



Rotavirus: control y vacunas

Irene Pérez Schael¹.

Rosabel González².

Belén Salinas³.

Merly M. Villarroel⁴.

Mary Tomat⁵.

Juan Pablo Yarzábal⁶.

¹iperez@telcel.net.ve

²rosagoma@hotmail.com

³beljor@cantv.com.ve

⁴cvillarroel_98@yahoo.com

⁵marytomat@hotmail.com

⁶juan.p.yarzabal@gsk.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Los rotavirus son la causa más común de hospitalización en niños < 5 años. Sin embargo, el impacto mayor de esta enfermedad ocurre en los países en desarrollo, donde, anualmente, mueren aproximadamente 600.000 niños a causa de los rotavirus. Por esta razón, el desarrollo de una vacuna ha sido prioridad en la ciencia internacional, en las últimas décadas. En la actualidad, la vacuna de rotavirus consiste en una cepa de rotavirus viva y atenuada que se administra por vía oral. Varios estudios con una vacuna humana de rotavirus (RIX4414) se han realizado o están en desarrollo en Latinoamérica. Otras estrategias están en estudio: vacunas rearregladas de origen bovino (WC3 y UK), la cepa neonatal (RV3) y una cepa de cordero (LLR). De todas estas estrategias, las vacunas WC3 y la RIX 4414 son las que están en estados más avanzados en su desarrollo. Los estudios fase I y II con estas vacunas han mostrado que no producen reacciones adversas, son inmunogénicas y eficaces en los Estados Unidos, Europa y América Latina.

PALABRAS CLAVE: rotavirus, diarrea, vacunas.

SUMMARY

Rotavirus infection is recognized as a public health issue, worldwide. It is the most common cause of hospitalization in children < 5 years of age. However, the highest paid toll occurs in the developing world where each year around 600 thousand children die due to rotavirus. Therefore, the development of a rotavirus vaccine has been a world priority, in the last decades. In 1999, the first licensed rotavirus vaccine (Rotashield -rhesus-based rotavirus vaccine) was withdrawn from use in the EEUU because of its association with intussusception. This event dramatically changed the strategies for rotavirus vaccine development. In addition, epidemiology of rotavirus disease and intussusception become very important, particularly for the developing countries. In consequence, the focus of attention for the development and use of these vaccines was shifted to developing countries. So, the obvious need to conduct field trials with rotavirus vaccine in developing countries has been assessed. These important issues are discussed. Currently, the rotavirus vaccine to date consists of a live, attenuated and orally administered rotavirus strain. Various phase I and II trials with the human rotavirus vaccine (RIX 4414) have been or are being conducted in Latin America. Moreover, other approaches are also in development: WC3 and UK bovine-human reassortant vaccines, RV3 (neonatal strain) and LLR (lamb strain). Rotavirus vaccines in advanced stages of development are WC3 and RIX 4414. These vaccines have been found non-reactogenic, immunogenic and efficacious in the EEUU, Europe and Latin América.

KEY WORDS: Rotavirus, diarrhea, vaccine.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas continúan siendo la primera causa de muerte en la población infantil. Ellas representan el 80% de la morbilidad en los casos pediátricos, siendo las diarreas una de las enfermedades más frecuentes en niños menores de 5 años, sobretodo en las poblaciones más pobres por lo que ha sido llamada por algunos autores como "la enfermedad de la pobreza¹".



La magnitud de la diarrea radica en sus altas tasas de mortalidad y morbilidad, en la sinergia que se crea entre la diarrea y la desnutrición, en la pérdida de oportunidades de aprendizaje porque ocurre en una edad muy vulnerable para el desarrollo del niño y en la ausencia laboral que ocasiona a los padres o personas que cuidan a estos niños enfermos, lo que genera graves consecuencias en el desarrollo del potencial humano y en la productividad de un país^{1,2,3}. Estudios realizados en Venezuela muestran una asociación entre

diarrea y desnutrición^{3,4}.

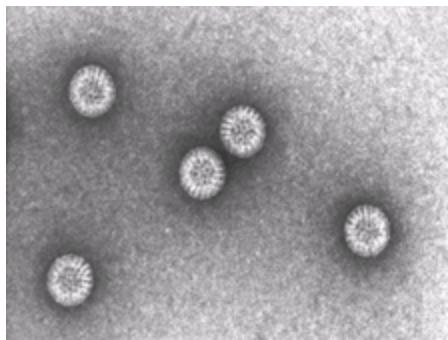
Las diarreas causan la tercera parte de las muertes en la población menor de 5 años. Se ha estimado que anualmente, en el mundo, mueren por diarrea de 2.4 a 3 millones de niños < 5 años⁵, lo que equivale a decir que cada día mueren aproximadamente 6500 niños por esta enfermedad. La mayoría de estas muertes ocurren en los países en desarrollo. La incidencia

promedio de diarrea varía de 3.9 episodios/niño/año en América Latina a 2.3 episodios en Asia, ocurriendo de 137 a más de 1 billón de episodios en todo el mundo ^{6,7}. Sin embargo, la incidencia varía de región a región; por ejemplo, en Indonesia, Guatemala, Egipto y Nigeria ocurren 3 episodios/niño/año aproximadamente, mientras que en Bangladesh, se ha estimado una incidencia de 5-6 episodios/niño/año, en Perú y Guinea-Bissau de 8-10 episodios/niño/año y, en cambio, en Costa Rica ocurren 0.7 episodios/niño/año ^{8,9,10,11}.

En Venezuela, para 2001, la enteritis fue la tercera causa de mortalidad infantil y la segunda causa de muerte en los niños de 1 a 4 años¹². Para 1999, esta enfermedad fue la tercera causa de consulta en los establecimientos de atención médica en el país ¹². Pero, estimaciones muestran que ocurren 1.320.000 episodios anuales de diferente severidad en los primeros 2 años de vida y una incidencia de 2,2 episodios/niño/año¹³. En el estado Carabobo, datos de 5 años del Sistema de Vigilancia para la Diarrea implementado en la Ciudad Hospitalaria Enrique Tejera (CHET) muestran que las diarreas agudas representan el 15% del total de consultas atendidas en la emergencia del hospital y el 10% de las hospitalizaciones¹⁴; además representan el 11% de las muertes por todas las causas registradas en la población < 5 años de ese hospital¹⁵. Estas cifras indican que las diarreas son un problema importante de salud pública en esta población, particularmente en el primer año de vida, por lo que se deben tomar medidas y diseñar programas de salud orientados a mejorar la salud de la población infantil.

IMPACTO DE LA ENFERMEDAD POR ROTAVIRUS GRUPO A

Entre los agentes causales de la diarrea aguda, sin lugar a dudas, el rotavirus - descubiertos en Australia por la Dra. Ruth Bishop ¹⁶ - del grupo A, es la causa más frecuente y es el responsable de la mayor proporción de diarreas severas que consultan o ingresan a los hospitales en la población infantil, tanto en países en desarrollo como desarrollados.



Microfotografía electrónica de rotavirus

En los niños < 5 años, los rotavirus son los responsables del 25% de las muertes por diarreas y del 6% de todas las muertes, en el mundo ¹⁷. Entre 400 y 600 mil muertes debidas a los rotavirus ocurren cada año, y además son los responsables de 125 millones de casos anuales, de los cuales el 13% son moderados o severos ^{1,5,7,18}. Prácticamente, toda la población ha sido infectada por este virus a la edad de 5 años.

La incidencia de la diarrea por rotavirus, a diferencia de otros agentes etiológicos, es muy similar en todo el mundo porque no está asociada a grado de desarrollo. Esta varía de 0.15 a 0.8 episodios/niño/año ¹⁹; o tasas de 2.9 a 8.5 x 1000 niños < 2 años ²⁰. La frecuencia en pacientes hospitalizados oscila entre 14-70%, pero su detección es menor (2-35%) en pacientes tratados ambulatoriamente y mucho más baja (10%) cuando se investiga en la comunidad ^{7,13,21}.

Los rotavirus son altamente "democráticos". Se han encontrado en todo el globo terráqueo e infectan por igual a ricos y pobres, niños y niñas, habitantes del norte o del sur y de países de clima templado o tropical. En 34 países evaluados se encontró una media de 33% de prevalencia de rotavirus ²².

En los Estados Unidos, los rotavirus son los responsables del 30%-50% de las hospitalizaciones por diarrea que abarcan aproximadamente 50-55 mil hospitalizaciones y de 20 - 40 muertes cada año ¹⁷. En ese país, en los primeros 5 años de la vida, 4 de cada 5 niños se enferma con rotavirus, 1 de cada 7 consulta al médico o la emergencia de un hospital, y en su primer año de vida, 1 de cada 73 niños se hospitaliza y 1 de cada 200.000 muere por rotavirus ^{17,23}.

En Venezuela, en 1975, dos años después de su descubrimiento, los rotavirus fueron identificados por primera vez en niños hospitalizados en el Hospital de Niños de Caracas ²⁴. Desde entonces, se han encontrado con una frecuencia que varía entre el 10% y 45% ^{25,26,27}. En un estudio prospectivo realizado en Caracas, se determinó una incidencia de 0.16 episodios/niño/año y se estimó que los rotavirus causaban 101.400 episodios y 18.000 hospitalizaciones por año durante los 2 primeros años de la vida ^{13,21}.

En Valencia -Edo. Carabobo, Venezuela-, estimaciones más recientes, realizadas con datos del Sistema de Vigilancia, implementado desde 1997, en la Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera" (CHET), muestran que 1 de cada 10 niños visita al hospital debido a una diarrea por rotavirus y 1 de cada 25 se hospitaliza por rotavirus en su primer año de vida (datos no publicados). Extrapolando estos datos al país y teniendo en cuenta que los indicadores de salud del estado Carabobo son superiores a la media de Venezuela, tendríamos que para una cohorte de 550.000 nacimientos al año, ocurren 22.000 hospitalizaciones y 55.000 visitas al hospital por causa de los rotavirus en el primer año de vida (estimaciones conservadoras). Estas cifras son siete veces mayores a las de EEUU ¹⁷ y similares a las de Finlandia, Perú y Argentina ^{17,28-30}. Estos datos se corresponden con estimaciones anteriores realizadas en otros grupos de edad ^{13,31}.

País	Tasa de Hospitalización*	Relación
Venezuela	4000	1:25
Perú	3500	1:29
Argentina	3230	1:31
Finlandia	2977	1:33
EEUU	1375	1:73

Tabla 1 Tasas de hospitalizaciones por rotavirus en niños

<1 año en varios países de América y Europa

*Tasas x 100.000 nacidos vivos Estimaciones realizadas a partir de las siguientes referencias ^{17,28,29,30}. Datos de Venezuela no publicados.

Realmente, la diarrea es la enfermedad de la pobreza y es un indicador del grado de desarrollo de un país. En un estudio comparativo realizado en Argentina, Chile y Venezuela ³¹, se observa que el impacto de los rotavirus en las hospitalizaciones por todas las causas disminuye con el grado de desarrollo (expresado en ingreso per cápita) de 4% en Venezuela, 3% en Chile a 1% en Argentina; mientras que el impacto de los rotavirus en las diarreas hospitalizadas aumenta con el ingreso per cápita, pasando de 38% en Venezuela, 47% en Chile a 71% en Argentina (diferencias

que son significativas). Esto se debe, a que las diarreas bacterianas ocupan un lugar importante, en los países menos desarrollados, disminuyendo así el impacto de los rotavirus. En Venezuela, las diarreas por otras etiologías siguen ocupando un lugar importante en las hospitalizaciones, especialmente en los meses de lluvia, cuando las bacterias son más comunes.

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS ROTAVIRUS

Los rotavirus causan epidemias en centros de cuidado diario y ancianatos. Además, son causa común de infecciones nosocomiales en los hospitales (14% - 17%); así como también son causa frecuente (40-50%) de infecciones asintomáticas en retenes de recién nacidos ³²⁻³⁶. Son ligeramente más frecuentes en varones que en las hembras ¹⁴, aunque no existe consenso en este sentido ³⁷.



La diarrea por rotavirus es más común entre los 3 y 23 meses de edad, pues en los primeros tres meses de vida, los niños son protegidos por los anticuerpos maternos y la lactancia materna ^{38,39} y, después de los 2 años están protegidos por la inmunidad adquirida luego del contacto con el rotavirus que circula en el medio ambiente ^{14,33,37,39,40}.

El conocimiento de la epidemiología de rotavirus es esencial para el control de esta enfermedad, sobre todo porque se ha observado que presenta diferencias entre países desarrollados y en desarrollo, así como entre regiones de clima templado y tropical ³³. Estas diferencias podrían estar asociadas a factores de riesgo que aún no se han establecido, pero se han vinculado al estrato socioeconómico, hacinamiento en el hogar, baja educación materna y bajo peso al nacer ^{20,41}. Por ejemplo, este virus presenta diferencias en la severidad de la enfermedad entre países desarrollados y países en desarrollo. La diarrea por rotavirus es mucho más severa en poblaciones de bajo nivel socioeconómico. Aunque, la frecuencia de rotavirus no parece estar ligadas al nivel socioeconómico, en Venezuela, se ha encontrado que el riesgo a deshidratarse ³⁷ y a enfermarse es mayor en las poblaciones más pobres ⁴². Se ha observado que la posibilidad de ser afectado por rotavirus es 1.39 mayor en los niños de bajo nivel socioeconómico ⁴², inclusive la severidad de la enfermedad, evidenciado por el mayor porcentaje de casos deshidratados encontrados en los grupos de bajo estrato social ³⁷. Por otro lado, la mayoría de las muertes causadas por rotavirus ocurren en los países menos desarrollados.

