

J. Colomina Rodríguez, M^a T. Gil Borja,
J. Buesa Gómez

An Esp Pediatr 1997;47:341-345.

Rotavirus: Estrategias de vacunación

Introducción

Las enfermedades diarreicas agudas tienen gran importancia en la salud pública, tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo, y afectan a todos los grupos de población. Se estima que la diarrea infecciosa en Asia, África y América Latina origina, al menos, 5 millones de muertes anualmente, ocurriendo la mayor mortalidad en lactantes y niños pequeños. En países desarrollados, la diarrea infecciosa también es una importante enfermedad debilitante y las gastroenteritis debidas únicamente a rotavirus causan un elevado porcentaje de ingresos hospitalarios⁽¹⁾.

Han pasado más de dos décadas desde la primera descripción de rotavirus asociado a enfermedad en el ser humano y su identificación como el principal agente etiológico productor de diarrea aguda en niños⁽²⁾. Desde entonces, los progresos alcanzados en el conocimiento sobre la biología molecular y la patogénesis de estos virus y sobre la epidemiología de la enfermedad que producen han sido considerables. Aunque mundialmente se acepta la necesidad de una vacuna contra rotavirus, la prioridad que el desarrollo de la misma ocupa con respecto a otras en vías de producción es controvertido, ya que actualmente no está considerada dentro de las 10 más prioritarias⁽³⁾, a pesar de que los datos relacionados con la magnitud de la morbilidad y el impacto económico que causa la infección son alarmantes (Tabla I).

Historia natural de la enfermedad

La diarrea severa causada por rotavirus tiene lugar con mayor frecuencia en niños entre los 6 meses y los 2 años de edad, seguido del grupo de niños menores de 6 meses. Los recién nacidos pueden infectarse, pero es poco frecuente que tengan síntomas clínicos, lo que sugiere que los anticuerpos maternos adquiridos de forma pasiva son protectores. Dado que la edad en la que tiene lugar la deshidratación más severa coincide con el descenso de anticuerpos maternos, una vacunación efectiva debería inducir una respuesta inmune activa capaz de reproducir la protección conferida en las edades tempranas de la vida. A su vez, el claro descenso en la incidencia de la enfermedad aguda a partir de los 2 años de edad, indica que la inmunidad activa adquirida protege contra la enfermedad.

Varios estudios en animales y niños han sugerido que la protección frente a la enfermedad está mediada, principalmente, por la inmunidad intestinal local⁽⁴⁾. De hecho, la administración oral de anticuerpos anti-rotavirus a niños puede reducir la incidencia y severidad de los síntomas ante futuras infecciones por rotavirus^(5,6). Un aumento evidente del título de IgA anti-rotavirus o la conversión de anticuerpos neutralizantes en heces son considerados actualmente los marcadores más sensibles de infección por rotavirus^(7,8), mientras que la presencia de anticuerpos neutralizantes en yeyuno o de IgA secretora se correlaciona mejor con protección frente a la enfermedad⁽⁹⁾.

Estos aspectos refuerzan la necesidad de desarrollar una vacuna viva oral atenuada capaz de estimular la inmunidad intestinal en vez de una vacuna de administración parenteral, además de recomendar el desarrollo de una vacuna que induzca inmunidad activa frente a los múltiples serotipos víricos circulantes, amplia e imprevisiblemente distribuidos, antes de la primera exposición a los 2-6 meses de edad.

Primera generación de vacunas: Ensayos con cepas animales

La mayoría de los datos utilizados en el desarrollo de vacunas frente a rotavirus han sido obtenidos a partir de ensayos realizados en animales, tanto en lo referente al huésped como al serotipo de virus empleado. Se han diseñado diversos tipos de estrategias con el objeto de determinar la protección inmunológica tras la administración de partículas de rotavirus procedentes de diversas especies animales. En los estudios iniciales en niños se utilizaron vacunas monovalentes con virus infectivos atenuados por vía oral (Tabla II).

