

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LA
RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN UNA
INFECCION NATURAL POR ROTAVIRUS

T E S I S

QUE EN OPCION PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

Q.B.P. GRISELDA EDITH MENCHACA RODRIGUEZ

MONTERREY, N. L., MEXICO

JUNIO DE 1997

TM

Z5320

FCB

1997

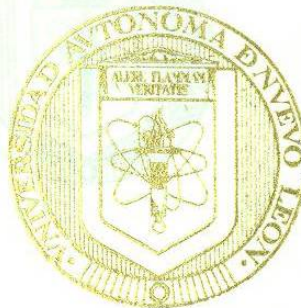
M46



1020119983

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MT
00000
009
FPPY
JHM



DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA
INMUNE HUMORAL EN UNA INFECCION NATURAL POR
ROTAVIRUS

TESIS

TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
QUE EN OPCION PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA

Q.B.P. GRISelda EDITH MENCHACA RODRIGUEZ
PRESENTA

Q.B.P. GRISelda EDITH MENCHACA RODRIGUEZ

MONTERREY, N. L., MEXICO

JUNIO DE 1997

TM
Z5320
FCB
1997
M46

0130-94160

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA
INMUNE HUMORAL EN UNA INFECCION NATURAL POR
ROTAVIRUS**

TESIS

**QUE EN OPCION PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

PRESENTA

Q.B.P. GRISELDA EDITH MENCHACA RODRIGUEZ

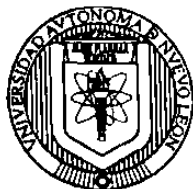
MONTERREY, NUEVO LEON, MEXICO

JUNIO DE 1997



FONDO TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE
HUMORAL EN UNA INFECCION NATURAL POR ROTAVIRUS

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL *Laboratorio de Inmunología y Virología* DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, U.A.N.L. Y EN EL *Laboratorio Dr. Carlos Arias/Dra. Susana López* DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA, U.N.A.M., BAJO LA DIRECCION DE:

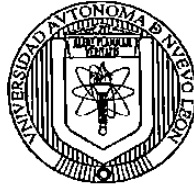
DIRECTOR: _____

Juan Francisco Contreras Cordero
M.C. Juan Francisco Contreras Cordero

CO-DIRECTOR: _____

Carlos F. Arias O.
Dr. Carlos F. Arias Ortiz

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE
HUMORAL EN UNA INFECCION NATURAL POR ROTAVIRUS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

Q.B.P. GRISELDA EDITH MENCHACA RODRIGUEZ

COMISION DE TESIS

M.C. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO
PRESIDENTE

DR. BENITO PEREYRA ALFEREZ
SECRETARIO

DR. REYES SILVESTRE TAMEZ GUERRA
VOCAL

MONTERREY, NUEVO LEON, MEXICO

JUNIO DE 1997

*En honor a mi tía,
Profra. Carlota Menchaca Menchaca
(2.E.P.D.),
una meta más alcanzada...*

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iii
RESUMEN	vi
INTRODUCCION	1
<i>Generalidades</i>	1
<i>Clasificación</i>	2
<i>Serotipos G</i>	3
<i>Serotipos P</i>	4
<i>Respuesta inmune</i>	8
<i>Respuesta específica a proteínas de superficie</i>	11
<i>Perspectivas</i>	13
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	16
MATERIAL Y METODO	17
<i>Colección de muestras</i>	17
<i>Protocolo para la toma de muestras</i>	17
<i>Diagnóstico primario de rotavirus</i>	18
<i>Caracterización molecular de la cepa de rotavirus</i>	20
<i>Detección de serotipos G y P</i>	20
<i>Diversidad de epiotpes en VP4</i>	22
<i>Determinación de genotipo P mediante PCR</i>	22
<i>a) Extracción de RNA viral</i>	22
<i>b) Transcripción inversa de RNA a cDNA (RT-PCR)</i>	23
<i>c) Obtención de Genotipo</i>	25
<i>Especificidad de la respuesta inmune</i>	27
<i>Detección de IgA secretora específica de rotavirus en heces fecales</i>	27
<i>Detección de IgM e IgG específica de rotavirus en suero</i>	27
<i>Cuantificación de anticuerpos neutralizantes</i>	28

