes. Las muestras se escogieron dependiendo de la cantidad de RNA que se obtuvo. Se prepararon suspensiones de materia fecal 1:5 en medio MEM; y se trataron con 300 µl de tripsina de 20 µg/ml. Las monocapas celulares fueron lavadas con una solución tampón, posteriormente se les agregó el inóculo y se dejaron en adsorción durante 1 h a 37°C. Al finalizar se adicionaron 5 ml de medio de mantenimiento que contenía tripsina en una concentración de 1 µg/ml sin suero fetal bovino. Como control negativo se utilizó un inóculo con volúmenes iguales de MEM y tripsina de 20 µg/ml el cual se sometió al mismo procedimiento que las muestras.<sup>1,20,23</sup>

Las células inoculadas se observaron cada 24 h hasta detectar el efecto citopático. Como controles se utilizaron las cepas de referencia obtenidas de los CDC de Atlanta. Para comprobar la presencia del virus dentro del cultivo se realizó una segunda electroforesis en PAGE (coelectroforesis).

**Ensayos de purificación del RNA de rotavirus extraído de materia fecal con celulosa CF-11.** Para aumentar la pureza del RNA extraído tanto de las muestras de materia fecal como de los cultivos celulares e impedir la acción de inhibidores de la amplificación por PCR, se utilizó el protocolo descrito por Wilde.<sup>24</sup> 50 µl de RNA se diluyó en 400 µl de regulador TEN (Tris HCl 200 mM, NaCl<sub>2</sub> 1 mM, EDTA 15 mM), se adicionaron 60 µl de etanol al 95%, 30 mg de celulosa CF-11, la mezcla se homogenizó por 10 seg y agitó 90 min a 4°C. Finalizada la agitación, se centrifugó por 4 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó tres veces con solución STE (NaCl<sub>2</sub> 0.1 M, EDTA 0.001 M, Tris HCl 0.05 M pH 7.0) que contiene etanol al 15% y con la misma solución pero sin etanol para separar el RNA de la celulosa. Después de una centrifugación de 5 min, el sobrenadante se separó y precipitó con acetato de sodio 0.3 M pH 5.4 y 1 ml de etanol y refrigerado durante 1 h a -20°C. Finalizada la precipitación, se centrifugó por 20 min, el sedimento se lavó con etanol al 70%, se dejó secar a 37°C y se diluyó con 50µl de agua tratada con DEPC. El RNA obtenido fue analizado en geles de agarosa desnaturizantes.<sup>5</sup>

**Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).** El RNA fue obtenido a partir de 10 muestras positivas y 10 negativas por PAGE y del RNA total extraído de la monocapa de cultivo celular de las cepas aisladas (4 muestras de campo, la RRV de referencia y 3 negativas).<sup>3,8</sup> La técnica de RT-PCR se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Gouvea et al.<sup>9</sup>

Para seleccionar los iniciadores, fueron escogidas secuencias únicas del segmento del gen nueve de los extre-

mos 3' y 5' los cuales codifican para la glicoproteína VP7, y son altamente conservadas para todos los rotavirus del grupo A (BEG9 5' GGCTTTAAAAGAGAGAATTTC 3' y RVG9 5' GGTCACATCATAACAATTCT 3'). Para tipificar las cepas de rotavirus se sintetizaron seis iniciadores internos a partir de la cadena complementaria de regiones variables en el gen nueve 5' a 3':

Para el serotipo G8 : aAT8 GTCACACCATTGTAATTCG, {nt 178 al 198}; el serotipo G1 aBT1 CAAGTACTCA-AATCAATGATGG {nt 314 al 335}; el serotipo G2 aCT2 AATGATATTAACACAT TTTCTGTG {nt 411 al 435}; el serotipo G4 aDT4 CGTTTCTGGTGAGGAGTTG {480 al 498}; el serotipo G3 aET3 CGTTTGAAGAAGT-TGCAACAG {689 al 709}; el serotipo G9 aFT9 CTAGATAGTAACTACAACACTAC {nt 757 al 776}.<sup>13,14</sup>

