

# Pruebas moleculares en el diagnóstico de la gastroenteritis aguda causada por virus

Milagrosa Montes<sup>a</sup> y Miren Iturriza-Gómara<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Donostia. San Sebastián. Guipúzcoa. España.

<sup>b</sup>Enteric Virus Unit. Virus Reference Department. Centre for Infections. Health Protection Agency. London. United Kingdom.

La gastroenteritis aguda (GEA) es una causa importante de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Los virus son la causa de la mayoría de los episodios que ocurren en Europa, entre los que destacan los rotavirus en menores de 2 años y los norovirus en edades superiores. Hasta ahora, con las técnicas de diagnóstico convencionales, había una importante brecha diagnóstica, y en un 60-70% de los casos de GEA quedaba sin conocer su agente causal. La mayoría de los casos en los que desconocemos el agente etiológico son probablemente de origen viral. Con la aplicación de técnicas de biología molecular (amplificación de ácidos nucleicos) en el diagnóstico de la GEA, se aumentan los índices de diagnóstico etiológico, al ser las técnicas moleculares muy sensibles y específicas. Los patógenos más favorecidos son los virus, en especial norovirus y rotavirus. Los norovirus constituyen un importante problema de salud pública, por su elevada incidencia y transmisibilidad, y son una causa común de brotes de GEA en todo el mundo. Los rotavirus constituyen la primera causa de GEA grave infantil en el mundo. Además de herramienta diagnóstica, las técnicas moleculares son imprescindibles para la caracterización genética de las cepas circulantes. Gracias a los métodos moleculares se conocerá la verdadera incidencia de la GEA causada por virus y se podrá investigar el papel de nuevos virus en esta entidad clínica tan frecuente.

**Palabras clave:** Biología molecular. Gastroenteritis aguda. Diarrea infecciosa. Virus. Norovirus. Rotavirus.

Molecular methods for the diagnosis of acute viral gastroenteritis

**Acute gastroenteritis (AGE) is a major cause of morbidity and mortality worldwide. In Europe, viruses are responsible for most episodes of gastroenteritis, and among these, rotaviruses are associated with most AGE in**

children under the age of 2 years, and noroviruses in older ages. Classical methods for laboratory diagnosis leave between 60 and 70% of cases undiagnosed. Most cases in which the etiology is unknown are probably caused by viruses. Through the use of molecular methods (nucleic acid amplification) with greatly improved sensitivity and specificity, this diagnostic gap in AGE can be greatly reduced. Molecular methods are particularly advantageous in the detection of viruses, and in particular, in that of noroviruses and rotaviruses. The high incidence and transmissibility of noroviruses has a major impact on public health, and noroviruses are the major cause of outbreaks of AGE worldwide. Rotaviruses are the major cause of severe acute infantile AGE throughout the world. As well as serving as tools for diagnosis, molecular methods are essential for the genetic characterization of co-circulating strains. Through the use of molecular methods, the true incidence of viral AGE can be more accurately established, and the role of novel viruses in this highly common syndrome can be assessed.

**Key words:** Molecular biology. Acute gastroenteritis. Infectious diarrhoea. Virus. Norovirus. Rotavirus.

## Introducción

Se estima que cada año mueren a causa de diarrea infecciosa o gastroenteritis aguda (GEA) más de 2 millones de personas, la mayoría niños de países en vías de desarrollo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, la GEA y la infección respiratoria aguda de vías bajas son las causas principales de mortalidad en menores de 5 años<sup>1-3</sup>. La etiología de la GEA varía según la edad y el área geográfica, e incluye a bacterias, parásitos y virus. Los virus son la causa de la mayoría de los episodios que ocurren en Europa, entre los que destaca el papel de rotavirus en los menores de 2 años y de norovirus en edades superiores<sup>4</sup>. Astrovirus, sapovirus, adenovirus entéricos y otros virus son también causa de GEA pero su frecuencia es mucho menor que los referidos anteriormente.

En la práctica habitual de los laboratorios de microbiología, sólo se reconoce un agente causal en el 30-40% de los episodios de GEA. Por tanto, hay una importante brecha diagnóstica (un 60-70% quedan sin filiar) que las nuevas tecnologías, principalmente basadas en la biología molecular, pueden reducir. Se piensa que la mayor

Correspondencia: Dra. M. Montes.  
Servicio de Microbiología. Hospital Donosti.  
P.º Dr. Beguiristain, s/n, 20009 San Sebastián. Guipúzcoa. España.  
Correo electrónico: milagrosa.montesros@osakidetza.net

parte de los procesos de GEA en los que desconocemos el agente etiológico son probablemente de origen viral.