	Página
a) <i>Microtitulación de focos infecciosos por rotavirus</i>	28
b) <i>Ensayos de neutralización</i>	29
c) <i>Caracterización de anticuerpos neutralizantes</i>	31
<i>Especificidad de anticuerpos neutralizantes contra epitopes de VP7 y VP4</i>	31
RESULTADOS	35
Brote epidémico 1994-1995	35
Caracterización molecular de la cepa infectante	38
<i>Serotipos G</i>	38
<i>Serotipos P</i>	41
<i>Serotipos G Y P de cepas de rotavirus humanas</i>	43
<i>Determinación de genotipo P</i>	45
Especificidad de la respuesta inmune	47
<i>Detección de IgA secretora en heces fecales</i>	47
<i>Detección de IgM e IgG contra rotavirus en suero</i>	47
<i>Cuantificación de anticuerpos neutralizantes</i>	49
a) <i>Seroconversión homóloga</i>	51
b) <i>Seroconversión homóloga y heteróloga</i>	51
c) <i>Seroconversión heteróloga</i>	52
<i>Especificidad de anticuerpos neutralizantes contra proteínas VP7 y VP4 de rotavirus</i>	52
a) <i>Sueros con cepa infectante G1</i>	52
b) <i>Sueros con cepa infectante G3</i>	53
c) <i>Sueros con cepa infectante G1, G3</i>	54
<i>Especificidad de anticuerpos neutralizantes contra epitopes de VP4 y VP7</i>	56
a) <i>Sueros con reacción homóloga a G1</i>	57
b) <i>Sueros con reacción homóloga a G3</i>	57
c) <i>Sueros con reacción heteróloga</i>	57
DISCUSION	59
CONCLUSION	66
BIBLIOGRAFIA	68

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, U.A.N.L. DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO, las facilidades otorgadas a mi persona, para estudiar y realizar una especialización dentro de mi carrera profesional, la cual me permitirá desarrollarme y desempeñarme mejor dentro de mi trabajo.

Agradezco al LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y VIROLOGIA, F.C.B. por permitirme realizar mi trabajo práctico de tesis de Maestría.

Agradezco al LABORATORIO Dr. CARLOS ARIAS/Dra. SUSANA LOPEZ, U.N.A.M. todas las atenciones y facilidades para realizar estancias en ese laboratorio, realizando gran parte del trabajo práctico de mi tesis de Maestría, así como adquiriendo nuevos conocimientos teóricos, los cuales formaron parte de mi carga académica de Postgrado.

Agradezco al M.C. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO, Director y Asesor de mi Maestría, por todo el tiempo e interés invertido en mi formación académica. Pero sobre todo, agradezco la gran amistad que siempre me has brindado, apoyándome incansablemente; la cual me permitió culminar esta nueva meta ... *Gracias Teacher.*

Agradezco al Dr. CARLOS ARIAS ORTIZ, responsable del LABORATORIO Dr. CARLOS ARIAS/Dra. SUSANA LOPEZ, U.N.A.M., quien fungió como mi Co-Director de tesis, por dirigirme y asesorarme en aspectos técnicos sobre mi trabajo práctico de investigación; así como también agradezco, la siempre disposición de su parte, para discutir y revisar los resultados obtenidos, con los cuales se tomaron fundamentales decisiones, en la culminación de dicho trabajo.

Agradezco al Dr. REYES S. TAMEZ GUERRA, por sus valiosos comentarios sobre la redacción y edición de la tesis, así como también, por formar parte del jurado en mi examen profesional.

Agradezco al Dr. BENITO PEREYRA ALFEREZ, del LABORATORIO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE MICROORGANISMOS, F.C.B., por su siempre disposición sobre aspectos académicos; sus importantes observaciones en la edición de la tesis y, por ser parte de mi jurado en mi examen profesional.