Los primeros ensayos de vacunación oral en los que se obtuvieron resultados prometedores fueron llevados a cabo en Finlandia utilizando la cepa bovina RIT 4237 adaptada al frío^(10,11). Alrededor de 300 niños con edades comprendidas entre 6-12 meses, recibieron la vacuna oral durante los meses previos a una epidemia de rotavirus. Tan sólo el 3% de los niños vacunados desarrollaron una diarrea aguda, en contraposición con el 16% de los que recibieron el placebo. Muchos de los niños vacunados quedaron protegidos frente a rotavirus, a pesar de la ausencia de anticuerpos séricos específicos detectados por técnica de ELISA. La protección inmunológica observada fue atribuida a inmunoglobulinas intestinales específicas anti-rotavirus (IgG o IgA), a la inmunidad celular frente al virus o a ambos meca-

Servicio de Microbiología. Hospital Clínico y Facultad de Medicina. Valencia
Financiación: Fondo de Investigación Sanitaria (BAE 97/5358 y Proyecto 96/1173)
Correspondencia: Javier Colomina Rodríguez. Departamento de Microbiología.
Facultad de Medicina. Avda. Blasco Ibañez, 17. 46010. Valencia

Tabla I Estimación anual del impacto socio-económico de la enfermedad por rotavirus⁽¹⁾

	<i>Estados Unidos</i>		<i>A nivel mundial</i>	
	<i>total</i>	<i>riesgo por niño</i>	<i>total</i>	<i>riesgo por niño</i>
Nacimientos	4,1 millones		140 millones	
Episodios de gastroenteritis por rotavirus	3,5 millones	1:1,2	130 millones	1:1,1
Visitas médicas	500.000	1:8		
Hospitalizaciones (EE.UU.) o casos de diarrea moderada-severa (mundialmente)	85.000	1:40	18 millones	1:30
Fallecimientos	75-125	1:40.000	873.000	1:160
Costes (en dólares):				
- por hospitalizaciones	500 millones			
- indirectos	1.200 millones			

nismos. Posteriormente, en Lima se evaluó el efecto de varias dosis, y se comprobó que la eficacia de la vacunación en los casos en que rotavirus era el único patógeno hallado, únicamente quedaba demostrada cuando se administraban tres dosis⁽¹²⁾. Sin embargo, los ensayos realizados en zonas donde las infecciones entéricas son altamente endémicas, como Ruanda, Gambia o la reserva de indios Navajos en California, han mostrado que la vacunación con la cepa RIT 4237 no induce una protección evidente frente a la diarrea por rotavirus⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Posteriores investigaciones realizadas en neonatos han aportado nuevas ideas sobre estrategias de vacunación⁽¹⁶⁾. Mientras que la administración de la vacuna no origina efectos protectores frente a las infecciones, sí se obtiene protección frente a la enfermedad severa. El efecto protector es mayor en el grupo de niños a los que se les administra la vacuna justo antes del brote epidémico, que en el grupo que la recibe varios meses antes. La protección se prolonga hasta 2-3 años después, sin embargo, no se aprecia una buena correlación entre la protección clínica y la respuesta serológica. Nuevos estudios concluyen que la administración de, al menos, dos dosis, una durante el período neonatal y otra a los 7 meses de edad, proporciona unos porcentajes de protección interesantes, de hasta el 89%⁽¹⁷⁾. Estos hallazgos sugieren que el momento para la vacunación, la edad y/o el número de dosis administradas son decisivos para la obtención de una respuesta protectora óptima.

Las investigaciones realizadas han demostrado que la inmunización activa en niños utilizando cepas heterólogas (no humanas) de rotavirus, induce los mismos mecanismos inmunológicos de protección contra la enfermedad que los observados tras la infección natural. Los niños inmunizados quedan protegidos frente a la enfermedad severa, pero no están libres de sufrir nuevas reinfecciones. Las bases de la protección inmunológica frente a rotavirus después de la inmunización activa siguen por tanto poco definidas. Los numerosos ensayos de eficacia realizados hasta el momento revelan que las vacunas monovalentes de cepas animales no protegen de forma satisfactoria frente a la infección. La disparidad de resultados po-