1 µl (1.5 µl) del RNA de doble cadena extraído fue usado para la obtención del DNAc. El RNA fue desnaturalizado por 10 min a temperatura ambiente con 1 µl de dimetil mercurio (100 mM); para la posterior neutralización del dimetil mercurio se le adicionó 1.25 µl de 2-β-mercaptoetanol (0.7 M) se dejó en hielo hasta adicionarle 8 µl de una premezcla que contenía 2 µl de regulador M-MLV 5X (250 mM de Tris HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl) 1 µl de DTT (0.1 mM), 2 µl de una mezcla de dNTP's (10 mM), 0.5 µl de RNAsina (20 U) 0.5 µl de la

enzima M-MLV RT (100 U), 1 µl del iniciador Beg 9 (16 µM) y 1 µl de iniciador RVG 9 (16 µM). La síntesis de DNAc se llevó a cabo a una temperatura de incubación de 25°C por 10 min, 42°C por 30 min, con inactivación de la enzima a 95°C por 5 min y 5°C por 5 min antes de proseguir con PCR<sup>3,4,24,26</sup>

Para la primera amplificación se prepararon 40 µl de una mezcla de reacción de PCR que contenía 4 µl del regulador 10X sin Mg (200 mM Tris HCl pH 8.4, 500 mM KCl) 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µl de Taq polimerasa (2,5 U/µl), 4 µl de la mezcla de dNTP's (10 mM), 1 µl del iniciador Beg 9 (16 µM) y 1 µl del iniciador RVG 9(16 µM) complementando el volumen final con agua destilada tratada con DEPC. A esta mezcla se le adicionaron 10 µl del DNAc. La reacción final fue colocada en un termociclador PTC-100 (MJ. Research) con un paso inicial de desnaturación de 96°C por 5 min seguido de 35 ciclos ( 94°C por 2 min, 51°C por 1.5 min, 72°C por 2 min). Al finalizar el ciclaje se continuó con una incubación de 72°C por 8 min y por último 4°C por 5 min.

Una segunda reacción de PCR fue realizada para tipificar las cepas aisladas de los procesos diarreicos que fueron sembradas en cultivos celulares, para ello se utilizó el iniciador BEG 9 y los 6 iniciadores internos (aAT8, aBT1, aCT2, aDT4, aET3, aFT9) utilizando las mismas concen-