Agradezco al Dr. CARLOS HERNANDEZ LUNA, responsable del DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, F.C.B., por sus acertados comentarios sobre la edición del escrito de tesis, crítica constructiva, con la cual se pudo obtener una mejor presentación y redacción de ésta. Además agradezco también todas sus enseñanzas teóricas durante mi postgrado, quienes ayudaron en gran medida a mi formación académica.

Agradezco a la M.C. MARTHA MENDEZ TOSS, por la gran ayuda otorgada en la producción de cepas de rotavirus, utilizadas durante el trabajo práctico de tesis. Pero sobre todo, gracias por los momentos compartidos durante toda mi estancia en Cuernavaca, en los cuales mutuamente nos dimos apoyo y comprensión en momentos difíciles, surgiendo una bella amistad.

Agradezco a las Señoritas: CLAUDIA , MAYRA e IVETT, quienes en su momento formaron parte del equipo de laboratorio, por su valiosa ayuda en la recolección de muestras para la realización de este estudio.

Agradezco a TODA MI FAMILIA: PAPAS, HERMANOS Y SOBRINOS, por su apoyo moral y la inmensa paciencia con que han aguantado, que un día volvamos a estar juntos, compartiendo todos los momentos de nuestras vidas. Gracias, les prometo que la espera será recompensada.

Pero ante todo, **Agradezco a DIOS**, por darme vida, salud y fortaleza, para enfrentar un sinnúmero de altibajos, durante esta meta en mi vida.

A todos USTEDES, **Muchas gracias**

Griselda Edith Menchaca Rodríguez

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	Título	Página
1	Rotavirus SA11, composición génica y proteica	2
2	Propiedades de los anticuerpos monoclonales contra serotipos G1-G4	5
3	Tentativa clasificación de las proteínas VP4 de cepas de rotavirus humano basado en sus características genómicas y antigénicas	6
4	Clasificación genómica y antigénica de las proteínas VP4 del grupo A de rotavirus	9
5	Anticuerpos monoclonales específicos de serotipos G	20
6	Anticuerpos monoclonales específicos de serotipos P	20
7	Cepas de rotavirus utilizadas como controles en la determinación de serotipo G y P	21
8	Anticuerpos monoclonales específicos de epitopes de neutralización en la proteína VP4 de rotavirus	22
9	Oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen cuatro de rotavirus humano	24
10	Frecuencias de temperaturas utilizadas para amplificar el gen 4 de rotavirus	24
11	Oligonucleótidos específicos de secuencia, utilizados para la obtención de genotipo P de cepas de rotavirus humanos	25
12	Cepas de rotavirus utilizados como controles en la detección de Genotipo P	26
13	Frecuencias de temperaturas utilizadas en la obtención del Genotipo P de cepas de rotavirus humanas	26
14	Cepas de rotavirus con diferente serotipo, utilizadas para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes en suero	30
15	Cepas de rotavirus rearreglantes utilizadas para	

	determinar la especificidad de anticuerpos neutralizantes contra VP7 y VP4	32
16	Anticuerpos monoclonales utilizados para la determinación de la especificidad de epitopes en VP7, de anticuerpos neutralizantes	33
17	Anticuerpos monoclonales utilizados para la determinación de la especificidad de epitopes en VP4, de anticuerpos neutralizantes	33
18	Datos generales del brote epidémico de rotavirus 1994-1995	36
19	Caracterización de cepas de rotavirus humano en serotipos G	38
20	Frecuencia de serotipos G en muestras de niños sintomáticos y asintomáticos para rotavirus	40
21	Caracterización de cepas de rotavirus humano en serotipos P	41
22	Frecuencia de serotipos P en muestras de pacientes sintomáticos y asintomáticos para rotavirus	43
23	Relación de serotipos G y P de cepas de rotavirus humanas en pacientes sintomáticos	44
24	Relación de serotipos G y P de cepas de rotavirus humanas en pacientes asintomáticos	44
25	Genotipo P de cepas de rotavirus con variabilidad de epitopes en VP4	45
26	Detección de IgA específica de rotavirus en heces fecales	47
27	Edad en meses y serotipo G,P infectante de sueros pares recolectados, para la determinación de la especificidad de la respuesta inmune humoral, en una infección natural por rotavirus	48
28	Detección de anticuerpos IgM e IgG contra rotavirus en suero de fase aguda y convaleciente de niños con rotavirus	49
29	Seroconversión de anticuerpos neutralizantes contra cepas de rotavirus, en suero de fase aguda y convaleciente de niños con infecciones primarias	53