Tabla II Cepas de rotavirus empleadas en ensayos de vacunación

<i>Origen del virus</i>	<i>Cepas víricas (serotipo G)</i>
Rotavirus animales	Cepa bovina RIT 4237 (serotipo 6) Cepa de mono rhesus RRV MMU-18006 (serotipo 3) Cepa bovina WC3 (serotipo 6)
Rotavirus recombinantes (animales-humanos)	Cepas originarias de mono rhesus: RRV x D (serotipo 1) RRV x DS1 (serotipo 2) RRV x ST3 (serotipo 4) RRV x HRV VP7 (serotipos 1, 2 y 4) Cepas originarias bovinas: UK x HRV VP7 (serotipos 1-4) WC3 x HRV VP7 (serotipo 1) = cepa WI79-9
Rotavirus humanos	Cepa M37 (serotipo 1) Cepa RV3 (serotipo 3) Cepa adaptada al frío (serotipo 1)

dría atribuirse al empleo de diferentes poblaciones infantiles, de manera que los resultados deben ser analizados por separado y, por lo tanto, no pueden ser extrapolados a países en vías de desarrollo ni viceversa.

Segunda generación de vacunas: Ensayos con cepas vivas recombinantes (animales-humanas)

La posibilidad de que la inmunidad serotipo-específica sea necesaria en la protección frente a la infección primaria por rotavirus y los resultados variables obtenidos con las vacunas monovalentes, modificaron las estrategias de inmunización frente a rotavirus. El objetivo fue desarrollar una vacuna multivalen-

te conteniendo virus viables pertenecientes a los cuatro serotipos de mayor incidencia epidemiológica. Los rotavirus recombinantes son preparados mediante coinfección de cultivos celulares con cepas "patrón" de rotavirus animales (cepa de simio RRV o cepas bovinas UK y WC3), junto con rotavirus humanos de distinto serotipo. Bajo la presión selectiva de anticuerpos frente a una de las cepas patrón, se seleccionan aquellos virus recombinantes que contienen 10 genes de la cepa animal y el gen de la cepa humana codificante de la proteína VP7 correspondiente a los serotipos humanos 1, 2, 3, ó 4^(18,19) (Tabla II).

La combinación de los distintos recombinantes obtenidos ha dado lugar al diseño actual de una vacuna tetravalente de administración oral en niños, que proporciona protección frente a las diarreas severas por rotavirus. Esta vacuna tiene una eficacia superior al 80%, similar a la adquirida tras la infección natural, y a nivel sanitario podría estar disponible en el plazo de uno o dos años. No obstante, la hipótesis científica de diseñar una vacuna con el objeto de inducir una respuesta inmunitaria específica frente a determinados serotipos es, hoy en día controvertida, ya que los distintos estudios realizados no han llegado a demostrar convincentemente que la inmunidad homotípica (serotipo-específica) induzca un mayor grado de protección que la inmunidad heterotípica.

Tercera generación de vacunas: Ensayos con cepas humanas atenuadas

Los variaciones observadas con las vacunas monovalentes y las recombinantes, han llevado a considerar nuevas líneas de investigación (Tabla II). Es posible que para que una vacuna sea eficaz deba reproducir de forma natural lo acontecido frente a cepas humanas más que frente a cepas animales. La dificultad de cultivo de las cepas humanas de rotavirus y, por tanto, su atenuación, había impedido con anterioridad el uso de vacunas polivalentes frente a los serotipos epidemiológicamente más importantes.

Flores y colaboradores fueron los primeros en ensayar la seguridad e inmunogenicidad de una vacuna con rotavirus humanos (cepa M37)⁽²⁰⁾. Esta cepa fue aislada de un recién nacido asintomático en Venezuela y adaptada al crecimiento en cultivo celular. Comparte especificidades VP7 y VP4 con los principales serotipos humanos, por lo que debería inducir una respuesta inmunitaria cruzada frente a rotavirus en mayor cuantía que las vacunas derivadas de cepas animales. Además, dado que la cepa había sido aislada de un niño que estaba asintomático en el momento de la infección, se consideró que la cepa se había atenuado de forma natural. Cuando se probó la vacuna en niños de 10-12 semanas de edad, se detectó algún efecto secundario en el 20% de los niños inmunizados. El 64% de los niños desarrolló anticuerpos neutralizantes frente a la cepa inoculada, sin embargo, la respuesta neutralizante heterotípica frente a serotipos víricos concretos fue variable y escasa. Se observó también que el nivel de anticuerpos fue menor en los niños en los que ya existían previamente anticuerpos. La eliminación de virus por heces se detectó en el 40% de los vacunados, quizás debido al pobre

crecimiento de la cepa, lo que actualmente cuestiona el grado de inmunogenicidad de esta cepa.