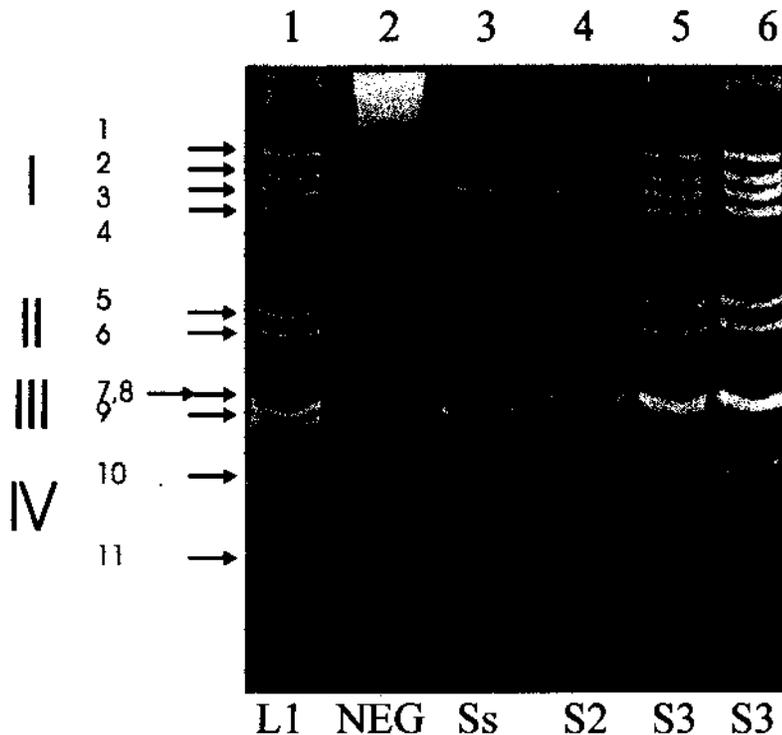


FIGURA 1. Análisis electroforético por PAGE de RNA extraído de rotavirus de materia fecal de pacientes admitidos por EDA en el Hospital de la Misericordia. Carril 1, patrón L1; carril 2, control negativo; carril 3, patrón Ss; carril 4, patrón S2; carriles 5 y 6 patrón S3. I, II, III y IV grupos de bandas.

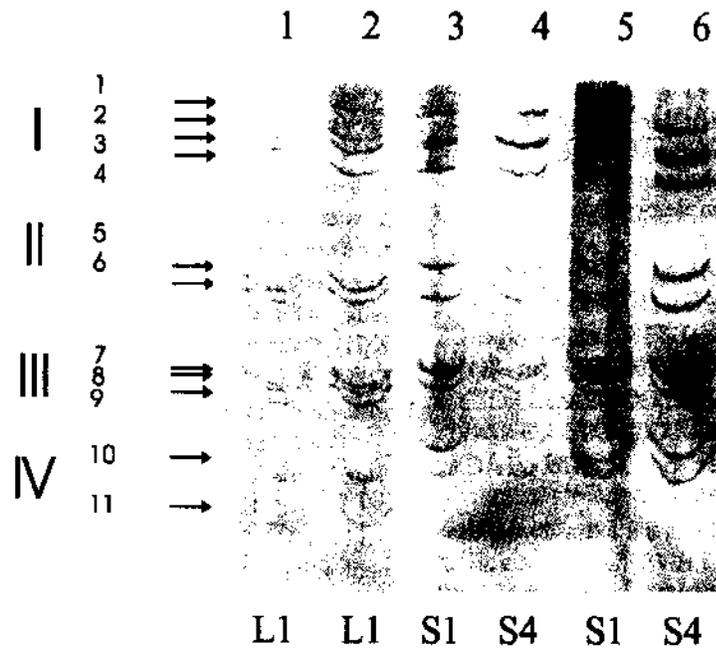


FIGURA 2. Análisis electroforético por PAGE del RNA de rotavirus extraído de pacientes admitidos por EDA del Hospital de la Misericordia. Carriles 1 y 2, patrón L1; carriles 3 y 5, patrón S1; carriles 4 y 6, patrón S4. Notese las diferencias entre el patrón largo y el patrón corto con respecto a la migración de los segmentos 10 y 11. I, II, III y IV grupo de bandas.