30	Especificidad de anticuerpos neutralizantes para las proteínas VP7 y VP4 de rotavirus en suero de fase aguda y convaleciente, de niños con infecciones primarias	55
31	Especificidad de anticuerpos neutralizantes hacia epitopes de neutralización en VP7 y VP4 de rotavirus, en suero de fase aguda y convaleciente de niños con una infección primaria	58

Figura	Título	Página
1	Número de muestras y casos positivos para rotavirus durante el brote epidémico de Octubre 1994-Febrero 1995	35
2	Frecuencia de casos de rotavirus en niños con y sin gastroenteritis durante 1994-1995	36
3	Frecuencia de edades en niños con rotavirus durante 1994-1995	37
4	Coinfecciones con dos rotavirus con serotipo G diferente en casos de gastroenteritis	39
5	Comportamiento de los serotipos G1 y G3 durante el brote epidémico de rotavirus 1994-1995	40
6	Comportamiento de los serotipos G1 y G3 en pacientes Sintomáticos durante el brote epidémico de rotavirus 1994-1995	42
7	Comportamiento de los serotipos G1 y G3 en pacientes Asintomáticos durante el brote epidémico de rotavirus 1994-1995	42
8	Comportamiento de los serotipos P1A y P1A,P1B durante el brote epidémico de rotavirus 1994-1995	43
9	Genotipo P de rotavirus mediante PCR	46
10	Anticuerpos de clase IgM e IgG contra rotavirus en suero de fase aguda de niños con gastroenteritis	50
11	Anticuerpos de clase IgM e IgG contra rotavirus en suero de fase convaleciente de niños con gastroenteritis	50

RESUMEN

Un panel de anticuerpos monoclonales específicos de serotipos G y P, así como cepas de rotavirus rearreglantes que expresan una de las proteínas de superficie de origen humano, se utilizaron para caracterizar, mediante un ensayo inmunoenzimático y neutralización de focos infecciosos, las cepas presentes en heces y la respuesta inmune humoral de sueros pares obtenidos de niños con una infección natural de rotavirus. Las cepas y sueros fueron obtenidos de infantes con o sin diarrea en la Ciudad de Monterrey, N. L. México. durante el período de Octubre de 1994 a Febrero de 1995.

De 860 muestras de heces fecales analizadas, 392 (46%) fueron positivas para rotavirus; de éstas, 337 (64%) procedían de pacientes sintomáticos y 55 (17%) de asintomáticos. La caracterización molecular de la cepa infectante se realizó en 139 muestras, encontrando un predominio del serotipo G1 (43.1%), seguido por G3 (27.3%). En ambos casos, el serotipo P correspondió a P1A.

Por otra parte, en 80 sueros de fase aguda y convaleciente de niños con gastroenteritis viral, se cuantificaron los niveles de anticuerpos IgM e IgG. Los resultados mostraron predominancia de altos títulos de IgM, tanto en sueros de fase aguda como convaleciente, indicando que estas infecciones fueron de naturaleza primaria.

El análisis de neutralización de focos infecciosos para diferentes serotipos G y P, mostró seroconversión en 51 (63.7%) de los sueros. De éstos, en 26 (51%) de los casos, la respuesta fue homóloga mientras que en los restantes 25 (49) fue de tipo heteróloga. Entre los sueros con reacción homóloga, nueve reconocieron al serotipo G1,P1A, y 17 al serotipo G3,P1A. En los sueros con respuesta heteróloga, cinco, que provenían de una infección con serotipo G1P1A, reconocieron cepas G3P1A y G4P2; mientras que en 17 sueros con cepa infectante G3P1A, siete reaccionaron con cepas G1P1A y diez con múltiples cepas (G1P1A, G2P1B, G3P1A y G4P2).