El rotavirus presenta diferencias en el comportamiento estacional. Por ejemplo, en los países de clima templado, como EE.UU, Gran Bretaña, México y Finlandia, circula casi exclusivamente durante los meses fríos y secos ^{22,28,43-47}; mientras que, en los países tropicales (Bangladesh, Venezuela, Brasil y varios países de África) se encuentra circulando todo el año, aunque en algunas regiones presenta un ligero aumento en los meses fríos y secos ^{9,36,37,48,49}. En EE.UU, durante el invierno, el 60-70% de las gastroenteritis hospitalizadas se deben a los rotavirus que circulan siguiendo un patrón estacional y geográfico que se repite a través de los años ^{43,46,47,50}.

Este comportamiento estacional influye en la edad a la que ocurre la primera infección por rotavirus ³³. En los países sin marcada estacionalidad, la edad a la que aparece la primera infección es muy temprana (< 6 meses de edad), debido a que todos los niños que nacen están expuestos al virus, independientemente de la fecha de nacimiento, y así sucede en la mayoría de los países tropicales; mientras que en los países con marcada estacionalidad o países templados, las primeras infecciones ocurren en edades posteriores (9-15 meses de edad). El 65-67% de las hospitalizaciones por rotavirus ocurren en el primer año de vida y el 35% restante durante el segundo y tercer año de vida, en las zonas donde el comportamiento del rotavirus es estacional ^{14,39}. Esto contrasta con lo observado en países donde el virus circula todo el año: el 85% de los rotavirus ocurren en el primer año de vida ^{9,36,37}. Este patrón estacional ha sido asociado parcialmente a condiciones climatológicas ^{43,50}, y a la condición socioeconómica. Sin embargo, existen ejemplos que contradicen este comportamiento, por ejemplo Brasil, donde existen regiones que presentan un patrón estacional y otras áreas donde el virus circula todo el año ⁴⁹.

Asimismo, en Venezuela tenemos ambos tipos de comportamiento estacional en poblaciones de clima y estratos socioeconómicos similares. En Caracas – Distrito Federal-, el virus circula durante todo el año y el 85% de los episodios ocurren en el primer año, el 14% en el segundo año y 1% durante el tercer año de vida ³⁷. En cambio, en Valencia - Edo. Carabobo-, el comportamiento de los rotavirus presenta una marcada estacionalidad, y la distribución de la enfermedad por grupos de edad es similar a la observada en países templados: 67% en el primer año de vida, 26% en el segundo y 7% en el tercer año ^{14,33}. En EEUU, el 56% de las hospitalizaciones por rotavirus ocurren en el primer año, el 25% en el segundo año y el 10% en el tercer año ⁴⁷, valores que son muy similares a los de Valencia. En África, el comportamiento de la diarrea por rotavirus de acuerdo a la edad es similar a la de Caracas ³⁶. La frecuencia de los rotavirus en los niños de 0 a 2 meses de edad fue similar en Caracas y Valencia (16% y 13%, $P < 0.05$, chi-cuadrado) e igual a lo reportado en otros países ^{9,39,47}.

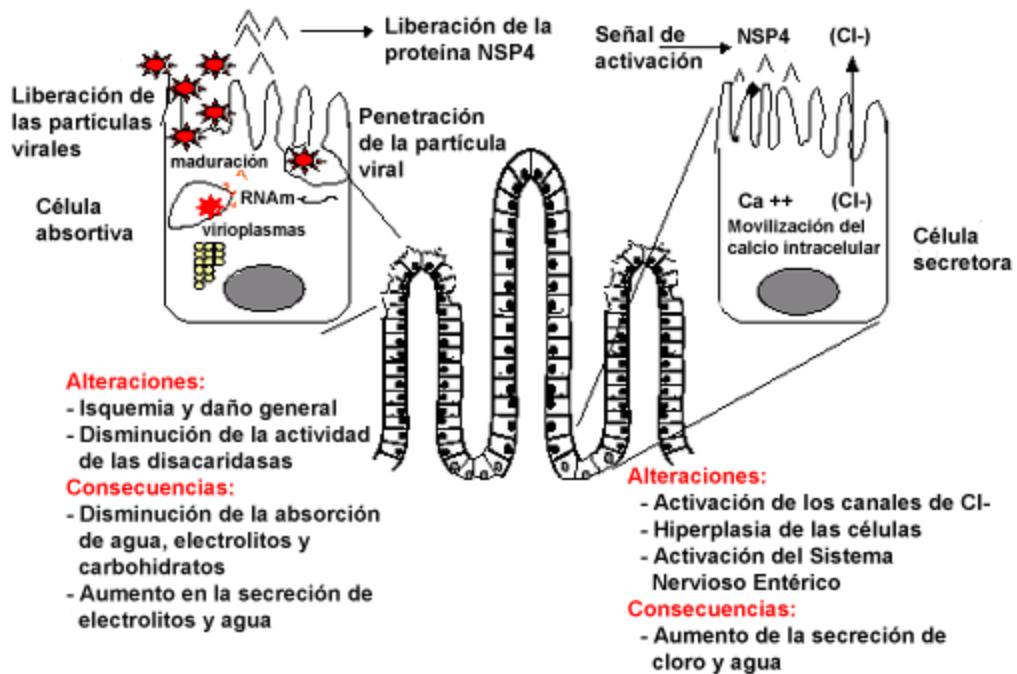


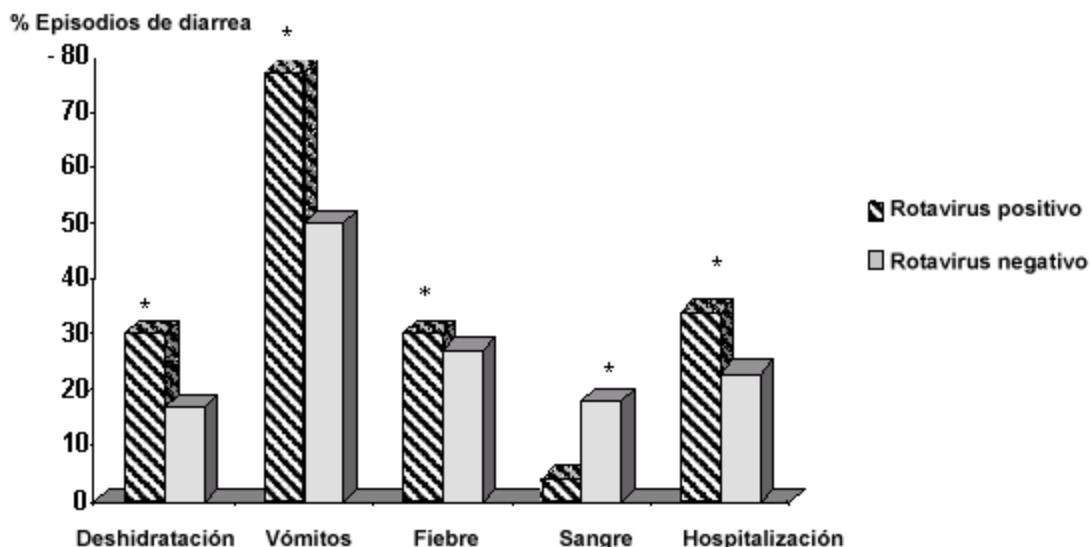
Figura 1: Mecanismos de patogenicidad del rotavirus
Modificado por Rosabel González de Estes 1999

CLÍNICA Y PATOGENICIDAD DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS

La transmisión del rotavirus es de tipo fecal-oral, pero las vías respiratorias podrían estar también involucradas^{51,52}, como ocurre con el virus de influenza y del sarampión⁴¹. La posibilidad de transmisión por el aire es cada vez más factible⁵³. La manera más común de contagio es de persona a persona, pero también se transmite a través de alimentos u objetos contaminados, y a través de pequeñas gotas transmitidas por el aire⁴¹, por vómitos o fomites⁵³. Este virus es muy estable en el ambiente, pudiendo sobrevivir por largos períodos de tiempo sobre superficies de objetos contaminados.

Los rotavirus infectan las células maduras de las vellosidades intestinales, especialmente, del duodeno e íleon. La infección por rotavirus muestra un marcado tropismo y se restringe principalmente a la mucosa intestinal⁵⁴. Los virus infectan la célula después de la interacción con un receptor, se replican en el citoplasma, lisán la célula, atrofian la vellosidad y disminuyen la capacidad de absorción, actuando principalmente en las disacaridasas. Esto causa hiperplasia de las células de la cripta lo que, a su vez, estimula la actividad secretora con aumento en la excreción de agua y electrolitos. Los resultados netos son la disminución de la absorción e incremento en la salida de agua^{54,55,56}. También, recientemente, se han identificado otros mecanismos de patogenicidad del rotavirus que son la actividad citotóxica de la proteína no estructural NSP4 que se produce en la fase inicial del ciclo de replicación viral⁵⁷ y la activación del sistema nervioso entérico (SNE)⁵⁸. Ambos mecanismos producen una diarrea sin producir alguna alteración histopatológica. En el primer mecanismo, la enterotoxina (NSP4) altera la homeostasis del calcio, ocasionando un aumento del calcio intracitoplasmático que activa los canales de cloro, y aumenta la secreción de cloro, acompañado por agua, a la luz intestinal. En el

segundo mecanismo, el SNE que controla los movimientos del intestino y la absorción y secreción de líquidos, produce una diarrea secretora cuando es estimulado por el virus⁵⁸.



*P< 0.05; para la comparación entre los dos grupos (Rotavirus + vs. Rotavirus -)

Figura 2: Clínica de los episodios de diarrea por rotavirus
Adaptado de Salinas, 2002

El espectro de la infección por rotavirus varía desde infecciones asintomáticas, pasando por un cuadro clínico leve-moderado, hasta producir una diarrea acuosa y profusa que puede causar deshidratación y muerte. Después de un período de incubación de 1 a 3 días, se desencadena la diarrea acompañada de vómitos y fiebre en más del 50% de los casos atendidos en el hospital. Ellos causan deshidratación en una alta proporción (30%-40%) de las diarreas^{4,10,14,37}.

Estudios realizados en Venezuela, muestran que la diarrea causada por rotavirus, comparada con la producida por otros agentes etiológicos, es más severa y causa deshidratación (38%-58%), fiebre (48%-57%), vómitos (79%-81%) y hospitalización en el 36%-76% de los casos que acuden al hospital^{4,14,37}. En Venezuela, el riesgo a deshidratarse es mayor entre los 3 y 5 meses edad, y disminuye a medida que aumenta la edad⁴. Otros estudios epidemiológicos también muestran una disminución de la severidad de la enfermedad con la edad^{59,60}.

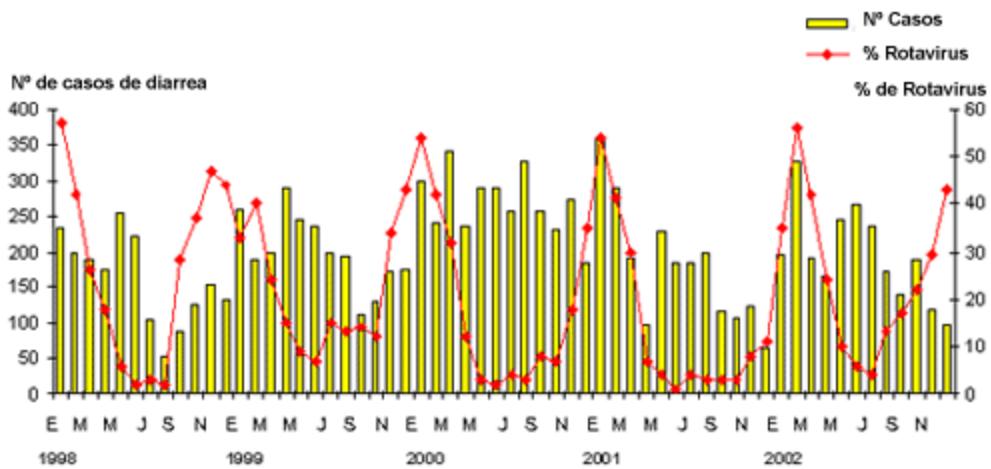


Figura 3: Distribución estacional de la diarrea por rotavirus. Valencia - Edo. Carabobo, 1998-2002.
Adaptado de Salinas, 2002

ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DEL ROTAVIRUS

Los rotavirus constituyen un género de la familia Reoviridae que contienen un genoma segmentado de ARN de doble cadena. Es un virus no-envuelto que mide 70 nm de diámetro. El nombre de rotavirus viene del latín *rota* que significa rueda -por su semejanza a una rueda de carreta al ser observado en el microscopio electrónico-. El virión de rotavirus tiene una estructura formada por tres capas concéntricas de proteínas que encierran al genoma, constituido por 11 segmentos de ARN de doble cadena (ARNdc). El genoma presenta patrones característicos para cada tipo de cepa (humana o animal), cuando los segmentos son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida y son llamados electroferotipos. La posibilidad de distinguir aislados de rotavirus por electroforesis ha sido muy utilizada en estudios de epidemiología molecular, así como estudios de epidemias y de brotes de infecciones nosocomiales⁶¹. La naturaleza segmentada del genoma de rotavirus ha constituido la base fundamental para el estudio de las propiedades moleculares de las proteínas virales, su caracterización y sus funciones⁶². También constituye la base del mecanismo más común de evolución del rotavirus, denominado rearreglo génico o "shift" (intercambio de genes entre cepas) y es la base para el desarrollo de la primera vacuna que ha salido al mercado y de otras en desarrollo^{63,64}.