Las técnicas de biología molecular actualmente disponibles permiten detectar la mayor parte de los microorganismos enteropatógenos, sean virus, bacterias o parásitos. Si bien el uso de estas técnicas para el diagnóstico de infecciones bacterianas o por parásitos no supone un incremento significativo en la sensibilidad diagnóstica, en el caso de infecciones virales, el aumento de sensibilidad es muy importante (tabla 1)<sup>5,6</sup>. Este trabajo se ha centrado en el diagnóstico de la GEA viral, debido principalmente a que coinciden su elevada prevalencia y la escasa disponibilidad de otros métodos de diagnóstico, y se dedica una atención especial a los 2 grandes protagonistas: norovirus y rotavirus.

## Antecedentes en el diagnóstico

Las técnicas diagnósticas que se han empleado históricamente para identificar los virus causantes de GEA son la microscopía electrónica y las pruebas inmunológicas (detección de antígeno). En los años setenta, la microscopía electrónica permitió descubrir nuevos virus enteropatógenos humanos. La denominación dada a esos virus reflejaba su morfología. Así, vistos con el microscopio electrónico, los rotavirus tienen aspecto de “rueda”, los astrovirus de “estrella”, etc. Pero esta técnica es poco sensible, y es necesario que la muestra contenga al menos  $10^6$  partículas virales/g de heces para detectarlos. La inmunomicroscopía electrónica mejora su sensibilidad 10-100 veces, y además hay otros métodos microscópicos de enorme utilidad en la investigación, pero de escasa utilidad práctica dada su complejidad y coste elevado. Las técnicas inmunológicas basadas en la detección de antígenos (aglutinación con partículas de látex, enzimo-inmunoanálisis [EIA], inmunocromatografía, etc.) son las más empleadas en el diagnóstico sistemático, y se dispone de un gran número de ellas<sup>7</sup>. Son técnicas rápidas, fáciles de realizar y bastante útiles en la práctica para algunos virus, como rotavirus. Sin embargo, para otros, como norovirus, son poco sensibles.

## Diagnóstico molecular de la gastroenteritis viral: generalidades

En la actualidad, hay una amplia variedad de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como reacción en ca-

dena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica de ácido ribonucleico (ARN) (NASBA) y otras, diseñadas para la detección de ARN o ácido desoxirribonucleico (ADN) viral en heces (p. ej., PCR convencional, PCR anidada, PCR en tiempo real, etc.). Las principales ventajas de estas técnicas son su elevada sensibilidad y especificidad, así como la rapidez en la obtención de resultados. Otras ventajas que tienen interés en situaciones concretas son la posibilidad de detectar de forma simultánea varios patógenos (PCR multiplex) y de cuantificar la carga viral. Sin embargo, también presentan problemas. Se trata de técnicas en muchos casos no estandarizadas (entendiendo como tales las técnicas normalizadas, comerciales, de fácil manejo siguiendo las instrucciones del fabricante). Otro problema es la posibilidad de contaminación con amplicones de reacciones previas, si bien ésta disminuye mucho si se siguen unas normas básicas, tanto en el diseño de las instalaciones del laboratorio, como en la manipulación de muestras y reactivos. Otras dificultades a la hora de poner en marcha en el laboratorio técnicas no comerciales son: *a*) la elección adecuada de cebadores (cada virus tiene varias dianas a las que dirigirse y la sensibilidad de cada una es diferente); *b*) la variabilidad viral de muchos virus entéricos dado que son virus ARN. Durante la transcripción, la enzima ARN polimerasa comete muchos errores que se traducen en mutaciones puntuales, que no se reparan, lo que conlleva que haya una gran diversidad genómica y antigénica viral. Esta diversidad genómica es la causa de que las cepas que circulan en la comunidad varíen con el tiempo y de que la sensibilidad de las técnicas moleculares pueda disminuir si no se van adecuando los cebadores; *c*) la necesidad de introducir controles internos para detectar inhibición de la amplificación, dado que las heces contienen con frecuencia inhibidores de PCR como compuestos fenólicos y polisacáridos; *d*) disponer de una técnica de extracción de ácidos nucleicos adecuada para heces, y *e*) otras. Las técnicas más adecuadas son las que emplean agentes caotrópicos (como isotiocianato de guanidinio) para la desnaturalización y la solubilización de los ácidos nucleicos en presencia de sílice, y su posterior recuperación libre de sustancias contaminantes e inhibitoras de la PCR. Actualmente hay aparatos de extracción automatizada que emplean esta metodología.