Próximas generaciones de vacunas: Vacunas basadas en técnicas de biología molecular

Los avances en ingeniería genética han estimulado la búsqueda por nuevas vías de una vacuna efectiva para rotavirus. La utilización de técnicas de biología molecular ha desencadenado diversos avances en comparación con el uso de vacunas vivas atenuadas, siendo el más importante la seguridad obtenida, en especial frente a pacientes inmunocomprometidos. Además, se han reducido costes en la elaboración, mejoras en la conservación y estabilidad durante el transporte, y la eliminación de interferencias con otras vacunas o microorganismos entéricos.

Se han llevado a cabo diferentes aproximaciones en la elaboración de vacunas con subunidades de rotavirus, las cuales podrían usarse tanto en humanos como animales. Las partículas virales sin ARN han sido ensayadas en la vacunación subcutánea preparto de hembras de ratones embarazadas, detectándose con posterioridad títulos elevados de IgG anti-rotavirus en la leche de las hembras y confiriéndoles protección pasiva a las crías⁽²¹⁾. Otros estudios han detectado también anticuerpos neutralizantes y linfocitos T citotóxicos específicos tras la administración oral y parenteral de estas partículas⁽²²⁾. No obstante, el desarrollo de vacunas basadas en proteínas víricas purificadas a pesar de ser factible, no parece práctico. El fraccionamiento de la partícula de rotavirus en sus componentes, la producción de proteínas solubles y la subsiguiente purificación de las proteínas individuales, podría dar lugar a un conjunto de proteínas desnaturalizadas incapaces de inducir respuesta inmunitaria protectora.

Por el contrario, la elaboración de vacunas basadas en proteínas sintetizadas mediante la expresión de genes clonados parece hoy en día la estrategia más atractiva en el campo de la biología molecular. Se ha determinado la secuencia de nucleótidos de los 11 segmentos genómicos de rotavirus de diferentes cepas, centrándose, sobre todo, en los segmentos que codifican las proteínas de la cubierta externa del virus, la hemaglutinina VP4 y la glicoproteína VP7. La clonación y expresión de estos dos segmentos se ha realizado en varios sistemas en un intento por desarrollar vacunas efectivas.

Proteínas sintetizadas con vectores procariotas

Los resultados obtenidos en la expresión de proteínas de la cubierta externa de rotavirus en bacterias han sido poco concluyentes. La VP7 y la VP4 han sido expresadas en *Escherichia coli* como una proteína de fusión, ya que habitualmente la expresión de la proteína sola es tóxica. Aunque los fragmentos proteicos expresados son antigénicos e inmunógenos, los niveles de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación específicos frente a rotavirus obtenidos de ratones inmunizados son bajos^(23,24). La incapacidad de los sistemas de expresión procariotas de glicosilar y expresar proteínas con enlaces disulfu-

ro, constituye una importante limitación de estos vectores en la expresión de la proteína VP7, en donde los epítomos son dependientes de la conformación estructural⁽²⁵⁾.

Se ha propuesto el empleo de *Salmonella* como vector de expresión de proteínas de rotavirus, existiendo actualmente escasa información al respecto⁽²⁶⁾. La ventaja de este sistema sería la gran capacidad de replicación del vector en el intestino, con la subsiguiente presentación de la proteína expresada al sistema inmunitario de la mucosa intestinal. El uso de micobacterias como vector vivo de expresión de proteínas tiene también ventajas potenciales, siendo la más importante el requerimiento de una sola dosis⁽²⁷⁾. Aunque actualmente estos vectores están empezando a ser evaluados, actualmente existen problemas técnicos en la expresión de epítomos protectores.