La especificidad de estos anticuerpos neutralizantes contra las proteínas de superficie VP7 y VP4, demostró que de los 26 sueros con reacción homóloga, en 24 (92%) existieron anticuerpos contra las dos proteínas de superficie; mientras que en los sueros con respuesta heteróloga, cuando la reacción era para cepas G1P1A ó G3P1A, predominó una respuesta hacia VP4 de la cepa heteróloga; y cuando la respuesta era para cepas G2P1B ó G4P2, sólo se detectaron anticuerpos contra la VP7. Asimismo, el análisis de la especificidad de los anticuerpos contra epítopes de VP4 y VP7, mostraron a los epítopes 4F8-VP7 y 1A10,1E4-VP4 como los inmunodominantes.

Lo anterior demuestra, que en una infección natural por rotavirus de naturaleza primaria, existe una respuesta inmune humoral tanto homotípica como heterotípica hacia diferentes serotipos G, y que la proteína VP4, es la principal responsable de la reacción cruzada para estos serotipos.

INTRODUCCION

Generalidades

Los rotavirus miembros de la familia *Reoviridae*, son considerados como los principales agentes etiológicos de la gastroenteritis deshidratante aguda, en niños menores de 5 años a nivel mundial; ocasionando una alta mortalidad a causa de la deshidratación. En este respecto, según datos de la Organización Mundial de la Salud, en países en vías de desarrollo se producen un millón de muertes/año, mientras que en los países desarrollados, si bien la tasa de mortalidad es mucho muy baja (150 muertes pediátricas/año en EUA), el grado de infección se mantiene en las mismas proporciones (*Kapikian, y col., 1986; Fields, 1990*).

Por tal motivo, se ha propuesto que una vacuna efectiva, podría evitar la muerte de cerca de 870,000 niños/año; pues inclusive niveles muy avanzados de higiene, parecen no ser capaces de controlar las infecciones por estos virus (*Estes and Cohen, 1989, Hoshino and Kapikian 1994*).

Esta empresa aún continúa en desarrollo, ya que los estudios epidemiológicos desarrollados en todo el mundo, han demostrado que existen diversos factores que limitan la producción de un biológico aceptable; tales como una gran diversidad de cepas circulando entre los pacientes infectados (10 serotipos G para el humano), así como variabilidad genética y/o antigénica, inclusive de rotavirus pertenecientes a una misma cepa (*Arias, y col., 1994; Contreras, y col., 1995*).

Desde el descubrimiento de rotavirus en humanos (*Bishop, 1973*), y gracias a la adaptación de estos virus a crecer *in vitro* en cultivo de tejidos, se pudo aplicar al estudio de rotavirus el uso de anticuerpos monoclonales y la tecnología del DNA recombinante; incrementándose rápidamente el entendimiento de la estructura del virus, su ciclo replicativo, epidemiología y patogénesis (*in Fields 1995*).

Estos virus, presentan una estructura de 70 nm de diámetro, formada por 3 capas de proteínas que encierran un genoma de 11 segmentos de tipo RNA de doble cadena. Donde, cada uno de los segmentos de ácido nucleico corresponde a un gen que codifica para una proteína (a excepción del gen 11 que codifica para dos proteínas); 6 son *Estructurales* y 6 *No Estructurales* (tabla 1).

Entre las proteínas estructurales, VP1 (**RNA polimerasa**), VP2 y VP3 (**Guaniltransferasa**) conforman la capa interna; VP6 la media y, la más externa está constituida por VP4 y VP7 (*Both, y col., 1994*); donde VP4 es una proteína que tiene forma de "spikes" de aproximadamente 10-12 nm de largo, proyectándose hacia el exterior (*Hoshino and Kapikian, 1994*).

Tabla 1: Rotavirus SA11, composición génica y proteica.