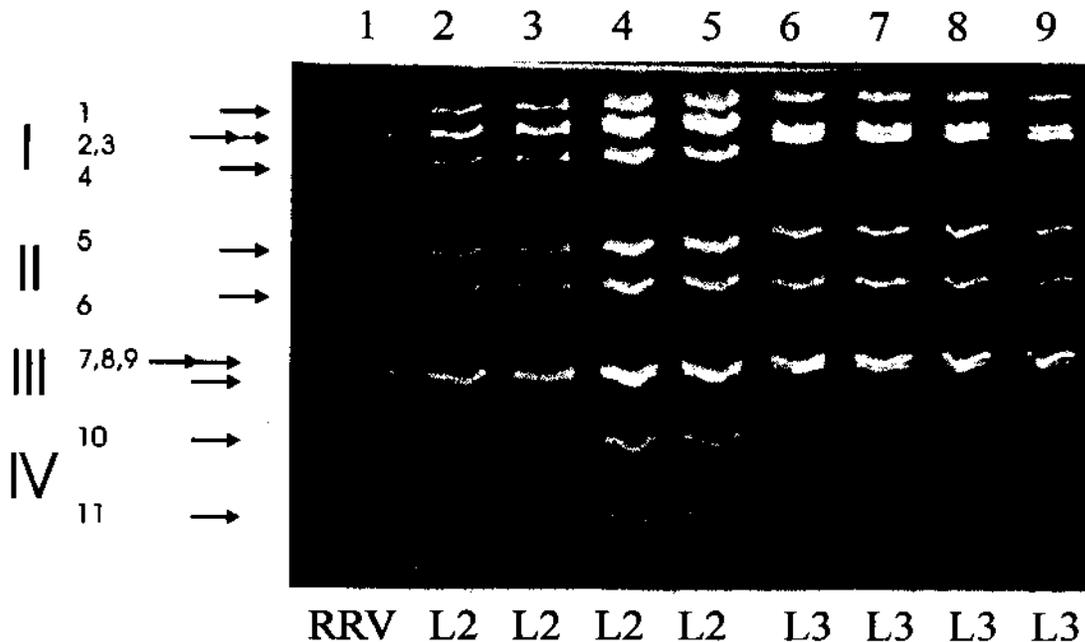


Fig. 3. Coelectroforesis de RNA de rotavirus antes y después del cultivo celular. Carril 1, cepa de referencia RRV de origen de simio, carriles 2, 4, 6 y 8 RNA obtenido de muestras de materia fecal; carriles 3, 5, 7 y 9 ARN obtenido de cultivo celular. Tinción con bromuro de etidio.



FIGURA 4. Tipificación de cepas de rotavirus por RT-PCR a partir de RNA de cultivos celulares: Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control negativo; carril 3, control positivo cepa de referencia RRV de origen de simio, con iniciadores internos, carriles 5, 7 y 9 muestras clínicas después de su paso por cultivo celular, amplificadas con iniciadores internos. Observe la banda localizada a la altura de 374 pb.

traciones de la reacción anterior.

Para verificar la amplificación a 10  $\mu$ l de cada reacción, se le adicionaron 2  $\mu$ l de regulador de llenado (azul de bromofenol 0.05%, sucrosa 40%, EDTA 0.1 M y SDS 0.5%) y se dispensaron en un gel de agarosa al 1.2% preparado con regulador TBE 0.5X; como marcador de peso molecular se utilizó un DNA de 100 pb. El gel fue sometido a una electroforesis horizontal por 1.5 h a 90 V y coloreado con 100 ml de bromuro de etidio (2  $\mu$ g/ml) durante 15 min y luego decolorado por 5 min en agua destilada.

Los productos amplificados fueron fotografiados bajo luz UV en un transiluminador con una cámara polaroid con película 667.

## RESULTADOS

**Análisis electroforético en geles de poliacrilamida.** De 131 muestras de niños menores de 5 años, sólo 42 (32%) fueron positivas para el rotavirus. Todas mantuvieron la migración característica del grupo A.

Se encontraron ocho diferentes electroferotipos. Para clasificarlos se utilizó la movilidad de los segmentos 10 y 11 como patrón corto S (Short), patrón largo L (Long) y patrón super corto Ss (super-short). Esta denominación se acompañó de los números 1, 2, 3 y 4 para agrupar las bandas y diferenciar los patrones y así, determinar la diversidad electroforética existente entre las cepas (Fig. 1 y 2).

Las ocho cepas encontradas fueron nombradas de manera arbitraria como L1, L2, L3, S1, S2, S3, S4 y Ss.