En conjunto, las técnicas moleculares tienen un coste económico elevado, pero a veces son la única posibilidad diagnóstica. De hecho, actualmente se consideran de referencia en el diagnóstico de la GEA viral. Varios estudios realizados en Europa han puesto de manifiesto que

TABLA 1. Carga viral típica en heces de pacientes con gastroenteritis de origen viral e incremento de la sensibilidad diagnóstica mediante el uso de técnicas de biología molecular

Virus	Carga viral (partículas virales/g)	Probabilidad de detección mediante microscopía electrónica	Incremento de la sensibilidad diagnóstica mediante el uso de PCR/RT-PCR <sup>a</sup> (%)
Rotavirus grupo A	$10^{8-12}$	++++	22,9
Norovirus	$\leq 10^{7-8}$	±	666,7
Sapovirus	$\leq 10^{7-8}$	±	700
Astrovirus	$10^{7-8}$	+	133,3
Adenovirus (grupo F)	$10^{7-10}$	++	233,4

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR: retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa.

el empleo de técnicas moleculares reduce de modo importante la brecha diagnóstica que hay en las infecciones entéricas. En Inglaterra, Simpson et al<sup>5</sup>, a partir de técnicas moleculares, detectaron un patógeno en el 60,3% de las muestras analizadas. Lo mismo ocurrió en 2 estudios llevados a cabo en Francia<sup>8</sup> y Finlandia<sup>9</sup>, respectivamente. Con el empleo de técnicas moleculares, Amar et al<sup>6</sup> redujeron la brecha diagnóstica del 47 al 25%. Los patógenos más beneficiados de estas técnicas fueron los virus: norovirus, rotavirus y astrovirus. Estos mismos autores observaron que, aunque la sensibilidad de los métodos moleculares para detectar bacterias y parásitos causantes de GEA fue también mayor que la de los métodos convencionales, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas.

## Norovirus

Los norovirus fueron la causa de un brote de GEA que tuvo lugar en 1968 en una escuela de Norwalk (Estados Unidos), origen del nombre por el que durante años se ha conocido a estos virus. Pero no fue hasta 1972 cuando Kapiikian identificó virus de este tipo con el microscopio electrónico. Desde entonces, son muchos los avances realizados en el diagnóstico de norovirus, denominados también virus pequeños de estructura redonda. Los norovirus constituyen un importante problema de salud pública por su elevada incidencia y transmisibilidad. Son la causa principal de brotes de GEA y causa común de enfermedad transmitida por alimentos. Se han documentado brotes causados por norovirus en numerosos establecimientos: restaurantes, hospitales, residencias de ancianos, escuelas, guarderías, cruceros, etc. Se transmiten por vía fecal-oral, y el principal modo de transmisión es de persona a persona, aunque también se transmiten a través de alimentos, agua contaminada y aerosoles generados a partir de vómitos. Son altamente contagiosos, y son suficientes 10 partículas virales para causar una infección. Tras 12-24 h de incubación, aparecen vómitos, náuseas, diarrea y dolor abdominal, que normalmente se prolongan 24-72 h. La inmunidad frente a estos virus es de corta duración y homotípica, lo que permite sucesivas reinfecciones. Aunque causan una enfermedad leve, que en general no requiere atención médica, suponen un coste económico elevado, sobre todo en los países desarrollados.

### El genoma. Implicaciones en el diagnóstico y la epidemiología

Los norovirus son virus desnudos, que contienen una sola hebra de ARN de pequeño tamaño (~7500 nt, organizados en 3 ORF). Pertenecen a la familia *Caliciviridae*, que incluye 4 géneros de los que 2, norovirus y sapovirus, pueden infectar al ser humano. A partir de la secuencia aminoacídica de la proteína de la cápside VP1, los norovirus se clasifican en 5 genogrupos, de los que 3 (GI [Norwalk], GII y GIV) se asocian con GEA en humanos, y en distintos genotipos. La diversidad genética de las cepas circulantes es elevada, lo que explica que sólo con un par de cebadores sea difícil detectar todos los norovirus. Para detectar norovirus se amplifican normalmente las zonas más conservadas del genoma, localizadas en el gen que codifica la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp), o