GEN	LARGO (pb)	PROTEINA	PESO MOLECULAR	LOCALIZACION
1	3302	VP1	125,128	Capa interna
2	2690	VP2	102,698	Capa interna
3	2591	VP3	98,142	Capa interna
4	2362	VP4	86,775	Capa externa
5	1611	NS53	58,484	No estructural
6	1356	VP6	44,903	Capa intermedia
7	1104	NS34	36,072	No estructural
8	1059	NS35	36,629	No estructural
9	1062	VP7	37,198	Capa externa
10	751	NS28	20,309	No estructural
11	667	NS26	21,772	No estructural
		NS12	11,010	(ambas)

Clasificación

Dentro de las proteínas estructurales, las de la capa media y externa, son responsables (debido a la presencia de epitopes específicos en cada una de ellas) de la clasificación de rotavirus en: **grupos**, **subgrupos** y **serotipos**. De esta

manera, la especificidad de **grupo** esta determinada por la proteína **VP6**, de los cuales se han identificado 7 grupos denominados de la **A-G**; siendo en el **grupo A**, en donde se ubican la mayoría de los rotavirus que afectan al humano (*Nakagomi, y col. 1990; Gerna, y col., 1990; Hoshino and Kapikian 1994*).

Además, sólo en este grupo, la clasificación de rotavirus también esta dada en **subgrupos**, donde **VP6** también es la responsable de esta característica antigénica, conociéndose 4 subgrupos llamados **SGI, SGII, SGI + II** (comparte los dos epitopes) y **SG ni I ni II** (no presenta los epitopes de subgrupo) (*Beards, y col., 1992*).

Por otro lado, los **serotipos** fueron definidos por la demostración de que anticuerpos dirigidos independientemente contra cualquiera de las dos proteínas de la capa externa del virus, contribuían a su neutralización; por lo que en el VII Congreso Internacional de Virología en Edmonton en el año de 1987, se propuso nombrar **serotipos G** a los definidos por la proteína **VP7** (glicoproteína), y **serotipos P** para los de **VP4** (sensible a proteasas), permitiendo de esta manera conocer más sobre el comportamiento epidemiológico de estos virus (*Hoshino, y col., 1985; Estes y Cohen, 1989; Gorziglia, y col., 1990*).

Serotipos G

Cronológicamente, los primeros serotipos identificados de cepas de rotavirus tanto humanas como de animales, fueron los determinados por **VP7**; los cuales inicialmente, se demostraron mediante ensayos de neutralización cruzada con antisueros hiperinmunes (anticuerpos policlonales) (*Beards, y col., 1984; Hoshino, y col., 1984*). Sin embargo, debido a la observación de que en muchos casos, existía una reacción cruzada entre los serotipos, muy posiblemente por la participación de la proteína **VP4**, se volvió necesario definir la neutralización de cada una de estas proteínas de manera independiente (*Hoshino, y col., 1985*).

Por otra parte, hasta ese momento la metodología utilizada en la determinación del serotipo, solo consistía en la neutralización de placas ó focos fluorescentes utilizando anticuerpos policlonales, lo cual además de los problemas de especificidad, tenía el inconveniente de ser muy limitada, debido a que son

ensayos lentos, muy laboriosos y solamente aplicable para aquellas cepas de rotavirus adaptadas a crecer en cultivo de células.

Por tal motivo, surgió la necesidad de utilizar *Anticuerpos Monoclonales* en técnicas como ELISA, ó inclusive pruebas de *Hibridación RNA-RNA*, con lo cual se aseguraba una mejor especificidad, además de contar con la gran ventaja, de que podían ser serotipificadas una cantidad grande de cepas de rotavirus, tanto adaptadas a cultivo de células, como de rotavirus presentes en heces fecales de pacientes infectados (*Coulson, y col., 1987*).

Así durante la década de los ochentas, los primeros anticuerpos monoclonales específicos para los serotipos G1-G4 son producidos, los cuales hasta ese momento, eran los únicos serotipos reportados en humanos.