**Cultivos celulares y coelectroforesis.** Para el aislamiento del rotavirus en la línea celular MA-104, se usaron ocho muestras de materia fecal positivas para rotavirus por PAGE. La presencia viral se determinó mediante la visualización del efecto citopático de redondeamiento celular entre el 40 y el 100% de las células. Este efecto sólo se logró en cuatro de las ocho cepas de campo y en la cepa RRV. Las otras muestras no lograron mostrar efecto hasta el pase 11 que se mantuvo el cultivo. Para comprobar la presencia del virus en los cultivos celulares que presentaron el efecto, se realizó un análisis del RNA por PAGE a partir de los sobrenadantes. De esta forma se evidenció la presencia del patrón característico del rotavirus del grupo A. Estos patrones fueron comparados con los originales obtenidos del RNA extraído de muestras de materia fecal (coelectroforesis) evidenciando la estabilidad de la cepa en el proceso de manipulación, obteniéndose el mismo electroferotipo (Fig. 3).

**Amplificación del segmento del gen 9.** Diez muestras positivas y tres negativas por PAGE, a las cuales se les realizó la extracción del RNA total para la RT-PCR mostraron resultados negativos al no visualizarse ninguno de los productos amplificados esperados en el gel de agarosa.

Para eliminar sustancias inhibitoras de la RT-PCR, se realizó un tratamiento del RNA total con celulosa CF-11 que ha sido utilizada por otros investigadores, sin embargo tampoco se obtuvieron resultados positivos.



Con el RNA obtenido de las muestras aisladas de cultivo celular (cuatro cepas de campo y la cepa RRV) a las cuales se les hizo la extracción directamente de la monocapa celular, se trabajaron con la RT-PCR logrando evidenciar un producto de 1062 pb en la primera reacción en la cual se usaron los iniciadores Beg 9 y RVG 9 correspondiente al tamaño del gen 9 que codifica la proteína VP7 del grupo A del rotavirus y que clasifica las cepas como serotipo G (Fig. 4 carriles 3, 4, 6 y 8). En una segunda reacción donde se utilizó la mezcla de iniciadores internos, se observó un producto de 374 pb específico para la cepa serotipo 3 dado por el iniciador aET3 (Figura 4 carriles 5, 7, y 9).

## DISCUSIÓN

La electroforesis de RNA del rotavirus ha demostrado ser una herramienta valiosa para la diferenciación epidemiológica de cepas presentes en un área geográfica determinada.

En el presente trabajo se encontró que de 131 muestras analizadas por PAGE, 42 (32%) fueron positivas para rotavirus; con patrón característico del grupo A, por la distribución de los segmentos 4-2-3-2. No se observaron coinfecciones, pues no se presentó en ninguno de los corridos más de 11 segmentos.

Al comparar estos datos con los de varios investigadores, se encuentra diversidad en el corrido electroforético dentro de los virus en la comunidad, esto puede ser dado por factores, como por ejemplo, la presencia de lluvia en la época en que se realiza el muestreo, que aumenta la aparición de este virus dentro de una población y por ende, aumenta la posibilidad de variaciones.<sup>10,13,22</sup>

Se observó la cocirculación de ocho electroferotipos diferentes, lo cual confirma una diversidad genética dentro de las cepas circulantes. Por otra parte, se hizo evidente la presencia de patrones largos, lo cual había sido reportado por investigadores de fuera de nuestro país,<sup>12,15,16,26</sup> ya que en Colombia, en los reportes de 1994, sólo aparecía el patrón corto.<sup>5,10</sup>

De los ocho electroferotipos, solamente uno presentó igual movilidad electroforética a las cepas reportadas por Guerrero y Bermeo, lo cual podría indicar la presencia de nuevas cepas dentro de la misma área geográfica, posiblemente debidas a una reorganización genómica que puede ser causada por mutaciones puntuales o por reorganización de los segmentos en coinfecciones.

Este trabajo se inició con volúmenes muy pequeños de muestras. Por esta razón se realizaron cultivos celulares previos a la electroforesis buscando amplificar la cantidad de virus en ellas. Este procedimiento si bien no es rutinario, colabora con la purificación viral y elimina enzimas y sustancias de la materia fecal que pueden generar problemas tanto para la electroforesis como para la amplificación. Esta es la razón por la cual sólo se logró el resultado de tipificar cuatro muestras.