Cada segmento es un gen y codifica para una proteína, 6 proteínas estructurales y 5 no estructurales. La proteína ubicada en la capa intermedia (VP6) presenta características antigenicas que permiten la clasificación del rotavirus en 7 grupos (A hasta el G) que son indistinguibles al microscopio electrónico pero se diferencian antigenicamente por la técnica de Elisa. Los grupos de rotavirus A, B y C han sido encontrados en humanos y animales y los grupos D, E, F y G infectan solamente a los animales (pollos y cochinos), pero el grupo A es el más común y el de mayor importancia epidemiológica. A su vez, este grupo se clasifica en dos sub-grupos (I y II) que coinciden con dos tipos de patrones de migración electroforética de sus genes (patrón corto y largo) confirmados por estudios de hibridación molecular de ARN⁶⁵. Estos estudios ratificaron la existencia de 2 grandes familias de acuerdo a su homología genética:

1. La familia de virus parecidas a las cepas prototípicas o estándar DS-1 (sub-grupo I).
2. La familia de virus parecidas a las cepas prototípicas Wa (sub-grupo II).

En la capa más externa se encuentran las proteínas VP4 y VP7 que tienen actividad neutralizante y definen la clasificación binaria de los rotavirus del grupo A en serotipos y genotipos. Hasta el presente se han determinado 14 serotipos G (por glicoproteína) y 21 genotipos P (por proteasa), de los cuales 10 serotipos G y 7 genotipos P son humanos⁶⁶⁻⁶⁸.

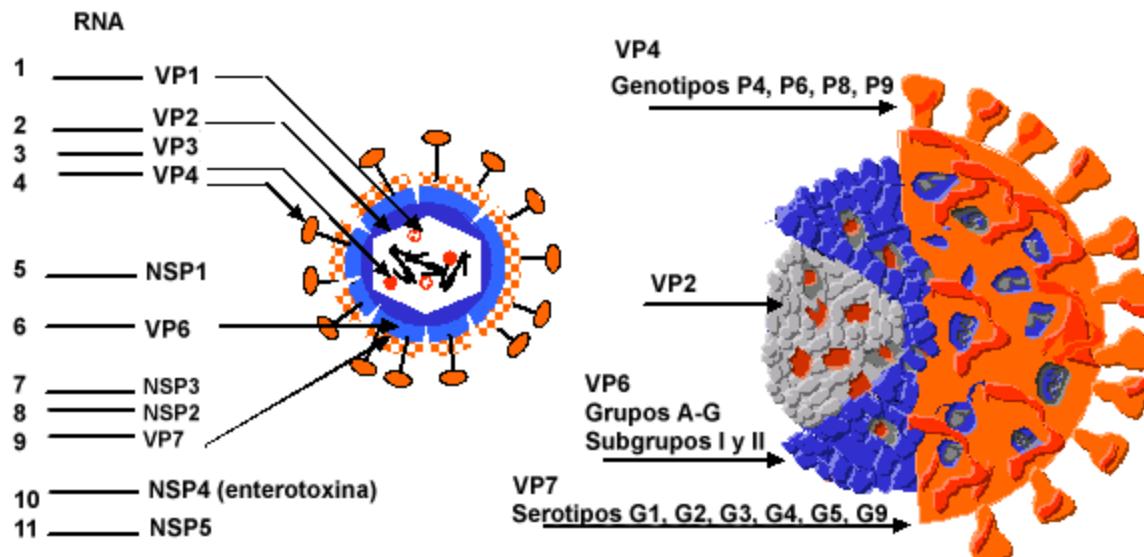


Figura 4: Estructura del rotavirus
Adaptado de Estes, 1996

La distribución mundial de los serotipos G y genotipos P muestra un número limitado de combinaciones asociadas a diarrea: G1P8; G2P4; G3P8, G4P8, G1,2,3,4P6 y G1P9. Una revisión de trabajos publicados sobre la frecuencia de los tipos G y P determinados por pruebas de neutralización, Elisa y PCR, en distintos lugares del mundo reportan al tipo G1P8 (53%) como el más frecuente, le siguen el G4P8 (14%), el G2P4 (11%), G3P8 (5%), G3P9 y G1P9 (1%), G1P6 – G2P6 – G3P6 – G4P6 (1%) y las combinaciones G1P4, G9P8, G1P3, G3P3 con frecuencia menor de 1%⁶⁹. Este estudio apoya el concepto de las 2 grandes familias de rotavirus: P4 con el serotipo G2 (DS-1) y P8 con los serotipos G1, G3 y G4 (Wa). En Venezuela, un estudio realizado para determinar el serotipo G de cepas recolectadas durante 11 años mostró la siguiente frecuencia: G1(20%), G2(10%), G3(25%) y G4(15%)⁷⁰.

Aunque existe una diversidad genética (polimorfismo) en las cepas aisladas del ambiente, más del 80% de las cepas estudiadas pertenecen a los serotipos G1P8, G2P4, G3P8 y G4P8^{69,71-77}. Sin embargo, estudios realizados recientemente en EE.UU, Brasil, India, Bangladesh y Malawi, indican la aparición de nuevos serotipos G con relativa importancia. Por ejemplo, en EE.UU se detectó 7% de G9⁷⁷, en Brasil se encontró 25% de G5, 16% de G10 y 4% de G8⁷³, y en la India, se encontró 24% de G9P6⁶⁹. Además, el serotipo G9 ha sido encontrado con una frecuencia considerable en países desarrollados los que implica la importancia epidemiológica creciente de un quinto serotipo⁷⁸. Estos hechos revelan la existencia, cada vez mayor, de una gran variabilidad genética que, indudablemente, podrían tener relevancia en el desarrollo de una vacuna contra el rotavirus⁷⁹.

INMUNIDAD INDUCIDA POR ROTAVIRUS

Los rotavirus producen una infección local que afecta principalmente las células maduras de las vellosidades intestinales. El período de incubación (1-3 días) es relativamente corto por lo que induce una inmunidad parcial y poco duradera ⁸⁰. Este tipo de infección es similar a producida por los virus respiratorios y contrasta con la inmunidad producida por los virus sistémicos, como el polio, rubéola, varicela y sarampión, que tienen un período de incubación más largo (7-14 días), y producen una inmunidad que dura toda la vida ⁸⁰. La inmunidad de la mucosa constituye una defensa muy importante en las infecciones intestinales producida por el rotavirus ⁸¹⁻⁸⁴.

La infección comienza con la unión de los rotavirus a receptores específicos en las células epiteliales. Luego los virus se replican y hacen contacto con las células M que los transportan a las Placas de Peyer donde son presentados por los macrófagos, las células B y otras células presentadoras de antígenos (células dendríticas) a las células vírgenes (Th0). Después de haber sido activadas estas células (Th2), ellas inician la expansión clonal de las células B virus específicas y de las células precursoras de los linfocitos T citotóxicos (LTCp) ⁸⁰. Las células B virus específicas y las LTCp penetran los nódulos linfáticos, llegan al sistema circulatorio vía el ducto toráxico para luego regresar al lugar de origen donde fueron estimulados o a sitios asociados a respuesta efectora en la lámina propia del intestino. Se sabe que este regreso a lámina propia es selectivo y mediado por receptores en los linfocitos T (integrinas) y en células endoteliales (glicoproteína) ⁸⁵. En esta zona, tanto la secreción de IgA por las células B diferenciadas (células plasmáticas) como la diferenciación de las LTCp en linfocitos T citotóxicos CD8* efectores son inducidas por citocinas ⁸⁰. Las citocinas que inducen la secreción de IgA específica por las células plasmáticas son las interleucinas (IL-4,IL-5 y IL-6). La diferenciación de las células B virus específicas en células IgA secretoras (IgA-s) es un proceso que toma de 3-5 días después del período de incubación ⁸¹. La IgA dimérica se ubica en la superficie basolateral de la vellosidad, adquiere la fracción secretora en el citoplasma y es excretada al lumen intestinal. El mecanismo por el cual la IgA elimina al virus es mediante su unión con el antígeno (interferencia conformacional) bloqueando la unión del virus a los receptores celulares y, por ende, su entrada a la célula. También se ha postulado que la IgA puede actuar intracelularmente ⁸⁶. El interferon y la interleucina IL-2 son las citocinas que promueven la maduración de los CTLp a CTL efectores. La CTL específicas y efectoras residen en la vellosidad intestinal mientras que las células B específicas y las CTLp permanecen en la lámina propia. Así que, mientras las Placas de Peyer son el principal lugar para la inducción de la respuesta inmune, la lámina propia es el principal lugar para la maduración de las células específicas transformándose en efectoras.

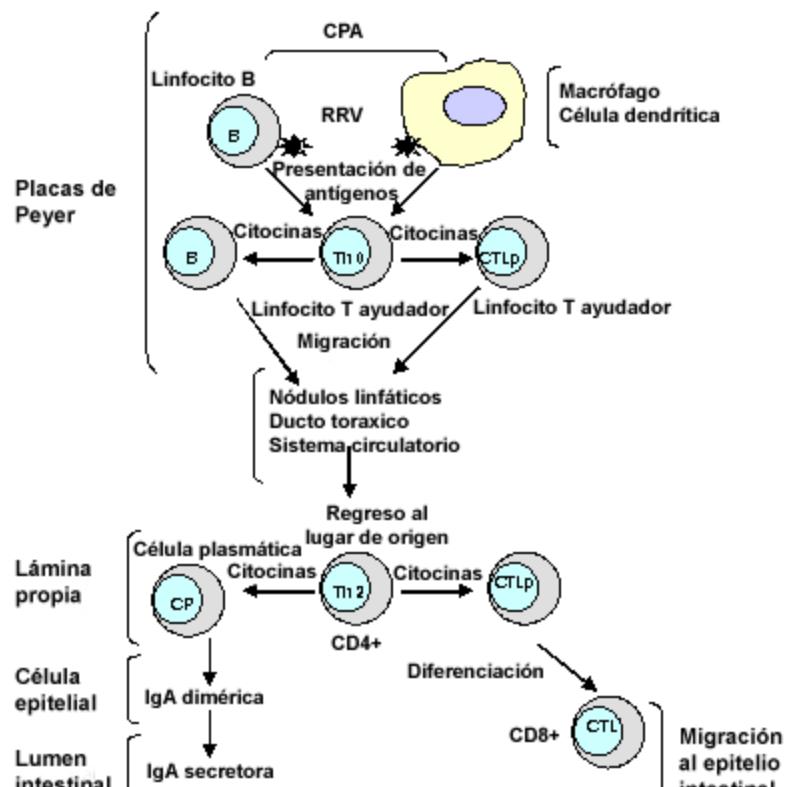


Figura 5: Inmunidad en la infección por rotavirus
Adaptado de Offit, 1996

La desventaja de la inmunidad de mucosa es su corta duración, pero se compensa con una rápida respuesta anamnésica en contactos posteriores -re-expozición- con el antígeno. Cuando este sistema no es estimulado, los anticuerpos disminuyen con el tiempo y su acción protectora mengua de 6 a 12 meses posteriores al contacto viral. Otra desventaja es la posibilidad de presentar dificultades en la respuesta a los antígenos administrados por la vía parenteral. Pero, en el caso de los rotavirus, los estudios hasta el momento indican la producción de una adecuada respuesta sérica a la inmunización parenteral en animales^{87,88}.

Infección natural y protección clínica

El papel protector de la inmunidad inducida durante la infección natural por rotavirus ha sido demostrado ampliamente en varios estudios, que constituyen las bases para el desarrollo de vacunas contra este agente viral. El primer estudio fue llevado a cabo por la Dra. Bishop en

⁸⁹ Australia, en el cual se demuestra que neonatos infectados con rotavirus durante el primer mes de la vida -seguidos por 3 años- son protegidos contra la enfermedad severa, aunque no así contra re-infecciones; mientras que los neonatos no infectados sufrieron diarreas severas por rotavirus en una significativa mayor proporción que los neonatos infectados. Estudios posteriores, realizados en neonatos en la India⁹⁰ y, en niños lactantes, también confirmaron que la infección primaria protege contra la diarrea severa en contactos posteriores con el virus^{91,92}. Posteriormente, un estudio de la historia natural de la infección por rotavirus -el primero de su tipo-, realizado con 200 niños mexicanos, seguidos por 2 años, confirmó estas observaciones⁴⁰. Este estudio mostró que después de la primera infección natural, independientemente de la severidad, el 88% de los niños quedaron protegidos contra las diarreas severas, 75% fueron

protegidos contra las diarreas de cualquier severidad y 40% de los niños quedaron protegidos contra subsecuentes infecciones. Con el aumento del número de infecciones -dos, tres o cuatro- se incrementa el grado de protección, pero se necesitan al menos dos infecciones, sintomáticas o asintomáticas, para prevenir la enfermedad por rotavirus de cualquier severidad ⁴⁰. Es decir que la infección natural no protege contra re-infecciones pero disminuye significativamente la severidad de la enfermedad. Estos resultados fueron también corroborados en un estudio realizado en África, donde se mostró que la infección primaria confiere 70% de protección clínica ³⁹. La epidemiología de la enfermedad por rotavirus, que muestra que ellos son causa importante de enfermedad en los primeros años de la vida, confirma estos hallazgos. Varios estudios muestran que la primera infección ocurre en los primeros dos años de vida y está generalmente asociada a diarrea severa, mientras que las re-infecciones se presentan en edades posteriores, durante toda la vida, y son leves o asintomáticas ^{20,33,37}. Estudios en Venezuela muestran que la severidad de la diarrea por rotavirus disminuye con la edad ^{4,14}. Igualmente, se han descrito diarreas recurrentes causadas por el mismo o diferente serotipo de rotavirus ⁹³⁻⁹⁵, sin embargo, el segundo o tercer episodio de diarrea presenta una clínica muy leve, en la mayoría de las ocasiones ⁹⁵. Estos resultados tienen importantes implicaciones en el desarrollo de una vacuna para rotavirus, ya que la vacuna tendría impacto, fundamentalmente, en la mortalidad y en la enfermedad severa emulando la infección natural ^{80,81}.