la región que se extiende entre el 3 *terminus* del ORF1 y 5 *terminus* del ORF2, aunque también se han empleado otras regiones genómicas (2C helicasa, 3D polimerasa, cápside)<sup>10</sup>. En los últimos años, gracias a las técnicas moleculares, estamos conociendo la epidemiología de las infecciones por norovirus. Desde mediados de los años noventa, han ocurrido en el mundo 3 o 4 grandes ondas epidémicas, todas causadas por variantes del norovirus GII.4 que emergen y reemplazan a la cepa predecesora. Estas nuevas variantes surgen tras la acumulación de pequeñas mutaciones, de modo similar a lo que ocurre en el virus influenza, lo que les permite eludir el sistema inmunitario. De esta manera, las cepas emergentes se expanden por el planeta provocando gran cantidad de brotes y epidemias de GEA en la comunidad.

### Técnicas moleculares frente a métodos diagnósticos tradicionales

Las técnicas moleculares han puesto de relieve el destacado papel de norovirus en la producción de brotes, epidemias y casos esporádicos de GEA. Hay métodos de EIA comercialmente disponibles para su detección, pero tienen menor sensibilidad y especificidad que los moleculares, considerados de elección. El mayor problema que presentan los EIA es que son genotipo específicos y sólo detectan cepas genéticamente similares a las empleadas en el diseño del equipo. Varios estudios han analizado diferentes EIA para detectar norovirus, cuya sensibilidad oscila entre el 30 y el 70%, y su especificidad, entre el 70 y el 100%, en función de los equipos empleados y en la zona geográfica en la que se hizo el estudio<sup>11,12</sup>. Así, en el estudio multicéntrico europeo dirigido por Gray et al<sup>13</sup>, en el que se compararon 2 EIA para detectar antígeno de norovirus en muestras fecales con la RT-PCR, se recomendó la confirmación mediante métodos moleculares de los casos detectados por EIA. Numerosos trabajos han confirmado que los métodos moleculares para detectar norovirus son más sensibles que la detección de antígeno mediante EIA<sup>13,14</sup>. Nuevos refinamientos de las técnicas de amplificación, como es la PCR en tiempo real, pueden incrementar más la sensibilidad de los métodos moleculares<sup>15</sup>. En conclusión, los métodos moleculares constituyen la mejor elección para el diagnóstico de norovirus en los laboratorios de microbiología, y el EIA se limita a laboratorios que carezcan de técnicas moleculares y para situaciones concretas, como el diagnóstico de grandes brotes, debido a que, aunque la sensibilidad no sea muy alta, al procesar un número elevado de muestras se puede llegar al diagnóstico etiológico del brote. En la actualidad, están comenzando a comercializarse métodos moleculares, algunos con marcado CE, si bien carecemos aún de información suficiente sobre su comportamiento.

Los métodos moleculares, que en nuestra experiencia producen buenos resultados para detectar norovirus, son los descritos por Kageyama et al<sup>15</sup> y Green et al<sup>16</sup>, que emplean cebadores dirigidos a la región entre ORF1/ORF2 y al gen *RdRp*, respectivamente.

### Caracterización genética

La caracterización de los genes de la polimerasa (*RdRp*) y de la cápside parece obligada para una correcta clasificación de norovirus. Con fines epidemiológicos, puede bastar con una secuenciación parcial de ambos ge-

nes. La secuenciación de norovirus detectados en pacientes ha permitido establecer o rechazar una relación entre ellos y facilitar el conocimiento sobre la fuente u origen de la infección. En Europa, hay una red (European Network for food-borne viruses) en la que participan actualmente 36 instituciones de 13 países, que recoge los brotes causados por norovirus a través de alimentos ([www.eufoodborneviruses.co.uk](http://www.eufoodborneviruses.co.uk)). CaliciNet es una base de datos estadounidense, en la que se guardan las secuencias de las cepas que causan enfermedad en Estados Unidos, lo que permite realizar una rápida comparación entre ellas.