Los resultados obtenidos después de la inoculación del virus en la línea celular MA-104, mostraron que cuatro muestras de campo no pudieron ser aisladas a pesar de seguir las condiciones conocidas de utilizar tripsina. Este fenómeno se debe posiblemente a una menor cantidad de virus inoculado, a una menor virulencia de la cepa o a la temperatura a la cual se almacenaron. Tietzova y Petrovicova,<sup>20</sup> encontraron que muestras mantenidas a -20°C no desarrollan un efecto citopático claro. A las cepas de referencia se les realizó el mismo procedimiento de las cepas de campo, sin embargo, sólo la RRV, mostró un claro efecto citopático.

Algunos investigadores han reportado una asociación de los patrones electroforéticos con el serotipo de cada cepa; el patrón corto ha sido relacionado con el serotipo G2 y el patrón largo con G1, G3, y G4.<sup>15,19,21,23</sup> Estos datos concuerdan con los nuestros ya que las cepas aisladas de cultivos celulares presentaron un patrón largo. La cepa RRV está clasificada como serotipo G3 y mostró un patrón electroforético largo.

Ninguna de las muestras que presentaron patrón corto pudieron ser aisladas en el cultivo celular, ni tipificadas por RT-PCR, pero, basados en los estudios mencionados,<sup>12,17,19,21</sup> se podría especular, que la mayoría de las cepas examinadas en este trabajo que presentaron patrón corto, pertenecen al serotipo G2.

Los resultados obtenidos permiten concluir que existe una gran diversidad genética en las cepas de rotavirus cocirculantes. De igual manera, la utilización de las metodologías descritas en este estudio, redundará en un mayor conocimiento de la historia natural de la enfermedad, y contribuirá al desarrollo de estrategias de vigilancia epidemiológica, prevención y control de GEA por rotavirus en la población infantil.

## AGRADECIMIENTOS

A Colciencias quien financió esta investigación. Al Dr. Salim Mattar por sus revisiones y aportes.

## REFERENCIAS

1. Albert, J. M., L. E. Unicomb, G. L. Barnes y R. F. Bishop. 1987. Cultivation and characterization of rotavirus strains infecting newborn babies in Melbourne, Australia, from 1975 to 1979. *J. Clin. Microbiol.* 25:1635-1640.
2. Arango, A. E., C. Aguirre, L. Aristizabal, H. Hanssen. 1985. Frecuencia de rotavirus en niños menores de cinco años con diarrea aguda. Primer informe. Estudio en un grupo de niños de la ciudad de Medellín (Colombia). *Salud Uninorte, Barranquilla (Col)* 2:129-138.
3. Barrera, J. del C. Persistence of vesicular stomatitis