Inmunidad mediada por anticuerpos y protección

La infección por rotavirus induce inmunidad mediada por anticuerpos específicos IgM, IgG e IgA que pueden ser detectados de los 7 a 28 días post-infección en suero, saliva, contenido duodenal y heces ^{20,96-99}. De esta manera, los virus que infectan las mucosas, como los rotavirus y virus respiratorios, inducen una respuesta local tipo IgA secretora (IgA-s), factor primordial en la defensa de la mucosa intestinal o vías respiratorias, según el caso. Por otro lado, las proteínas de la capa externa, VP4 y VP7, inducen anticuerpos neutralizantes (IgG) 66,100, y la proteína VP6, ubicada en la capa intermedia, así como la proteína no estructural NSP4, son también inmunogénicas ^{101,102}.

En general, anticuerpos neutralizantes (IgG) homotípicos a la VP7, y en menor proporción a la VP4, aparecen después de la primera infección ^{38,103-106}. En cambio, la re-infección estimula la aparición de anticuerpos heterotípicos contra la VP7 y VP4 ^{38,41,80,103}. Lo que quiere decir que la inmunidad producida durante el primer contacto con el virus es principalmente homotípica y la respuesta inmune heterotípica aparece con la edad como resultado de posteriores exposiciones al virus, tanto en niños infectados en forma natural como en niños vacunados ^{38,104,105,107,108}. Estos resultados apuntalan o sostienen la necesidad de sufrir, al menos, 2 infecciones para producir una respuesta inmune de amplio espectro, lo que implicaría la necesidad de administrar 2 dosis de la vacuna.

En la actualidad, la relación entre inmunidad mediada por anticuerpos y protección es motivo de controversia y su definición es crítica para el desarrollo de una vacuna. La correlación entre protección e IgA-s específica en el intestino (S-IgA) ha sido demostrada ^{81-83,97}. Sin embargo, su presencia en el intestino es de corta duración - menor de 1 año – ^{82,83,96}, lo que explicaría la

aparición de episodios recurrentes ^{82,84,109}. Se ha postulado que la IgA en suero y en heces podrían ser buenos predictores de la S-IgA secretora ⁹⁶⁻⁹⁸ y, en consecuencia, buenos marcadores para los estudios de vacuna. En la infección natural por rotavirus, se ha demostrado que la protección clínica es mediada por IgA específica en suero ^{105,110-112} y en heces ^{82,83}, aunque se ha reportado que la IgA en heces podría ser mejor predictor de respuesta inmune de tipo protector que la sérica ¹¹³. Sin embargo, no se ha demostrado el papel protector de la IgA sérica en niños vacunados ^{112,114-116} y en heces no ha sido evaluada. En este sentido, es de alta prioridad dirigir las investigaciones para encontrar mejores marcadores inmunológicos en la inmunización activa ¹¹⁷. Sin embargo, hasta ahora, la respuesta IgA sérica es el ensayo estándar, requerido por los organismos internacionales, para predecir protección, en los ensayos de campo con la vacuna de rotavirus.

El papel protector de los anticuerpos neutralizantes serotipo específicos en suero tampoco está completamente definido. Hay trabajos que reportan una asociación entre protección y títulos pre-existentes homotípicos en suero anti-VP7 ^{38,105-106}, pero otros estudios no muestran esta correlación ¹¹⁸, así como tampoco estudios con niños vacunados ^{119,120}; más bien, se ha demostrado protección heterotípica contra infecciones por rotavirus humanos, en niños vacunados con cepas animales - bovinas- que no comparten el serotipo con las cepas humanas ^{64,119,121,122}.

La baja frecuencia de rotavirus asociado a diarrea severa en niños de 0 a 2 meses de edad ^{9,37,39} confirma que los anticuerpos de origen materno, tipo IgG neutralizantes homotípicos o anticuerpos presentes en la leche materna, confieren protección clínica ^{38,123,124}. Estudios en animales también confirman la protección clínica conferida por la inmunidad pasiva de origen materno ¹²⁵. También, se ha observado que la administración oral de anticuerpos específicos antirotavirus a niños inmunosuprimidos e inmunocompetentes produce una recuperación más pronta al compararlos con niños no tratados ^{11,41}.

En síntesis, hasta el momento, no existen acuerdos definitivos sobre la correlación entre inmunidad mediada por anticuerpos y protección, aunque las diferencias metodológicas y la variabilidad en el tipo de muestra, utilizada en la mayoría de los trabajos, podrían explicar la diversidad de resultados ¹²⁶. Adicionalmente, la información obtenida hasta el momento, muestra cierta utilidad - además es la única disponible de fácil uso- de la inmunidad por anticuerpos para predecir eficacia en la infección natural, pero se necesitan estudios adicionales que definan mejor el papel protector de los anticuerpos en la inmunización. Además, pareciera, que la presencia de anticuerpos específicos, en el intestino y en cantidad suficiente - sean estos IgA, IgG o neutralizantes-, es crítica para que se produzca el efecto protector ¹²⁶.

Los resultados contradictorios, en los niños vacunados, complican el logro de marcadores inmunológicos adecuados para predecir el grado de protección, aunque pudieran ser explicados en parte, por el limitado conocimiento de la inmunidad inducida por cepas animales o virus rearreglados, en la inmunización en humanos ¹²⁶. También, se ha sugerido la posibilidad de utilizar la cuantificación de las células secretoras de anticuerpos circulantes (CSAs), que son un

reflejo de la inmunidad intestinal, o de células de memoria, rotavirus específicas T y B en suero, como marcadores que puedan predecir la potencia y eficacia de una vacuna ¹¹⁷.

Inmunidad mediada por células y protección

Ambos componentes de la inmunidad, la mediada por anticuerpos y la mediada por células, cumplen una función en la protección clínica del rotavirus ^{80,124,127}. Los componentes de la inmunidad mediada por células que participan en la protección y la actividad viral, en humanos y animales, son: células natural killer (NK), linfocitos T citotóxicos (LTCs), las citocinas y otros productos químicos ¹²⁸. Los LTC específicos ejercen su actividad antiviral a través de la lisis directa, la inducción de apoptosis y la producción de citocinas. Las células NK destruyen la célula infectada y las citocinas tienen funciones críticas en la regulación de la respuesta inmune, y actúan por actividad citotóxica y por mecanismos no citopáticos que eliminan al virus sin destruir la célula infectada.

La inmunidad mediada por células LTC ha sido primordialmente estudiada en modelos animales infectados con rotavirus ^{80,129} y se conoce poco de ella en humanos. Hasta el momento, se sabe que la inmunidad mediada por células tiene más que ver con la recuperación de la enfermedad que con la prevención. En la infección por rotavirus, la participación de las CTCs, particularmente las CD8 ha sido demostrada ^{80,127,129}, pero también se ha planteado la participación de las CD4 ¹²⁷. Las citocinas, células NK y otros productos inmunológicos también juegan un papel en la resolución de la enfermedad. Se ha demostrado el papel protector de las células LTC en ausencia de IgA en la clínica de ratones con infección natural ¹³⁰, y en ratones vacunados ^{41,131}. También por otro lado, se ha mostrado la presencia de citocinas, en mayor cantidad en la inmunización cuando se compara con la infección natural, lo que podría explicar el efecto protector de las citocinas o células NK en niños vacunados, en las cuales no se ha demostrado efecto protector mediado por anticuerpos ⁴¹.

Igualmente, la modificación del curso de la enfermedad depende de la diferenciación de las células B de memoria en células B secretoras de anticuerpos ⁸¹, lo que se explica, entre otras razones, por el corto período de incubación que tiene el rotavirus ⁸⁰. En ratones, las células de memoria B, o la primera línea de defensa en la re-infección, y las LTC, que median, acortando el proceso de la infección, aparecen 3-4 días después de la infección y posiblemente sean las células primarias efectoras las que participan en los mecanismos de defensa ⁸¹. En resumen, las células B y T participan eliminando la viremia en la infección primaria y protegen contra re-infecciones, y las células T, particularmente las CD8, parecen acelerar la eliminación del virus; mientras que los anticuerpos median la protección contra la re-infección y también ayudan a la resolución de la enfermedad ^{127,129}.

Recientemente, el Dr. Franco y colaboradores caracterizaron las células T en humanos ^{85,132,133}. Ellos demostraron la presencia de células T rotavirus específicas productoras de interferón gamma, en adultos y niños infectados con rotavirus. Estas células son en su mayoría del tipo CD8+ y expresan el receptor integrina, lo que indica su origen intestinal ^{132,133}. Pero esta respuesta es menor que la inducida por los virus sistémicos, como el citomegalovirus ⁸⁵. También pareciera que el interferón no juega un papel en la infección por rotavirus ⁸¹. Sin

embargo, se necesitan futuros estudios para clarificar mejor el papel inmune de las células B y T en la infección por rotavirus inducida por virus salvaje o por vacuna.

Por último, los hallazgos recientes sobre el papel patogénico e inmunológico de la proteína NSP4 y el mecanismo de protección viral asociado a la proteína VP6 abren nuevos caminos en la investigación sobre la inducción de inmunidad mediada por anticuerpos o por células en la infección por rotavirus. Recientemente, se encontró que la proteína no estructural NSP4 tiene la capacidad de producir diarrea - actúa como una enterotoxina y produce diarrea en ratones- y de inducir anticuerpos protectores en ratones⁵⁷. Estas investigaciones mostraron que la proteína NSP4 induce una respuesta humoral y es capaz de producir una respuesta celular que posiblemente involucre células T citolítica¹⁰¹. Por otro lado, también se demostró que la proteína VP6, localizada en la capa media del virus, es capaz de inducir inmunidad protectora en ratones - anticuerpos no neutralizantes IgA anti-VP6- y de modificar la infección en ratones inmunodeficientes por inactivación del virus durante la transcitosis en el medio intracelular¹⁰². Este mecanismo intracelular de neutralización viral podría explicar la protección heterotípica en la infección natural y durante la inmunización activa con vacunas observada en algunos estudios¹³⁴. Estos hechos presentan nuevos caminos para el entendimiento de la inmunidad del rotavirus y añaden otras posibilidades para el desarrollo de vacunas que, además, en el caso de la proteína VP6, tendría la ventaja de ser común a los rotavirus del grupo A.

CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD POR ROTAVIRUS

Las vacunas constituyen la estrategia más eficaz para el control de los agentes infecciosos que son la primera causa de muerte en el mundo. El efecto potencial de una vacuna de rotavirus, segura y eficaz, en reducir la mortalidad y la hospitalización por este virus, ha sido ampliamente reconocida^{33,135,136}. A comienzos de la década de los '80, cuando se comprueba el impacto de la diarrea por rotavirus en los niños menores de 5 años, se justificó la necesidad de su control y, desde entonces, se han dedicado muchos esfuerzos en investigación para lograr una vacuna. En el marco de las estrategias de salud pública de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y, más recientemente, de la "Global Alliance for Vaccines and Immunization" (GAVI), se establece como prioridad apoyar la elaboración de la vacuna contra el rotavirus. Sin embargo, el retiro del mercado de la primera registrada de rotavirus, RRV-TV, en EE.UU, como consecuencia de su asociación con invaginación intestinal^{137,138}, ha modificado la orientación de las estrategias de producción y de mercadeo de esta vacuna. Ahora los esfuerzos se dirigen a los países en desarrollo donde su aplicación tendrá un beneficio muy apreciable. También, es imperativo resolver el problema de la seguridad de la vacuna antes de su introducción al Sistema Ampliado de Inmunización (PAI)¹³⁶.

Estrategia Jenneriana y vacunas monovalentes de origen animal

La primera estrategia de vacuna anti-rotavirus se realizó sobre la base del enfoque que Jenner, en 1798, empleó en la vacuna antivariólica que consiste en la utilización de una cepa de virus vivo, proveniente de un huésped animal/heterólogo, antigénicamente relacionada con los virus humanos, pero atenuada para el hombre. Las cepas de rotavirus animales comparten especificidades antigenicas con las humanas, son capaces de infectar pero no enfermar al hombre y, además, tienen la ventaja de crecer muy eficientemente en cultivo celular, lo que

facilita su producción a gran escala. Este enfoque partió de estudios que mostraron la capacidad de la cepa bovina (NCDV) de inducir protección cruzada contra rotavirus humanos en terneros recién nacidos¹³⁹, y en estudios realizados en animales que presentaron una respuesta inmune a virus heterólogo después de ser inoculados con cepas de rotavirus^{140,141}. Estudios en voluntarios adultos demostraron también la existencia de protección clínica y de respuesta inmune heterotípica¹⁴². En ese momento, se decidió administrar la vacuna por vía oral debido a la importancia de la inmunidad local en la infección intestinal como ocurre con el virus de polio¹⁴³.