Tres investigadores: Bárbara Coulson (Australia), Koki Taniguchi (Japón) y Harry Greenberg (E.U.A.), obtuvieron una serie de monoclonales, quienes mediante pruebas de neutralización, de competencia y ELISA, mostraron tener la suficiente especificidad para cada uno de estos serotipos (*Shaw, y col., 1986; Heath, y col., 1986; Coulson, y col., 1987; Taniguchi, y col., 1987; Flores, y col., 1988; Urasawa, y col., 1989; Unicomb and Bishop, 1989*). De esta manera, para 1992, cerca de 15 anticuerpos monoclonales estaban disponibles para serotipificar cepas de rotavirus, la mayoría de estos, dirigidos contra las regiones de aminoácidos en VP7, involucradas en el fenómeno de neutralización viral (tabla 2) (*Raj, y col. 1992*). Actualmente, se han identificado 14 serotipos G del grupo A, en donde 10 afectan al humano (**G1 - G6, G8 - G10, G12**). Aunque, los serotipos **G1-G4**, son los que se han consolidado como los más importantes desde el punto de vista epidemiológico, debido a que en la mayoría de los casos, son los que más se asocian a la gastroenteritis producida en infantes, además de ser los que con mayor frecuencia, se encuentran en todo el mundo (*Matsuno, y col., 1985; Albert, y col., 1987; Clark, y col. 1987; Kapikian y Chanock, 1990*).

Serotipos P

La definición de **serotipos P** (por VP4) ha demostrado ser más difícil de analizar, debido a que en un principio, se trató de seguir la misma estrategia que

Tabla 2: Propiedades de los Anticuerpos Monoclonales contra serotipos G1-G4.

AcM	Antígeno Inmunizante	Serotipo G	* Aminoácido reconocido	Isotipo	Referencia
RV4:1	RV4	1	147 (B)	IgG1	Coulson, y col. 1987
RV4:2	RV4	1	213 (C)	IgG3	Coulson, y col. 1987
RV4:3	RV4	1	94 (A)	IgG2B	Coulson, y col. 1987
KU-4	KU	1	213 (C)	IgG3	Taniguchi, y col. 1987
5E8	**DxRRV	1	-	-	Padilla-Noriega, y col. 1990
2C9	Wa	1	94 (A)	IgG1	Taniguchi, y col. 1987 Green, y col. 1988
RV5:3	RV5	2	-	IgG2B	Coulson, y col. 1987
S2-2G10	S2	2	190 (*?)	IgG2A	Taniguchi, y col. 1987 Green, y col. 1989
1C10	***DS1xRRV	2	-	-	Padilla-Noriega, y col. 1990
RV3:1	RV3	3	211 (C)	IgG2B	Coulson, y col. 1987; Dyall-Smith, y col. 1986
YO-1E2	YO	3	221 (C)	IgG2B	Taniguchi, y col. 1987 Nishikawa, y col. 1989
4F8	RRV	3	96 (A)	IgG1	Shaw, y col. 1986; Mackow, y col. 1988
159	RRV	3	94 (A)	IgG1	Shaw, y col. 1986; Mackow, y col. 1988
ST3:1	ST-3	4	-	IgG3	Coulson, y col. 1987
ST-2G7	ST-3	4	-	IgG2A	Taniguchi, y col. 1987

* La proteína VP7 exhibe 3 regiones con una gran variabilidad y también son sitios importantes para la unión de anticuerpos monoclonales específicos: A (aa 87-101), B (aa 143-152) y C (aa 208-221). (*?), región de VP7 incierta; - no conocido.

** Virus rearreglante que contiene la VP7 de rotavirus humano D y VP4 de rotavirus animal RRV.

*** Virus rearreglante que contiene la VP7 de rotavirus humano DS1 y VP4 de rotavirus animal RRV.

la utilizada para los serotipos G (produciendo anticuerpos monoclonales contra VP4), sin embargo, el hecho de que estos daban una reacción cruzada con otros serotipos P ó sólo reconocían a la cepa de rotavirus que los indujo, se requirió idear otras metodologías que pudieran distinguir las diferentes VP4 (*Chen, 1992; Kool, 1992*). Situación por la cual, los estudios se enfocaron principalmente, a la comparación de las secuencias del gen 4 (gen que codifica para la proteína VP4), introduciéndose el término **Genotipo**.