- New Jersey RNA in convalescent animals. Tesis Ph.D. University of Wisconsin - Madison. 1992. p 1- 115.
4. Barrera, J. del C. y G. J. Letchworth. 1996. Persistence of vesicular stomatitis Virus New Jersey RNA in convalescent Hamsters. *Virol.* 219:453-464.
  5. Bermeo, L. Caracterización molecular de cepas de rotavirus de origen humano y su significado epidemiológico. Tesis Magister, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana Bogotá, Colombia. 1996 ; 1-90.
  6. Bermeo, L., J. D. Mogollón, M. F. Gutierrez, F. Ariza, J. Barrera y L. Jerabek. 1997. Molecular characterization of rotavirus strains obtained from human diarrheic samples and their epidemiological implications. Artículo enviado a *Arch. Virol.*
  7. Caetano-Anolles, G. y P. M. Gresshoff. 1993. Staining nucleic acids with silver an alternative to radioisotopic and fluorescent labelling. *Promega Notes* 45:13-18.
  8. Chomczynski, P. y N. Sacchi. 1987. Single step method of isolation by acid guanidin thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
  9. Gouvea, V, R. Y. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H. F. Clark, B. Forrester y Z. Fang. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotaviruses nucleic acid from stools especimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 276-282.
  10. Guerrero, C. A., L. Moreno, J. Peñaranda y O. Acosta. 1994. Caracterización electroferotípica de rotavirus aislados de infantes con gastroenteritis en la ciudad de Bogotá. *Revista de la Facultad de Medicina Universidad Nacional.* 42:203-208.
  11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
  12. Maunula, L. y B. Bonsdorff. 1995. Rotavirus serotypes and electroferotypes in Finland from 1986-1990. *Arch. Virol.* 140:877-890.
  13. Mesa, F., A. Lajo, C. Borque, E. Segurado y C. Ladrón de Guevara 1996. Infección por Rotavirus: características clínicas y tiempo de eliminación del antígeno de rotavirus en heces. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 14:106-110.
  14. Metcalf, T. G., J. L. Melnick y M. K. Estes. 1995. Environmental virology from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-atrip of over to years. *Ann. Rev. Microbiol.* 49:461-487.
  15. Noel, J. S., G. M. Beards y W. D. Cubbitt. 1991. Epidemiological survey of human rotavirus serotypes and electropherotypes in young children admitted to two children's hospital in Northeast London from 1984-1990. *J Clin. Microbiol.* 29:2213-2219.
  16. Reguera, J., R. Lejaruzu, J. Eirus, M. Bratos, M. Gonzalo, Z. Gonzales, P. Perez y A. Rodriguez. 1993. Estudios de tres años de patrones de electroforesis de ARN de rotavirus en Valladolid. *Enfer. Infect. Microbiol.* 11:309-313.
  17. Ruggeri, F., M. Marciano, A. Tinari, E. Salvatori y G. Donelli. 1989. Four year study of rotavirus electropherotypes from cases of infantile diarrhea in Rome. *J. Clin. Microbiol.* 1989 27:1522-1526.
  18. Santos, N. y V. Gouvea. 1994. Improved methods for purification of viral RNA from fecal specimens for rotavirus detection. *J. Virol. Methods* 46:11-21.
  19. Tabassum, S., P. Shears y C. A. Hart. 1994. Genomic characterization of rotavirus strains obtained from hospitalized children with diarrhoea in Bangladesh. *J. Med. Virol.* 1994 43:50-56.
  20. Tietzova, J. y A. Petrovicova. 1994. Isolation of group A human rotaviruses from faecal specimens in monkey MA - 104 cells. *Acta Virol.* 38:47-50.
  21. Timenetsky, M., N. Santos y V. Gouvea. 1994. Survey of rotavirus G and P types asociated with human gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil, from 1986-1992. *J. Clin. Microbiol.* 32:2622-2624.
  22. Trujillo, H., C. Jaramillo, M. Restrepo, G. I. Mejia, T. Zapata, R. Ramirez y R. Betancour. 1985. Rotavirus y otros agentes enteropatógenos en la etiología de la diarrea aguda en Medellín, Colombia. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 98:251-258.
  23. Urasawa, T., S. Urasawa, y K. Tanaguchi. 1981. Sequential passages of human rotavirus in MA-104. *Microbiol. Immunol.* 25:1025-1035.
  24. Wilde, J., R. Van, L. Pickering, J. Eiden y R. Yolken. 1992. Detection of rotaviruses in the day care environment by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 166:507-511.
  25. Yap, K., Y. Wong y Khorc. 1992. Rotavirus electropherotypes in Malaysian children. *Can. J. Microbiol.* 38:996-999.
  26. Zientara, S., C. Sailea, S. Maulay y C. Cruciere. 1994. Diagnosis of the african horse sickness virus serotype 4 by a one tube, one manipulation RT-PCR reaction from infected organs. *J. Virol. Methods* 46:179-188.