La primera prueba de campo para evaluar una vacuna para los rotavirus se realizó con la cepa bovina NCDV (RIT-4237), luego le siguieron las pruebas con la cepa de mono (RRV). Posteriormente, se probó otra cepa bovina, NCDV (WC3-G6P5). La cepa NCDV, desarrollada como vacuna RIT-4237 por Smith&Kline Beecham, pertenece al serotipo G6 no identificado en las cepas humanas. Es la primera vacuna probada en humanos, y cuando se administró por vía oral, a adultos y niños, resultó ser inmunogénica, inocua y altamente eficaz en países desarrollados^{120,122}, pero pruebas con la vacuna en Gambia, Perú, Rwanda y en una población indígena de EE.UU, mostraron poca o ninguna eficacia; motivo por el cual las pruebas de investigación con esta vacuna fueron descontinuadas^{121,122,144}. Los ensayos con la vacuna monovalente RIT-4237 demostraron que una dosis de una vacuna oral de virus vivo confiere protección contra las diarreas severas, induce algún grado de protección heterotípica, pero no determinaron la existencia de correlación entre respuesta neutralizante y protección^{120,122}.

Poco tiempo después, a principios de la década de los 80', comenzaron los estudios con la cepa de mono (RRV – MMU-18006) que tenía la ventaja de compartir el serotipo G3 de la proteína VP7 con uno de los rotavirus humanos más frecuente. Esta vacuna fue desarrollada en los Institutos Nacionales de Salud (NIH), EE.UU, por el Dr. Albert Kapikian y colaboradores, quienes trasfirieron la patente de la vacuna a un laboratorio con fines comerciales^{63,144}. Los resultados de las pruebas de campo con una dosis de esta vacuna fueron variables e inconsistentes en ciertos casos y en el único país (Venezuela) donde la vacuna fue eficaz, circuló fundamentalmente el serotipo G3, similar al de la vacuna, lo que indicó que la protección inducida por la vacuna era principalmente homotípica²¹. En este estudio de Venezuela, también se observó que la vacuna es más eficaz contra las diarreas de mayor severidad y cuando es administrada a niños de 2, 3 y 4 meses de edad^{21,145}. Para ese momento, se conocía muy poco sobre la historia de la inmunidad en la infección natural por rotavirus.

La tercera vacuna (WC3) probada en campo es la cepa bovina NCDV. Esta cepa es igual pero menos atenuada que la RIT-4237, y pertenece al serotipo G6P5. La vacuna WC3 fue desarrollada por el Dr. Clark y colaboradores en el Wistar Institute, Philadelphia, EE.UU, disminuyendo el número de pasajes en cultivo celular para incrementar su virulencia⁶⁴. Los resultados de las pruebas de campo con una dosis de esta vacuna monovalente han sido muy variables y comparables a los obtenidos con la vacuna RIT-4237^{41,64,146}. La eficacia en los países desarrollados (EE.UU) fue muy buena, pero no así los resultados en países en desarrollo (República de África Central y China), donde la eficacia fue muy pobre^{41,119}. Con esta vacuna tampoco se evidenció correlación entre respuesta inmune humoral y protección.

Otra vacuna candidata es la cepa animal LLR (G1) de cordero, desarrollada en la China que se encuentra en estudios fase II, pero su debilidad consiste en que todas las pruebas de campo han sido realizadas en la China y sus resultados no han sido confirmados en otros países³³.

Estrategia Jenneriana modificada y vacunas polivalentes - recombinantes de origen animal

Los resultados poco satisfactorios con las vacunas monovalentes para inducir protección heterotípica, hicieron que se encaminaron los esfuerzos a desarrollar el enfoque denominado "Jenneriano Modificado", el cual parte de la capacidad que tienen los rotavirus de experimentar rearreglo génico¹⁴⁷. De esta manera, en el NIH y en el Wistar Institute, se construyeron cepas híbridas, a partir de la co-infección de virus humanos y animales en cultivos celulares. En el proceso, los genes que codifican para las proteínas VP7 o VP4 de las cepas animales, RRV (simia) o NCDV (bovina), son sustituidos por los correspondientes genes de rotavirus humano^{63,64,144}. Estos virus expresan las especificidades antigenicas de tipo neutralizante para cada uno de los serotipos humanos, en un marco genético de origen animal, que le permite conservar la atenuación o ausencia de virulencia en el hombre, y, a la vez, inducir inmunidad neutralizante contra las proteínas antigenicas de las cepas humanas. De esta manera, se obtuvo la vacuna tetravalente recombinante (RRV-TV) con la cepa de mono RRV (G3P5) y tres cepas rearregladas pertenecientes a los serotipos G1 (RRV x D), G2 (RRV x DS1) y G4 (RRV x ST3)⁶³. Este enfoque también fue utilizado para la vacuna WC3 polivalente por el equipo del Dr. Clark, quién a partir de la cepa WC3, construyó una vacuna cuadrivalente-recombinante con los siguientes virus rearreglados: WI79-9 – G1P5; SC2-9 - G2P5; WI78-8 – G3P5 y WI79-4 - G6P8⁶⁴. Esta vacuna contiene además la proteína VP4 de origen humano, la otra proteína con capacidad neutralizante, y la patente es propiedad de los Laboratorios Merck Sharp Dohme.

Antes de aplicar la vacuna tetravalente (RRV-TV), primero se probaron los virus re-arreglados (o "reassortant") de la cepa RRV, en forma individual o combinadas en vacunas bivalentes y trivalentes, con excelentes resultados en EE.UU, Finlandia, Perú y Venezuela^{122,144,148-150}. Los estudios realizados con los virus rearreglados, administrados individualmente en EE.UU y Finlandia, mostraron la ausencia de correlación entre serorespuesta y protección^{114,122}. En Perú, la protección inducida por los virus rearreglados administrados individualmente fue nula¹⁵⁰.

Para llegar a la óptima vacuna tetravalente RRV-TV, se probaron, en Venezuela, diferentes concentraciones de cada virus en la mezcla (4 cepas)¹⁵¹. También, en este mismo país se experimentó con una, dos y tres dosis de la vacuna tetravalente¹⁵²⁻¹⁵⁴. Los resultados de estos estudios indicaron que la vacuna RRV-TV producía fiebre (10-15%), con frecuencia similar a la reportada con la cepa RRV, y, además, la respuesta neutralizante contra cada uno de los cuatro serotipos aumentó significativamente así como la respuesta IgA. De modo que se realizaron estudios de eficacia con varias concentraciones de esta vacuna en Perú, Brasil, EE.UU, Finlandia, y Venezuela^{116,155-160}. Los resultados de Finlandia, EE.UU y Venezuela fueron muy alentadores, la vacuna indujo alta protección contra las diarreas severas (64% - 100%), y menor protección contra las diarreas de distinta severidad causadas por rotavirus (48% - 68%). Sin embargo, los resultados de Perú y Brasil no fueron muy prometedores (40% - 46%) en la protección contra las diarreas severas. Un análisis posterior de los datos de los estudios de Brasil y Perú, donde utilizaron concentraciones inferiores, muestran que los resultados desalentadores están asociados a la metodología utilizada y no a condiciones de la vacuna¹⁶¹. En estos países, la muestra, adecuada

para un seguimiento longitudinal, fue muy pequeña, por lo que se detectaron muy pocos casos severos que no permitieron emitir conclusiones definitivas.

País	Edad (meses)	No de Niños V/P	Cepas aisladas	Eficacia % (C.I)	
				Todas las diarreas por Rotavirus	
EEUU	1-6	398/385	G1G3	49(31,63)	80(56,91)
EEUU	1-6	350/358	G3	50(26,67)	69(29,88)
Finlandia	2-5	1191/1207	G1G4	69(58,76)	91(82,95)
Venezuela	2-4	1112/1095	G1	48(33,61)	88(61,96)

Tabla 2. Eficacia de 3 dosis de la vacuna RRV-TV de rotavirus en pruebas realizadas en EEUU, Finlandia y Venezuela

Nota: RRV-TV título: (4 x 105 PFU); V = vacunados y P = placebos.

Un hallazgo interesante en el estudio de Venezuela con la vacuna RRV-TV fue la transmisión horizontal del virus de la vacuna, que se detectó coinfectando durante la infección natural con virus salvaje (14%), tanto a niños vacunados (15%) como a los placebos (13%)^{160,162}. Esta es una observación interesante, porque podría suceder lo mismo que ocurre con la vacuna del polio, que produce inmunidad de rebaño¹⁶². Este tipo de inmunidad también ha sido reportado durante la infección natural de rotavirus y podría jugar un papel importante en la aplicación de rutina de la vacuna oral de rotavirus³⁴. El estudio de Venezuela, fue el más grande y exitoso que se realizara con la vacuna RRV-TV en un país en desarrollo y fue un pilar fundamental para obtener la licencia en EE.UU.

Otros aspectos críticos para los ensayos con esta vacuna son la posible interferencia de la lactancia materna y la vacuna de polio (OPV), al aplicarse simultáneamente con la vacuna de rotavirus. Al evaluar la interferencia con OPV, se observó una leve disminución de la respuesta inmune a la vacuna de rotavirus después de la administración de la primera dosis, no así en la respuesta inmune a la OPV. No obstante, esta interferencia se elimina después de la aplicación de la segunda y tercera dosis de la vacuna rotavirus^{163,164}. También, se observó que la pequeña tendencia de la leche materna a disminuir la serorespuesta de la vacuna desaparecía en la tercera dosis¹⁶⁴. En conclusión, no es necesario suspender la lactancia materna ni la vacuna OPV para aplicar la vacuna de rotavirus RRV-TV.

El éxito de la vacuna RRV-TV en Norte-América, Finlandia y Venezuela permitió la licencia de la vacuna otorgada por la Food and Drug Administration (FDA) en EE.UU, el 31 de Agosto de 1998, doscientos años después del descubrimiento de la primera vacuna en el mundo. Pero, 11 meses después de su aplicación, esta vacuna fue retirada del mercado en USA, debido a la asociación entre la aplicación de la vacuna e invaginación intestinal, pero la vacuna todavía conserva la licencia^{137,138,165}.

Paralelamente, se realizaron los estudios con la vacuna WC3. Primero se hicieron los estudios individuales con cada cepa viral rearreglada (bovina-humana-WC3) con resultados pobres, pero la respuesta inmune mejoró sustancialmente cuando se daban mezclados. Luego se continuó con la vacuna cuadivalente WC3-QV, con muy buenos resultados y similares a los de la vacuna

RRV-TV. Los estudios de eficacia con tres dosis de esta vacuna en EE.UU muestran una protección contra todas las diarreas por rotavirus de 67% y contra las diarreas severas de 69% 41, pero se necesitan más pruebas de campo en países en desarrollo. En la actualidad, el desarrollo de esta vacuna es orientado para ser aplicada, primordialmente, en países desarrollados. En EE.UU, se están realizando estudios de seguridad y eficacia, a gran escala, para evaluar el riesgo de invaginación intestinal con la vacuna WC3-QV.

Finalmente, otra vacuna, elaborada sobre la base de esta estrategia y probada en campo, es la cepa "re-arreglada UK (humano-bovino) desarrollado por Kapikian y colaboradores¹⁶⁶. Tres dosis de la vacuna cuadrivalente, compuesta por 4 virus recombinantes que contienen los 4 serotipos más frecuentes (G1,G2,G3 y G4), fue evaluada en adultos, niños y lactantes en EE.UU. La vacuna es segura e inmunogénica, pero se necesitan estudios futuros para evaluar su eficacia¹⁶⁷.

Invaginación intestinal y vacuna de rotavirus

La invaginación intestinal es una patología muy rara de naturaleza idiomática, que consiste en el plegamiento intestinal de una sección dentro de otra como resultado de una alteración de la peristálisis. La invaginación intestinal es la causa más común de obstrucción intestinal en niños de 3 meses a 6 años de edad. El tratamiento es por reducción hidrostática - colon por enema- o con aire o por cirugía. Sus síntomas comprenden vómitos persistentes, heces sanguinolentas con apariencia de jalea de grosella, cólicos severos, distensión abdominal y se palpa una masa en muchos de los casos. La tasa de hospitalización por invaginación intestinal varía ampliamente en un mismo país, por ejemplo, en EE.UU varía de 18 a 56 x 100.000 nacidos vivos¹⁶⁸, igualmente, varía entre países. En el Reino Unido, la tasa es de 66 casos x 100.000 nacidos vivos¹⁶⁹, mientras que algunos países Asiáticos tienen tasas muy altas (100 casos x 100.000). En Venezuela, se detectó una tasa de 35 x 100.000 nacidos vivos, comparable a la de países desarrollados¹⁷⁰, y a la de otros países latinoamericanos, Chile y Perú - datos no publicados-.

Después de haber aplicado más de un millón y medio de dosis de la vacuna en EE.UU se encontró un riesgo promedio de sufrir esta complicación en aproximadamente 1 por cada 10.000 niños vacunados, particularmente durante la primera o segunda semana después de la primera dosis de la vacuna de rotavirus^{171,172}. Estudios posteriores, demostraron que la administración de la vacuna RRV-TV en EEUU incrementó, en niños vacunados, 8 veces la aparición de casos de invaginación intestinal en la primera semana post-vacunación, de acuerdo a lo estimado por el sistema Sistema de Reporte de Reacciones Adversas a Vacunas (VAERS) (Zanardi, 2001). Ahora, es más importante que nunca conocer las tasas de hospitalización por invaginación intestinal para poder hacer comparaciones durante las pruebas de campo con las próximas vacunas de rotavirus. Hasta el momento, no existen datos epidemiológicos que permitan asociar la infección natural por rotavirus con invaginación intestinal^{168,170,173}, por lo que se ha sugerido que sea el origen animal de la cepa vacunal - mono-simio-, la que pudiera estar relacionada con este evento adverso^{134,138}.