Proteínas sintetizadas mediante vectores víricos vivos

El virus vacuna es uno de los vectores víricos más ampliamente utilizados en la actualidad. Los resultados experimentales obtenidos usando este vector, han sido muy útiles para la comprensión de la capacidad potencial de inmunización que se logra con virus vivos recombinantes. Aunque el uso del virus vacuna en inmunizaciones no está exento de complicaciones, sobre todo, en personas inmunocomprometidas, actualmente están siendo estudiados los genes implicados en su neurovirulencia, de manera que puedan incluirse modificaciones que hagan que nuevas cepas de virus sean menos reactivas.

El virus vacuna ha sido utilizado de forma satisfactoria en la expresión completa de la proteína VP7 de SA11 en su totalidad y delecciones de la misma⁽²⁸⁾. Se ha visto que la expresión de dicha proteína mantiene sus características antigénicas e inmunogénicas, aunque los anticuerpos neutralizantes producidos en ratones tienen un título bajo.

Existen otros vectores de virus vivos que merecen ser considerados. Los vectores que utilizan adenovirus son atractivos, porque las vacunas con adenovirus se administran comúnmente por vía oral y protegen frente a infecciones respiratorias. No obstante, la seguridad de los adenovirus en niños no ha sido totalmente establecida y su uso como vectores de expresión de antígenos de rotavirus se ha iniciado recientemente^(29,30).

Perspectivas futuras

El desarrollo de vacunas frente a rotavirus constituidas por subunidades víricas VLPs ("virus-like particles") está siendo investigado en los últimos años⁽³¹⁾. Para su obtención, células de insectos son infectadas con una combinación de baculovirus recombinantes que expresan las principales proteínas estructurales de rotavirus. Las VLPs resultantes administradas parenteralmente a conejos, inducen el desarrollo de altos niveles de anticuerpos séricos y fecales de clase IgG, a títulos comparables a los obtenidos cuando se administra oralmente una cepa virulenta de rotavirus. Su elevada inmunogenicidad abriría, de este modo, la posibilidad de vías alternativas de inmunización y su incorporación a otras vacunas parenterales utilizadas en pediatría.

La inoculación directa en epidermis de ADN plasmídico que

codifica proteínas víricas específicas es el diseño más novedoso en el desarrollo de vacunas⁽³²⁾. Este sistema permite la expresión de proteínas inmunogénicas en las propias células humanas, y su posterior procesamiento a través del sistema inmune. Los estudios realizados en ratones muestran el desarrollo de anticuerpos séricos y linfocitos T citotóxicos específicos frente a rotavirus, demostrando que la vacuna ADN suponen una nueva alternativa potencial en el control de las infecciones.

Bibliografía

- 1 Glass RI, Gentsch J, Smith JC. Rotavirus vaccines: success by reassortment?. *Science* 1994; **265**:1389-1391.
- 2 Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet* 1973; **2**:1281-1283.
- 3 Institute of Medicine. Prospects for immunizing against rotavirus. En: New vaccine development. Establishing priorities. Diseases of importance in the United States. Vol 1. Washington DC: National Academy Press 1985; 410-423.
- 4 Molineaux PJ. Human immunity to rotavirus. *J Med Microbiol* 1995; **43**:397-404.
- 5 Barnes GL, Doyle LW, Hewson PH, et al. A randomized trial of oral gammaglobulin in low-birth-weight infants infected with rotavirus. *Lancet* 1982; **1**:1371-1373.
- 6 Davidson GP, Daniels E, Nunan H, et al. Passive immunization of children with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *Lancet* 1989; **ii**:709-712.
- 7 Losonsky GA, Reymann M. The immune response in primary asymptomatic and symptomatic rotavirus infection in newborn infants. *J Infect Dis* 1990; **161**:330-332.
- 8 Coulson BS, Grimwood K, Masendycz PJ, 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**:1367-1374.
- 9 Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis* 1993; **167**:577-583.
- 10 Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Andre D, Andre FE, Zissis G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus vaccine. *Lancet* 1988; **i**:977-981.
- 11 Vesikari T, Isolauri E, Delem A, et al. Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. *J Pediatr* 1985; **107**:189-194.
- 12 Lanata CF, Black RE, Del Aguila R. 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.
- 13 De Mol P, Zissis G, Butzler JP, Mutwewingabo A, Andre FE. Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine (letter). *Lancet* 1986; **2**:108.
- 14 Hanlon P, Hanlon L, Marsh V, et al. Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *Lancet* 1987; **1**:1342-1345.
- 15 Santosham M, Letson GW, Wolff M, et al. A field study of the safety and efficacy of two candidate rotavirus vaccine in a Native American population. *J Infect Dis* 1991; **163**:483-487.
- 16 Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J*