## Rotavirus

Los rotavirus son la primera causa de GEA grave infantil en el mundo. Cada año matan a más de 611.000 niños en los países en vías de desarrollo<sup>1</sup>, además de ser en los países industrializados una causa frecuente de hospitalización en menores de 5 años<sup>17-21</sup>. La incidencia de la infección es elevada en todos los países, de manera que hacia los 5 años de edad prácticamente todos los niños han presentado al menos un episodio de infección por rotavirus. El coste económico de esta infección es muy elevado, tanto en Estados Unidos<sup>22</sup> como en Europa<sup>23</sup>, y se debe sobre todo a la hospitalización y a la pérdida de días de trabajo. En España, el impacto de la infección por rotavirus es elevado. La incidencia en Guipúzcoa en el período 1991-1997 fue de 56,6 casos por cada 1.000 niños entre 6 y 11 meses de edad<sup>24</sup>. En Castellón, Téllez-Castillo et al<sup>25</sup> notificaron recientemente que en el 12% de las muestras de heces analizadas entre los años 1995 y 2004 se detectó rotavirus. En ambos estudios, se empleó la técnica de detección de antígeno, por lo que esos datos deben considerarse como mínimos.

### Estructura de rotavirus y su genoma

Los rotavirus son virus sin envoltura, pertenecientes a la familia *Reoviridae*, cuyo genoma contiene 11 segmentos de una doble hebra de ARN. La cápside viral tiene 3 capas concéntricas, de las cuales la intermedia está formada por la proteína estructural VP6, que permite clasificar a los rotavirus en 3 grupos: A, B y C. Los rotavirus del grupo A son los que más afectan al hombre. La capa externa está compuesta por las proteínas estructurales VP4 y VP7, a partir de las cuales se clasifican los rotavirus en genotipos P y G, respectivamente. Hasta la fecha, entre los rotavirus del grupo A se han identificado 15 genotipos G y 27 genotipos P. Debido a la naturaleza segmentada de su genoma, estos virus tienen muchas oportunidades de recombinación genética, lo cual se traduce en una rápida evolución y gran diversidad genética de cepas. Además, al ser un virus ARN, experimenta frecuentes mutaciones puntuales.

Los métodos moleculares de detección se dirigen habitualmente al gen *VP6*, debido a su mayor conservación. El genotipado se efectúa mediante RT-PCR anidada multiplex, con dianas en los genes *VP7* y *VP4*. Debido a la referida variabilidad genética de rotavirus, es preciso revisar y actualizar periódicamente las técnicas moleculares que están en uso, con el fin de detectar el máximo número de variantes genéticas<sup>26</sup>.

### Utilidad de los métodos moleculares

Los trabajos que comparan el empleo de técnicas moleculares con la detección de antígeno mediante técnicas inmunológicas o la microscopia electrónica han demostrado una sensibilidad mayor de las técnicas moleculares para detectar rotavirus en muestras clínicas<sup>5,6,27</sup>. Esta mayor sensibilidad puede ser útil en casos especiales (p. ej., en el estudio de transmisión asintomática de rotavirus, detección de cargas virales bajas difícilmente detectables con métodos antigénicos, etc.). Sin embargo, en la práctica diaria, la sensibilidad y la especificidad de muchos métodos inmunológicos para detectar antígeno de rotavirus es adecuada, y su manejo, fácil, por lo que son las técnicas a recomendar en los laboratorios clínicos.

La principal utilidad de las técnicas moleculares es la caracterización de las cepas circulantes, de gran importancia tras la aprobación de vacunas frente a rotavirus para uso en niños menores de un año de edad. La caracterización de las cepas circulantes permite controlar la emergencia de nuevas cepas, debido a mutaciones y/o especialmente recombinación genética entre las existentes y vigilar la posible aparición de cepas que escapan a la inmunidad que confieren las vacunas. Gracias a ella, en los últimos años se ha podido constatar la aparición, la evolución genética y la expansión geográfica, en algunos casos mundial, de la infección causada por nuevos genotipos de rotavirus, como el G9<sup>28</sup> y más recientemente el G12<sup>29</sup>.

EuroRotaNet es una red europea creada para tener un conocimiento mayor de las cepas de rotavirus que circulan por Europa (<http://www.eurorota.net/>).

En conclusión, en la actualidad, no es recomendable el uso de PCR para el diagnóstico sistemático de GEA por rotavirus; sin embargo, los métodos moleculares son imprescindibles para la caracterización genética de las cepas.

### Otros virus causantes de GEA

Astrovirus, sapovirus y adenovirus y otros virus entéricos suponen menos del 15% de los casos de GEA. Mediante el empleo de métodos moleculares, es posible detectarlos y sería muy conveniente hacerlo para tener un conocimiento real de su implicación y epidemiología en la GEA, pero hoy día con las técnicas disponibles es cuestionable que fuera coste-eficaz para los laboratorios de microbiología clínica.