Este incidente cambió las estrategias de desarrollo y licencia de la vacuna de rotavirus en el mundo. Ahora, se están dirigiendo mayores esfuerzos para realizar las pruebas de campo y registrar la vacuna en países en desarrollo. Esto se debe a que el costo-beneficio es muy diferente entre países desarrollados y en desarrollo. Los países en desarrollo tienen una

necesidad muy grande de la vacuna porque la mortalidad por rotavirus es muy alta y, probablemente, el beneficio de su aplicación sería mayor que el riesgo de un evento adverso, tan serio como invaginación intestinal pero a la vez tan poco frecuente. Esto tiene que ver con la consecuencia del retiro del mercado de la vacuna, en los EE.UU. y en el mundo¹⁶⁵. Expertos en bioética cuestionan la suspensión de la administración de la vacuna también en países en desarrollo con alta mortalidad por rotavirus, como por ejemplo Bangladesh o Sur Africa, debido a que los beneficios de la vacuna superarían con creces sus efectos adversos. Por ello, se plantean hechos como el siguiente: "Algunos falsamente han asumido que la inacción es un estado moralmente neutro. Pero, si uno es culpable de muertes relacionadas con la vacuna, entonces uno también es culpable por las muertes causadas por dejar de aplicar la vacuna"¹⁷⁴.

Vacunas monovalentes de origen humano

La utilización de cepas de rotavirus aisladas de neonatos como vacunas potenciales tiene su fundamento en el estudio realizado por la Dra. Bishop en Australia que demostró protección clínica, durante los primeros 3 años de vida, inducida por la infección asintomática de rotavirus en recién nacidos⁸⁹. La primera cepa de rotavirus de un neonato (cepa M37 - G1P6), evaluada en pruebas de campo, fue aislada en Venezuela, en un recién nacido de la Maternidad Concepción Palacios, en Caracas^{35,100,175}. Varias dosis de la vacuna M37 fueron eficientes en inducir respuesta inmune homotípica pero no en inducir respuesta heterotípica^{152,153} y, además, la vacuna fracasó en producir protección en Finlandia¹⁷⁶. Otra estrategia similar es la vacuna RV3 (G3P6), una cepa neonatal aislada, desarrollada y probada en Australia³³. También en la India se está utilizando una cepa de neonato, pero se encuentra en los pasos iniciales del proceso de desarrollo³³.

Una de las vacunas que más promete, en la actualidad, es la vacuna oral desarrollada a partir de la cepa humana 89-12, serotipo G1P8, aislada de un niño con diarrea en Cincinnati y desarrollada por Ward y colaboradores y AVANT¹⁷⁷. Esta vacuna tiene la ventaja de ser una cepa humana atenuada, por múltiples pasajes en cultivo celular, cuya utilización no incrementa el riesgo al niño porque no se está aplicando nada diferente a lo que ocurre en la naturaleza. Además, no tendría el riesgo aparente de invaginación intestinal porque, como se sabe, la infección natural no está asociada a esta patología. Por otro lado, los estudios sobre la infección natural que indican que 2 infecciones confieren protección clínica⁴⁰, le dan base a esta estrategia que utiliza 2 dosis de una vacuna monovalente. Estudios de inmunogenicidad, reactogenicidad y eficacia con esta vacuna, en EE.UU, muestran que produce pocas reacciones - fiebre leve en 19%-; alta respuesta inmune - 94%- y una eficacia de 89% contra todas las diarreas por rotavirus y 100% contra las diarreas severas¹⁷⁸. Posteriormente, esta vacuna fue adquirida y modificada por un laboratorio y se denomina RIX 4414. Estudios en Europa, realizados en adultos, niños y lactantes mostraron que esta vacuna es inmunogénica y menos reactogénica que la cepa original¹⁷⁹. En Finlandia, 2 dosis de esta vacuna aplicada a niños a los 2 y 4 meses de edad demostraron que la vacuna es inmunogénica, segura y eficaz en un 90% contra las diarreas severas¹⁸⁰. Estudios posteriores - dos dosis aplicadas a los 2 y 4 meses de edad-, realizados en 3 países latinoamericanos - Brasil, México y Venezuela- confirmaron estos resultados. La vacuna RIX 4414 es inmunogénica¹⁸¹ y eficaz -77%- contra las diarreas severas y en 79% contra las hospitalizaciones¹⁸². Esta vacuna confirió protección homotípica -77%- y heterotípica - 79%- contra las diarreas severas causadas por serotipos G1 y G9, respectivamente¹⁸³. Estudios de

seguridad a gran escala - fase III- son necesarios para responder el problema de la vacuna de rotavirus y la invaginación intestinal.

Otras estrategias de vacunas anti-rotavirus

El progreso en el área molecular de los rotavirus ha sido sorprendente y posibilitará el avance en el desarrollo de vacunas. Las vacunas desarrolladas sobre la base de la administración de virus o ADN microencapsulados ¹⁸⁴, de partículas "virus-like" ^{87,185}, de cepas adaptadas para crecer a bajas temperaturas y las vacunas inactivadas o intradérmicas ^{88,186}, que han sido probadas con éxito en modelos animales posibilita el alcance de estas nuevas estrategias. Por otro lado, la incorporación de los hallazgos recientes en el desarrollo de vacunas - como la capacidad neutralizante de la proteína VP6 y la actividad toxigénica de la proteína NSP4 - podría acelerar el proceso del desarrollo de vacunas de segunda y tercera generación.

Hasta ahora, el enfoque empírico en el desarrollo de estas vacunas ha tenido un éxito parcial. Es interesante que esto haya ocurrido sin el conocimiento suficiente de la inmunidad y fisiopatología de la enfermedad. Pero, el conocimiento, relativamente reciente, de la inmunidad conferida por la infección natural ha permitido la posibilidad de mejorar los resultados que le abren camino a nuevas vacunas. También, se ha comprobado que se necesita mayor conocimiento sobre la epidemiología de los rotavirus y de la invaginación intestinal en los países en desarrollo para optimizar el desarrollo de la vacuna de rotavirus.

REFERENCIAS

1. Guerrant RL, Kosek M, Moore S, Lorntz B, Brantle R, Lima AAM. Magnitude and impact of diarrheal diseases. *Arch Med Res* 2002; 33:351-355.
2. Guerrant RL, Schorling JB, McAuliffe JF, De Souza MA. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47:28-35.
3. Pérez-Schael I, Dehollain P, Pérez M, Daoud N, Soto de Sanabria I, González M, "et al". Impacto de las enfermedades diarreicas en el estado nutricional del niño. *Ann Ven Nutr* 1988; 1:119-128.
4. Arrestarazu MI, Liprandi F, Pérez de Suárez E, González R, Pérez-Schael I. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Pan Am J Public Health* 1999; 6:149-156.
- Murray CJL, López AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349:1498-1504.
5. Bern C, Martines J, Zoysa de I, and Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull WHO* 1992; 70:705-714.
6. Bern C, Glass RI. Impact of diarrheal disease worldwide. In: *Viral infection of the gastrointestinal tract*. Ed by Kapikian AZ. 2nd edition. Marcel Dekker. New York, 1994: pp.1-26.
7. Black RE. 1993. Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. *Vaccine* 11:100-106.
8. Unicomb LE, Kilgore PE, Faruque ASG, Hamadani JD, Fuchs GJ, Albert MJ, "et al". Anticipating rotavirus vaccines: hospital-based surveillance for rotavirus diarrhea and estimates of disease burden in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:947-951.

9. Molback K, Wested N, Hojlyng N, Scheutz F, Gottschau A, Aaby P, "et al". The etiology of early childhood diarrhea: a community study from Guinea-Bissau. *J Infect Dis* 1994; 169: 581-587.
10. Linhares AC, Bresee JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Pan Am J Public Health* 2000; 8:305-331.
11. MSAS. Snuario de epidemiología del Ministerio de Salud y Desarrollo Social. 2001.
12. Pérez-Schael I. The impact of rotavirus disease in Venezuela. *J Infect Dis* 1996; 74:S19-21.
13. Salinas B, González G, González R, Barrios I, Materán M, Pérez-Schael I. Epidemiological and clinical characteristics of rotavirus disease in Venezuelan children < 5 years old. III World Congress of Pediatric Infectious Disease- WSPID, Chile, 2002; pp: 86,
14. Pérez-Schael I, Salinas B, Escalona M, González G, Barrios I, Materán M. Rotavirus mortality in Venezuelan infants. III World Congress of Pediatric Infectious Disease- WSPID Chile, 2002; pp: 87
15. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; 2:1281-1283.
16. Glass RI, Kilgore PE, Holman RC, Jin S, Smith JC, Woods PA, "et al". The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden. *J Infect Dis* 1996; 174:S5-11.
17. Institute of Medicine. The prospects for immunizing against rotavirus. In: New vaccine development: establishing priorities. Diseases of importance in developing countries. Vol 2 Washington, DC: National Academy Press, 1986:308-318.
18. Bishop RF. Development of candidate rotavirus vaccines. *Vaccine* 1993; 11:247-254.
19. Bishop RF. Natural history of human rotavirus infections. In: Viral infections of the gastrointestinal tract. Ed by Kapikian AZ. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York, 1994:pp:131-167.
20. Pérez-Schael I, García D, González M, González R, Daoud N, Pérez M, "et al". Prospective study of diarrheal diseases in venezuelan children to evaluate the efficacy of rhesus rotavirus vaccine. *J Med Virol* 1990; 30:219-229.
21. Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull WHO* 1990; 68:171-177.
22. Matson DO. 1999. Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Sumary. www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/00056669.htm.
23. Esparza J, Viera de Torres B, Piñero A, Carmona FO, Mazzali de Ilja R. Rotaviruses in venezuelan children with gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26:148-151.
24. Pérez-Schael I, Rojas AM, Flores J. Desarrollo de una vacuna anti-rotavirus. Pruebas de campo en Venezuela. *Act Cient Venez* 1991; 42:296-312.
25. Maldonado AJ, Bastardo JW. Epidemiología molecular de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Act Cient Venez* 1992; 43:368-372.
26. Urquidi V. Molecular epidemiology of human rotavirus infection in Coro, Venezuela. *Act Cient Venez* 1989; 40:33-39.
27. Vesikari T, Rautanen T, Von Bonsdorff C-H. Rotavirus gastroenteritis in Finland: burden of disease and epidemiological features. *Acta Paediatr Suppl* 1999; 426:24-30.
28. Ehrenkranz P, Lanata CF, penny ME, Salazar-Lindo E, Glass RI. Rotavirus diarrhea disease burden in Perú: the need for a rotavirus vaccine and its potential cost savings. *Pan Am J Public Health* 2001; 10:240-248.

29. Gómez JA, Nates S, Castagnaro N, Espul C, Borsa A, Glass RI. Anticipating rotavirus vaccines: review of epidemiologic studies of rotavirus diarrhea in Argentina. *Pan Am Public Health* 1998; 3: 69-78.
30. ORyan ML, Pérez-Schael I, Mamani n, Peña A, Salinas B, González G, "et al". Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. *Pediatric Infect Dis J* 2001; 20:685-693.
31. Matson DO, Estes MK.. Impact of rotavirus infection at a large pediatric hospital. *J Infect Dis* 1990; 162:598-604.
32. Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsch JR. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. *Vaccine* 1999; 17:2207-2222.
33. Jacobson RM. The current status of the rotavirus vaccine. *Vaccine* 1999; 17:1690-1699.
34. Pérez-Schael I, Daoud G, White L, Urbina G, Daoud N, Pérez M, "et al". Rotavirus shedding by newborn children. *J Med Virol* 1984; 14:127-136.
35. Cunliffe NA, Kilgore PE, Bresee JS, Steele AD, Luo N, Hart CA, "et al". Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. *Bull WHO* 1998; 76:525-537.
36. Pérez-Schael I, González R, Fernández R, Alfonzo E, Inaty D, Boher Y, "et al". Epidemiological features of rotavirus infection in Caracas, Venezuela: Implications for rotavirus immunization programs. *J Med Virol* 1999; 59:520-526.
37. Rojas AM, Boher Y, Guntiñas MJ, Pérez-Schael I. Homotypic immune response to primary infection with rotavirus serotype G1. *J Med Virol* 1995; 47:404-409.
38. Fischer TK, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Perch M, Santos G, Aaby P, "et al". Protective immunity after natural rotavirus infections: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, West Africa. *J Infect. Dis* 2002; 186:593-597.
39. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero ML, Morrow AL, Carter-Campbell S, "et al". Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med* 1996; 335:1022-1028.
40. Clark HF, Glass RI, Offit PA. Rotavirus vaccines (Chapter 41). In: *Vaccines*. Ed. by Plotkin SA and Orenstein WA. 3rd Edition. WB Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, 1999: Pp: 987-1005.
41. Pérez ME, Glass RI, Alvarez G, Pericchi LR, González R, Kapikian AZ, "et al". Rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine is efficacious despite age, socioeconomic conditions and seasonality in Venezuela. *Vaccine* 2001; 19:976-981.
42. Torok TJ, Kilgore PE, Clarke MJ, Holman RC, Bresee JS, Glass RI, "et al". Visualizing geographic and temporal trends in rotavirus activity in the United States, 1991 to 1996. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:941-946.
43. Ryan MJ, Ramsay M, Brown D, Gay NJ, Farrington CP, Wall PG. Hospital admissions attributable to rotavirus infection in England and Wales. *J Infect Dis* 1996; 174:S12-18.
44. Jin S, Kilgore PE, Holman RC, Clarke MJ, Gangarosa EJ, Glass RI. Trends in hospitalizations for diarrhea in United States children from 1979 through 1992: estimates of the morbidity associated with rotavirus. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15:397-404.
45. Parashar UD, Holman RC, Bresee JS, Clarke MJ, Rhodes PH, Davis RL, "et al". Epidemiology of diarrheal disease among children enrolled in four west coast health maintenance organizations. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:605-611.