- Infect Dis* 1990; **22**:259-267.
- 17 Vesikari T, Ruuska T, Delem A, Andre FE, Beards GM, Flewett TH. Efficacy of two doses of RIT 4237 bovine rotavirus vaccines for prevention or rotavirus diarrhoea. *Acta Paediatr Scand* 1991; **80**:173-180.
 - 18 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.
 - 19 Clark HF, Borian FE, Modesto K, Plotkin SA. Serotype 1 reassortant of bovine rotavirus WC3, strain WI79-9, induces a polytypic antibody response in infants. *Vaccine* 1990; **8**:327-332.
 - 20 Flores J, Pérez-Schael I, Blanco M, *et al.* Comparison of reactogenicity and antigenicity of M37 rotavirus vaccine and rhesus-rotavirus-based quadrivalent vaccine. *Lancet* 1990; **ii**:330-334.
 - 21 Sheridan JF, Smith CC, Manak MM, Aurelian L. Prevention of rotavirus-induced diarrhea in neonatal mice born to dams immunized with empty capsids of simian rotavirus SA-11. *J Infect Dis* 1984; **149**:434-438.
 - 22 Offit PA, Dudzik KI. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes appear at the intestinal mucosal surface after rotavirus infection. *J Virol* 1989; **63**:3507-3512.
 - 23 Arias CF, Ballado T, Plebanski M. Synthesis of the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in *Escherichia coli*. *Gene* 1986; **47**:211-219.
 - 24 Arias CF, Liziano M, Lopez S. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J Gen Virol* 1987; **68**:633-642.
 - 25 Matsui SM, Mackow ER, Greenberg HB. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv Virus Res* 1989; **36**:181-214.
 - 26 Salas-Vidal E, Plebanski M, Castro, *et al.* Synthesis of the surface glycoprotein of rotavirus SA11 in the aro A strain of *Salmonella typhimurium* SL3261. *Res Microbiol* 1990; **141**:883-886.
 - 27 Bloom BR. Vaccines for the Third World. *Nature* 1989; **342**:115-120.
 - 28 Andrew ME, Boyle DB, Coupar BEH, Whitfield PL, Both GW, Bellamy AR. Vaccina virus recombinants expressing the SA11 rotavirus VP7 glycoprotein gene induce serotype-specific neutralizing antibodies. *J Virol* 1987; **61**:1054-1060.
 - 29 Gorziglia M, Kapikian AZ. Expression of the OSU rotavirus outer capsid protein VP4 by an adenovirus recombinant. *J Virol* 1992; **66**:4407-4412.
 - 30 Both GW, Lockett LJ, Janardhana V, *et al.* Protective immunity to rotavirus-induced diarrhoea is passively transferred to newborn mice from naive dams vaccinated with a single dose of a recombinant adenovirus expressing rotavirus VP7SC. *Virology* 1993; **193**:940-950.
 - 31 Conner ME, Zarley CD, Hu B, *et al.* Virus like-particles as a rotavirus subunit vaccine. *J Infect Dis* 1996; **174** (Suppl 1):S88-92.
 - 32 Herrmann JE, Chen SC, Fynan EF, Santoro JC, Greenberg HB, Wang S, Robinson HL. Protection against rotavirus infections by DNA vaccination. *J Infect Dis* 1996; **174** (Suppl 1):S93-97.