## Conclusión

Gracias a los métodos moleculares, la verdadera incidencia de la GEA producida por virus conocidos va siendo manifiesta. Con ayuda de la biología molecular, nuevas investigaciones pondrán de relieve el papel de nuevos virus en esta entidad clínica tan frecuente. Todo ello, en manos de microbiólogos juiciosos, permitirá dar un mejor y más rápido servicio para el mejor tratamiento de los pacientes, y facilitará a los responsables de la salud pública la toma de decisiones sobre la conveniencia o no de implantar las medidas preventivas disponibles.

### Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:304-6.
- Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*. 2003;361:2226-34.
- Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ*. 2003;81:197-204.
- Alain S, Denis F. Epidemiology of infectious acute diarrhoea in France and Europe. *Arch Pediatr*. 2007;14(Suppl 3):S132-44.
- Simpson R, Aliyu S, Iturriza-Gómara M, Desselberger U, Gray J. Infantile viral gastroenteritis: on the way to closing the diagnostic gap. *J Med Virol*. 2003;70:258-62.
- Amar CF, East CL, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, McLaughlin J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26:311-23.
- Dennehy PH, Gauntlett DR, Tente WE. Comparison of nine commercial immunoassays for the detection of rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol*. 1988;26:1630-4.
- Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM, et al. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3055-8.
- Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis*. 2000;181(Suppl 2):S288-94.
- Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods*. 2004;116:109-17.
- Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2587-95.
- De Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006;137:259-64.
- Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, Vennema H, Sánchez-Fauquier A, Schreier E, et al. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:1349-55.
- Gunson RN, Miller J, Carman WF. Comparison of real-time PCR and EIA for the detection of outbreaks of acute gastroenteritis caused by norovirus. *Commun Dis Public Health*. 2003;6:297-9.
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1548-57.
- Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DW. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol*. 1995;47:392-8.
- Cilla G, Pérez-Trallero E, Piñero LD, Iturzaeta A, Vicente D. Hospitalizations for Rotavirus Gastroenteritis in Gipuzkoa (Basque Country), Spain. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:834-5.
- Gil A, Carrasco P, Jiménez R, San-Martín M, Oyagüez I, González A. Burden of hospitalizations attributable to rotavirus infection in children in Spain, period 1999-2000. *Vaccine*. 2004;22:2221-5.
- Fischer TK. Incidence of hospitalizations due to rotavirus gastroenteritis in Denmark. *Acta Paediatr*. 2001;90:1073-5.
- Charles MD, Holman RC, Curns AT, Parashar UD, Glass RI, Bresee JS. Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in the United States, 1993-2002. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:489-93.
- Sánchez-Fauquier A, Montero V, Moreno S, Solé M, Colomina J, Iturriza-Gomara M, et al. Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1536-41.
- Ho MS, Glass RI, Pinsky PF, Anderson LJ. Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. *J Infect Dis*. 1988;158:1112-6.
- Lorgelly PK, Joshi D, Iturriza Gómara M, Flood C, Hughes CA, Dalrymple J, et al. Infantile gastroenteritis in the community: a cost-of-illness study. *Epidemiol Infect*. 2008;136:34-43.
- Cilla G, Pérez-Trallero E, López-Lopategui MC, Gil Setas A, Gomáriz M. Incidence, seasonality and serotypes of rotavirus in Gipuzkoa (Basque Country), Spain. A 14-year study. *Epidemiol Infect*. 2000;125:677-83.
- Télez Castillo CJ, Tirado Balaguer MD, Colomer Revuelta J, Moreno Muñoz R, Beltrán Garrido JM. Ten-year retrospective study of rotavirus infection in the province of Castellón (Spain). *An Pediatr (Barc)*. 2008;68:39-44.
- Banerjee I, Ramani S, Primrose B, Iturriza-Gomara M, Gray JJ, Brown DW, et al. Modification of rotavirus multiplex RT-PCR for the detection of G12 strains based on characterization of emerging G12 rotavirus strains from South India. *J Med Virol*. 2007;79:1413-21.
- Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3189-95.
- Unicomb LE, Podder G, Gentsch JR, Woods PA, Hasan KZ, Faruque AS, et al. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1885-91.
- Rahman M, Matthijnssens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, et al. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J Virol*. 2007;81:2382-90.