46. Parashar UD, Holman RC, Clarke MJ, Bresee JS, Glass RI. Hospitalizations associated with rotavirus diarrhea in the United States, 1993 through 1995: surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus-specific diagnostic code. *J Infect Dis* 1998; 177:13-17.
47. Viera de Torres B, Mazzali de Iija R, Esparza J. Epidemiological aspects of rotavirus infection in hospitalized Venezuelan children with gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27:567-572.
48. Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN, Glass RI. Vigilancia de los virus de la gastroenteritis en los laboratorios nacionales del Brasil. *Bull Pan Am Health Org* 1994; 116:27-36.
49. LeBaron CW, Lew J, Glass RI, Weber JM, Ruiz-Palacios GM, The Rotavirus Study Group. Annual rotavirus epidemic patterns in North America. Results of a 5-year retrospective survey of 88 centers in Canada, Mexico, and The United States. *JAMA* 1990; 264:983-988.
50. Santosham M, Yolken RH, Wyatt RG, Bertrando R, Black RE, Spira WM, "et al". Epidemiology of rotavirus diarrhea in a prospectively monitored american indian population. *J Infect Dis* 1985; 152:778-783.
51. Zheng BJ, Chang RX, Ma GZ, Xie JM, Liu Q, Liang XR, "et al". Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *J Med Virol* 1991; 34:29-37.
52. Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis* 1991;13:448-461.
53. Greenberg HB, Clark HF, Offit PA. Rotavirus pathology and pathophysiology. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1994; 185:255-283.
54. Moon HW. Pathophysiology of viral diarrhea. In: *Viral infections of the gastrointestinal tract*. Ed by Kapikian AZ. 2nd edition. Marcel Dekker, Inc. New York, 1994: pp: 27-52.
55. Estes MK, Morris AP. A viral enterotoxin. A new mechanism of viral induced pathogenesis. In: *Mechanism in the pathogenesis of enteric diseases 2*. Editado por Paul y Francis. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, 1999: pp. 73-82.
56. Ball JM, Tian P, Zeng CQ-Y, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 1996; 272:101-104.
57. Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnoo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science* 2000; 287:491-495.
58. Ramsay M, Brown D. Epidemiology of group A rotaviruses. In: *Rotaviruses: methods y protocolos (Methods in molecular medicine)*. Ed by Gray J and Desselberger U. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2000: pp 217-238.
59. Zaki AM, Dupont HL, El Alamy MA, Arafat RR, Amin K, Awad MM, "et al". The detection of enteropathogens in acute diarrhea in a family cohort population in rural Egypt. *Am J Trop Hyg* 1986; 35: 1013-1022.
60. Desselberger U. 1989. Molecular epidemiology of rotavirus. In: *Viruses and the gut. Proceedings of the ninth BSG.SK& F International workshop* 1988, pp. 55-65.
61. Estes MK. Rotaviruses and their replication. *Fields Virology*, tercera edición. Editado por Fields BN y col. Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996: pp.1625-1655.
62. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Pérez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis* 1996; 174:S65-72.
63. Clark HF, Offit PA, Ellis RW, Eiden JJ, Krah D, Shaw AR, Pichichero M, "et al". The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis* 1996; 174:S73-80.

64. Flores J, Pérez-Schael I, Boeggeman E, "et al". Genetic relatedness among human rotaviruses. *J med Virol* 1985; 17:135-143.
65. Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infants and young children. *Trends in Microbiology* 1994; 2:242-249.
66. Taniguchi K, Urasawa S. Diversity in rotavirus genomes. *Virology* 1995; 6:123-131.
67. Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr* 2000; 18:5-14.
68. Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, "et al". Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996; 174:S30-36.
69. White L, García D, Boher Y, Blanco M, Pérez M, Romer H, "et al". Temporal distribution of human rotavirus serotypes 1, 2, 3, and 4 in venezuelan children with gastroenteritis during 1979-1989. *J Med Virol* 1991; 34:79-84.
70. Santos N, Riepenhoff-talty M, Clark HF, Offit P, Gouvea V. VP4 genotyping of human rotavirus in the United States. *J Clin Microbiol* 1994; 32:205-208.
71. Gunasena S, Nakagomi O, Isegawa Y, Kaga E, Nakagomi T, Duncan Steele A, "et al". Relative frequency of VP4 gene alleles among human rotaviruses recovered over a 10-year period (1982-1991) from japanese children with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2195-2197.
72. Santos N, Lima R, Pereira C, Gouvea V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2727-2729.
73. Padilla-Noriega L, Méndez-Toss M, Menchaca G, Contreras JF, Romero-Guido P, Puerto FI, "et al". Antigenic and genomic diversity of human rotavirus VP4 in two consecutive epidemic seasons in Mexico. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1688-1692.
74. Woods PA, Gentsch J, Gouvea V, Mata L, Simhon A, Santosh M, "et al". *J Clin Microbiol* 1992; 30:781-785.
75. Kaga E, Iizuka M, Nakagomi T, Nakagomi O. The distribution of G (VP7) and P (VP4) serotypes among human rotaviruses recovered from japanese children with diarrhea. *Microbiol Immunol* 1994; 38:317-320.
76. Ramachandran M, Gentsch JR, Parashar UD, Jin S, Woods PA, Holmes JL, "et al". Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3223-3229.
77. Cunliffe NA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI Hart CA. The expanding diversity of rotaviruses. *The Lancet* 2002; 359:640-642.
78. Nakagomi O, Nakagomi T. Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. *Microbiol Immunol* 1993; 37:337-348.
79. Offit PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: The skies are clearing. *J Infect Dis* 1996; 174:S59-64.
80. Offit PA. Correlates of protection against rotavirus infection and disease. In *Gastroenteritis viruses*. Novartis Foundation Symposium 238. Ed. by John Wiley & Sons, LTD, Chichester, England 2001; pp:106-124.
81. Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfections with rotavirus. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1678-1684.
82. Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infectious. *J Infect Dis* 1993; 167:577-583.

83. Feng N, Burns JW, Bracy L, Greenberg HB. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J Virol* 1994; 68:7766-7773.
84. Jaimes MC, Rojas OL, González AM, Cajiao I, Charpilienne A, Pothier P, "et al". Frequencies of virus-specific CD4+ and CD8+ lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. *J Virol* 2002; 76:4741-4749.
85. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME., Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1992; 89:6901-6905
86. Connor ME, Zarley CD, Hu B, Parsons S, Drabinski D, Greiner S, "et al". Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J Infect Dis* 1996; 174:S88-92.
87. Estes MK. Advances in molecular biology: Impact on rotavirus vaccine development. *J Infect Dis* 1996a; 174:S37-46.
88. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med* 1983; 309:72-76.
89. Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass RI. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *J Infect Dis* 1993; 168:282-287.
90. Bernstein DI, Sander DS, Smith VE, Schiff GM, Ward RL. Protection from rotavirus reinfection: 2-years prospective study. *J Infect Dis* 1991; 164:277-283.
91. Ward RL, Bernstein DI for the US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. Protection against rotavirus disease after natural rotavirus infection. *J Infect Dis* 1994; 169:900-904.
92. Mata L, Simhon A, Urrutia JJ, Kronmal RA, Fernández R, García B. Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. *J Infect Dis* 1983; 148:452-461.
93. Simhon A, Mata L, Vives M, Rivera L, Vargas S, Ramírez G, "et al". Low endemicity and low pathogenicity of rotaviruses among rural children in Costa Rica. *J Infect Dis* 1985; 152:1134-1142.
94. Friedman MG, Galil A, Sarov B, Margalith M, Katzir G, Midthun K, "et al". Two sequential outbreaks of rotavirus gastroenteritis: Evidence for symptomatic and asymptomatic reinfections. *J Infect Dis* 1988; 158:814-822.
95. Grimwood K, Lund JCS, Coulson BS, Hudson IL, Bishop RF, Barnes GL. Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. *J Clin Microbiol* 1988; 26:738-738.
96. Hjelt K, Grauballe PC, Schiøtz PO, Andersen L, Krasilnikoff PA. Intestinal and serum response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985; 4:60-66.
97. Hjelt K, Grauballe PC, Andersen L, Schiøtz PO, Howitz P, Krasilnikoff PA. Antibody response in serum and intestine in children up to six months after a naturally acquired rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986; 5:74-80.
98. Coulson B, Grimwood K, Masendyez P, "et al". Comparison of rotavirus immunoglobulin A coproconversion with other indices of rotavirus infection in a longitudinal study in childhood. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1367-74.G
99. Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:8701-8704.

100. Johansen K, Hinkula J, Espinoza F, Levi M, Zeng C, Rudén U, "et al". Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. *J Med Virol* 1999; 59:369-377.
101. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-Specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 1996; 272:104-107.
102. Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Ahmed MU, Adachi N, Chiba S, "et al". Antibody response to serotype-specific and cross-reactive neutralization epitopes on VP4 and VP7 after rotavirus infection on vaccination. *J Clin Microbiol* 1991; 29:483-487.
103. Green KY, Taniguchi K, Mackow ER, Kapikian AZ. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccinees: Implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1990; 161:667-679.
104. O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis* 1994; 169:504-511.
105. Chiba S, Nakata S, Urasawa T, Urasawa S, Yokoyama T, Morita Y, "et al". Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet* 1986; 2:417-421.
106. Chiba S, Nakata S, Ukae S, Adachi N. Virological and serological aspects of immune resistance to rotavirus gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 1993; 16:S117-121.
107. Vásquez J, Boher Y, Pérez M, Gutiñas MJ, Rojas AM. Immune response to three doses of quadrivalent rotavirus vaccine: 1-year follow-up. *Vaccine* 1998; 16:1179-1183.
108. McNeal MM, Broome RL, Ward RL. Active immunity against rotavirus infection in mice is correlated with viral replication and titers of serum rotavirus IgA following vaccination. *Virology* 1994; 204:642-650.
109. Hjelt K, Grauballe PC, Paerregaard A, Nielsen OH, Krasilnikoff PA. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. *J Med Virol* 1987; 21:39-47.
110. Velázquez FR, Matson DO, Guerrero LM, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, "et al". Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis* 2000; 182:1602-1608.
111. González R, Franco MA, Sarmiento L, Romero M, Corao A, Pérez-Schael I. (Abstrac). Serum IgA antibodies correlate with protection against rotavirus disease in natural infected bout not in immunized children. III World Congress of Pediatric Infectious Disease- WSPID, Chile, 2002; pp: 88.
112. Bishop RF, Bugg HC, Masendycz PJ, Lund JS, Gorrel RJ, Barnes GL. Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. *J Infect Dis* 1996; 174:S22-29.
113. Madore HP, Christy C, Pichichero M, Long C, Pincus P, Vosefsky D, "et al". Field trial of rhesus rotavirus or human-rhesus rotavirus reassortant vaccine of VP7 serotype 3 or 1 specificity in infants. *J Infect Dis* 1992; 166:235-243.
114. Ward RL, Berstein DI for the US rotavirus vaccine efficacy group. Lack of correlation between serum rotavirus antibody titers and protection following vaccination with RRV vaccines. *Vaccine* 1995; 13:1226-1252.
115. Bernstein DI, Glass RI, Rodgers G, Davidson BL, Sack DA for the US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. *JAMA* 1995; 273:1191-1196.
116. Franco MA, Greenberg HB. Challenges for rotavirus vaccinea. *Virol* 2001; 281:153-155.

117. Ward RL, Clemens JD, Knowlton DR, Rao MR, Van Loon FP, Huda N, "et al ". Evidence that protection against rotavirus diarrhea after natural infection is not dependent on serotype-specific neutralizing antibody. *J Infect Dis* 1992; 166:1251-1257.
118. Clark HF, Borian FE, Bell LM, Modesto K, Gouvea A, Plotkin AS. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhoea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. *J Infect Dis* 1988; 158:570-587.
119. Vesikari T, Isolauri E, Delem A, D'Hondt E, Zissis G. Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children. *Lancet* 1983; 2:807-811.
120. Lanata CF, Black RE, del Aguila R, Gil H, Verastegui G, Gerna G, "et al". Protection of Peruvian children against rotavirus diarrhea of specific serotypes by one, two or three doses of the RIT 4237 attenuated bovine rotavirus vaccine. *J Infect Dis* 1989; 159:452-459.
121. Vesikari T, Joensuu J. Review of rotavirus vaccine trials in Finland. *J Infect Dis* 1996; 174:S81-87.
122. Clemens JD, Rao M, Ahmed F, Ward RL, Huda S, Chakraborty J, "et al". Breast-feeding and the risk of life-threatening rotavirus diarrhea: prevention or postponement? *Pediatrics* 1993; 92:680-685.
123. Offit P. Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease. *Adv Virus Res* 1994; 44:161-202.
124. Ward LA, Rich ED, Besser TE. Role of maternally derived circulating antibodies in protection of neonatal swine against porcine group A rotavirus. *J Infect Dis* 1996; 174:276-282.
125. Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis* 2001; 34:1351-1361.
126. Ward RL. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis* 1996; 174:S51-58.
127. Ada G. The immunology of vaccination (Chapter 3). In: *Vaccines*. Ed. by Plotkin SA and Orenstein WA. 3rd Edition. WB Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, 1999: Pp: 28-39.
128. Franco MA, Feng N, Greenberg HB. Molecular determinants of immunity and pathogenicity of rotavirus infection in the mouse model. *J Infect Dis* 1996; 174(Suppl 1):S47-50.
129. Rosé J, Franco M, Greenberg H. The immunology of rotavirus infection in the mouse. *Adv Virus Res* 1999; 51:203-235.
130. Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology* 1997; 338:169-179.
131. González AM, Jaimes MC, Cajiao I, Rojas O, Cohen J, Pothier P, "et al". *Virol* 2003; 305:93-105.
132. Rojas OL, González AM, González R, Pérez-Schael I, Butcher EC, Greenberg HB, "et al". Human rotavirus specific T cells: quantification by elispot and expression of homing receptors on CD4+T cell. Enviado a publicación.
133. Nakagomi O, Nakagomi T. Rotavirus vaccines: A perspective. *Microbiol Immunol* 1996; 40:701-709.
134. Feachem RG. Preventing diarrhoea: what are the policy options? *Health Policy and Planning* 1986; 1:109-117.
135. WHO. Report of the meeting on future directions for rotavirus vaccine research in developing countries. Geneva, February 9-11, World Health Organization, 2000; pp 1-62.

136. CDC. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine-United States, 1998-1999. 48:577-581 In: JAMA 1999; 282:520-521.
137. Zanardi LR, Haber P, Mootrey GT, Niu M, Wharton M, VAERS working group. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine: report to the vaccine adverse reporting system. Pediatrics 2001; 107:1-6.
138. Wyatt RG, Mebus CA, Yolken RH, Kalica AR, James Jr HD, Kapikian AZ, "et al". Rotaviral immunity in gnotobiotic calves: heterologous resistance to human virus induced by bovine virus. Science 1975; 203:548-550.
139. Zheng BJ, Han SX, Yan YK, Liang XR, Ma GZ, Yang Y, "et al". Development of neutralizing antibodies and group A common antibodies against natural infections with human rotavirus. J Clin Microbiol 1988; 26:1506-1512.
140. Zassis G, Lambert JP, Marbehant P, Marissens D, Lobman M, Charlier P, "et al". Protection studies in colostrumdeprived piglets of a bovine rotavirus vaccine candidate using human rotavirus strains for challenge. J Infect Dis 1983; 148:1061-1068.
141. Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Yolken RH, VanKirk DH, Dolin R, "et al". Oral administration of human rotavirus to volunteers: Induction of illness and correlates of resistance. J Infect Dis 1983; 147:95-106.
142. Kapikian AZ, Wyatt RG, Greenberg HB, Kalica AR, Kim HW, Brandt CD, "et al". Approaches to immunization of infants and young children against gastroenteritis due to rotaviruses. Rev Infect Dis 1980; 2:459-469.
143. Midthun K, Kapikian AZ. Rotavirus vaccines: an overview. Clin Microbiol Rev 1996; 9:423-434.
144. Pericchi LR, Pérez-Schael I, Viana D G, Cunto W, Kapikian AZ, Flores J. Statistical analysis of a rhesus rotavirus vaccine trial to assess protective effect against diarrhea in Venezuelan children of 2-4 months of age. Interciencia 1989; 14:199-202
145. Georges-Courbot MC, Monges J, Siopathis MR, Roungou JB, Gresenguet G, Bellec L, "et al". Evaluation of the efficacy of a low-passage bovine rotavirus (strain WC3) vaccine in children in Central Africa. Res Virol 1991; 142:405-411.
146. Midthun K, Greenberg HB, Hoshino Y, Kapikian AZ, Wyatt RG, Chanock RM. Reassortant rotaviruses as potential live rotavirus vaccine candidates. J Virol 1985; 53:949-954.
147. Wright PF, King J, Araki K, Kondo Y, Thompson J, Tollefson SJ, "et al". Simultaneous administration of two human-rhesus rotavirus reassortant strains of VP7 serotype 1 and 2 specificity to infants and young children. J Infect Dis 1991; 164:271-276.
148. Flores J, Pérez-Schael I, Blanco M, Vilar M, García D, Pérez M, "et al". Reactions to and antigenicity of two human-rhesus rotavirus reassortant vaccine candidates of serotypes 1 and 2 in Venezuelan infants. J Clin Microbiol 1989; 27:512-518.
149. Lanata CF, Black RE, Flores J, Lazo F, Butron B, Linares A, "et al". Immunogenicity, safety and protective efficacy of one dose of the rhesus rotavirus vaccine and serotype 1 and 2 human-rhesus rotavirus reassortants in children from Lima, Peru. Vaccine 1996; 14:237-243.
150. Pérez-Schael I, Blanco M, Vilar M, García D, White L, González R, "et al". Clinical studies of a quadrivalent rotavirus vaccine in Venezuelan infants. J Clin Microbiol 1990a; 28:553-558.
151. Flores J, Pérez-Schael I, Blanco M, White L, García D, Vilar M, "et al". Comparison of reactogenicity and antigenicity of M37 rotavirus vaccine and rhesus-rotavirus-based quadrivalent vaccine. Lancet 1990; 336:330-334.
152. Pérez-Schael I, Blanco M, García D, White L, Alfonzo E, Crespo I, "et al". Evaluation of the antigenicity and reactogenicity of varying formulations of the rhesus rotavirus-based quadrivalent and the M37 rotavirus vaccine candidates. J Med Virol 1994; 42:330-337.

153. Flores J, Pérez-Schael I, Blanco M, Rojas AM, Alfonzo E, Crespo I, "et al". Reactogenicity and immunogenicity of a high-titer rhesus rotavirus-based quadrivalent rotavirus vaccine. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2439-2445.
154. Lanata CF, Midthun K, Black RE, Butron B, Huapaya A, Penny ME, "et al". Safety, immunogenicity, and protective efficacy of one and three doses of the tetrivalent rhesus rotavirus vaccine in infants in Lima, Peru. *J Infect Dis* 1996a; 174:268-275.
155. Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, de Freitas RB, Oliveira CS, Bellesi N, "et al". Immunogenicity, safety and efficacy of tetrivalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. *Bull WHO* 1996; 74:491-500.
156. Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH, Bernstein DI, Pichichero ME, Zito ET, Mack ME, Davidson BL, and Kapikian AZ, for the United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. 1996. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines-report of the National Multicenter Trial. *Pediatrics* 97:7-13.
157. Santosham M, Moulton LH, Retd R, Croll J, Weatherholt R, Ward R, "et al". Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in native american populations. *J Pediatr* 1997; 131:632-638.
158. Joensuu J, Koskenniemi E, Pang XL, Vesikari T. Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet* 1997; 350:1205-1209.
159. Pérez-Schael I, Gutiñas MJ, Pérez M, Pagone V, Rojas AM, González R,"et al". Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med* 1997; 337:1181-1187.
160. Linhares AC, Lanata CF, Hausdorff WP, Gabbay YB, Black RE. Reappraisal of the peruvian and brazilian lower titer tetrivalent rhesus-human reassortant rotavirus vaccine efficacy trials: analysis by severity of diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18:1001-1006.
161. Hoshino Y, Wagner M, Yan X, Pérez-Schael I, Kapikian AZ. Horizontal transmission of rhesus monkey rotavirus-based quadrivalent vaccine during phase 3 clinical trial in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 2003; 187: 791-800.
162. Rimer HC, Wasserman SS, Flores J, Pichichero ME, Losonsky GA. Rotavirus-specific breast milk antibody in two populations and possible correlates of interference with rhesus rotavirus vaccine seroconversion. *J Infect Dis* 1992; 165:826-830.
163. Rennels MB. Influence of breast-feeding and oral poliovirus vaccine on the immunogenicity and efficacy of rotavirus vaccines. *J Infect Dis* 1996a; 174:S107-111.
164. Kapikian AZ. A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal. In *Gastroenteritis viruses*. Novartis Foundation Symposium 238. Ed by Wiley Chichester, 2001: pp 153-179.
165. Clements-Mann ML, Makhene MK, Mrukowicz J, Wright PF, Hoshino Y, Midthun K, "et al". Safety and immunogenicity of live attenuated human-bovine (UK) reassortant rotavirus vaccines with VP7 specificity for serotypes 1, 2, 3 or 4 in adults, children and infants. *Vaccines* 1999; 17:20-21.
166. Clements-Mann ML, Dudas R, Hoshino Y, Nehring P, Sperber E, Wagner M, "et al". Safety and immunogenicity of live attenuated quadrivalent human-bovine (UK) reassortant rotavirus vaccine administered with childhood vaccines to infants. *Vaccine* 2001; 19:4676-4678.
167. Parashar UD, Holman RC, Cummings KC, Stagga NW, Curns AT, Zimmerman Ch M, "et al". Trends in intussusception-assocaited hospitalization and deaths among US infants.

- Pediatrics 2000; 106:1413-1421.
168. Gay N, Ramsay M, Waight P. Rotavirus vaccination and intussusception. Lancet 1999; 354:956.
169. Pérez-Schael I, Escalona M, Salinas B, Materán M, Pérez ME, González G. Intussusception-associated hospitalization among Venezuelan infants during 1998 through 2001: anticipating rotavirus vaccines. Pediatric Infect Dis J 2003; 22:234-239.
170. Kramarz P, France EK, Destefano F, Black SB, Shinefield H, Ward JI, "et al". Population - based study of rotavirus vaccination and intussusception. Pediatric Infect Dis J 2001; 20:410-416.
171. Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, "et al". Intussusception among infants given oral rotavirus vaccine. New Engl J Med 2001; 344: 564-572.
172. Chang EJ, Zangwill KM, Lee H, Ward JI. Lack of association between rotavirus infection and intussusception: implications for use of attenuated rotavirus vaccines. Pediatric Infect Dis J 2002; 21:97-102.
173. Weifer Ch. The future of research into rotavirus vaccine. Benefits of vaccine may outweigh risk for children in developing countries. BMJ 2000; 321:525-526.
174. Midtun K, Halsey NA, Jett-Goheen M, Clements ML, Steinhoff M, King JC, "et al". Safety and immunogenicity of human rotavirus vaccine strain M37 in adults, children, and infants. J Infect Dis 1991; 164:792-796.
175. Vesikari T, Ruuska T, Koivu HP, Green KY, Flores J, Kapikian AZ. Evaluation of the M37 human rotavirus vaccine in 2- to 6-month-old-infants. Pediatric Infect Dis J 1991; 10:912-917.
176. Bernstein DI, Smith VE, Sherwood JR, Schiff GM, Sander DS, DeFeudis D, "et al". Safety and immunogenicity of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12. Vaccine 1998; 16:381-387.
177. Bernstein DI, Sack DA, Rothstein E, Reisinger K, Smith VE, O'Sullivan D, "et al". Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 1999; 354:287-290.
178. Vesikari T, Karvonen A, Espo M, Karvonen T, Lebacq E, Forster J, Zepp F, Ward R, Delem A abd De Vos B. Evaluation of an oral human rotavirus (HRV) vaccine RIX 4414 in Europe. III World Congress of Pediatric Infectious Disease- WSPID, Chile, 2002; pp: 82.
179. Vesikari T, Karvonen A, Espo M, Karvonen T, Delem A and De vos B. Efficacy of an oral human rotavirus (HRV) vaccine in previously uninfected Finnish infants. 42nd ICAAC meeting, San Diego-California, USA. Abstrac. 2002; pp: 249
180. Linhares AC, Pérez-Schael I, Ruíz-Palacios G, Pernambuco E, Jacquet JM and De Vos B. Immunonenicity and reactogenicity of an oral human rotavirus (HRV) vaccine in Latin American infants. III World Congress of Pediatric Infectious Disease- WSPID, Chile, 2002; pp: 82.
181. Pérez-Schael I, Linhares AC, Guerrero ML, Ruíz-Palacios G, Clemens SA, Jacquet J and De Vos B. Protective efficacy of an oral human rotavirus (HRV) vaccine in Latin American infants. 42nd ICAAC meeting, San Diego-California, USA. Late-breaker program, 2002; pp:18.
182. Ruíz-Palacios G, Guerreo ML, Linhares AC, Salinas B, Pérez-Schael I, Jacquet J and De Vos B. Efficacy of an oral human rotavirus (HRV) vaccine in preventing diarrhoea due to G1 and non-G1 rotavirus. III World Congress of Pediatric Infectious Disease- WSPID, Chile, 2002; pp: 17.
183. Chen SC, Jones DH, Fynan EF, Farrar GH, Clegg JCS, Greenberg HB, "et al". Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in

- microparticles. *J Virol* 1998; 72:5757-5761. Fernández FM, Conner ME, Hodgins DC, Parwani AV, Nielsen PR, Crawford SE, "et al". Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine* 1998; 16:507-516.
184. ME, Hodgins DC, Parwani AV, Nielsen PR, Crawford SE, "et al". Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine* 1998; 16:507-516.
185. McNeal M, Rae MN, Conner ME, Ward RL. Stimulation of local immunity and protection in mice by intramuscular immunization with triple-or double-layered rotavirus particles and QS-21. *Virology* 1998; 243:158-166.