De esta manera, al principio se lograron definir 4 alelos de este gen en cepas de rotavirus humanos, llamándose al producto protéico de estos alelos, **proteínas P tipo 4, 6, 8 y 9** (P por su sensibilidad a proteasas) (*Estes y Cohen, 1989*). Posteriormente, utilizando antisuero de cobayo, demostraron que estas proteínas VP4, en realidad correspondían a 3 moléculas diferentes y un subtipo, dejando de manifiesto, la diferencia antigénica que existía entre ellas, razón por la cual, las proteínas VP4 fueron reclasificadas como **Serotipos P**, denominándose **P1B (P4), P2 (P6), P1A (P8) y P3 (P9)**. Además, una correlación entre estas cepas y las infecciones que causan, pudo corroborar que el serotipo P2 se encuentra en cepas de rotavirus que infectan exclusivamente a neonatos de manera asintomática; mientras que los serotipos P1A, P1B y P3, son aisladas exclusivamente en cepas de rotavirus que producen infecciones sintomáticas en niños menores de 2 años (tabla 3) (*Gorziglia, y col., 1990*).

Tabla 3: Tentativa clasificación de las proteínas VP4 de cepas de rotavirus humano basado en sus características genómicas y antigénicas.

Grupo genético VP4	Serotipo VP4	Serotipo G (VP7) asociado	Tipo de Infección
1	P1A	G1,G3,G4,G9	Sintomática
2	P1B	G2,G12	Sintomática
3	P2	G1-G4	Asintomática
4	P3	G1	Sintomática
5	ND	G8	Sintomática

Lo anterior condujo a la necesidad de contar con una base de anticuerpos altamente específicos para determinar el comportamiento epidemiológico de serotipos P.

Así, en el año de 1993, Bárbara Coulson utilizando rotavirus cultivados en un sistema con bajos niveles de tripsina, con el objeto de mantener intacta a la proteína VP4, produjo los anticuerpos monoclonales denominados **F45:4**, **RV5:2** y **ST3:3**; los cuales fueron evaluados por la técnica de ELISA utilizando cepas de rotavirus adaptadas a cultivo; demostrando que el monoclonal **F45:4** reconocía cepas P1A, el **RV5:2** a cepas P1B y **ST3:3** a cepas P2 (*Coulson, 1993*). De esta manera la técnica de ELISA utilizando estos anticuerpos monoclonales mostró ser un método rápido, económico y sencillo para la tipificación de los serotipos P.

Asimismo durante ese mismo año, Padilla-Noriega y col. también producen anticuerpos monoclonales contra epitopes específicos en las proteínas VP4 de cepas de rotavirus humanas (epitopes distintos a las cepas utilizadas por Barbara Coulson). Estos anticuerpos fueron caracterizados por ensayos de neutralización y ELISA, utilizando para ello, cepas de rotavirus humanas y de animales con una gran variedad de serotipos G. Así, el anticuerpo monoclonal denominado **1A10**, mostró reconocer epitopes en VP4 con serotipo P1A; mientras que el monoclonal **HS6**, si bien reconoció mejor epitopes específicos en VP4's con serotipo P2, también reaccionó con epitopes en VP4's con serotipo P1A; trabajo que puso de manifiesto que proteínas VP4 con diferente serotipo P, pueden estar compartiendo epitopes (*Padilla-Noriega, y col., 1993*).

Posteriormente, mediante la comparación de la secuencia del gen 4, nuevos serotipos P, fueron encontrados tanto en humanos como en animales, y a la par de cada descubrimiento, anticuerpos monoclonales específicos de ese nuevo serotipo se han producido, de tal forma que hoy en día se han descrito al menos 14 serotipos P (P1A, P1B, P2A, P2B, P3A, P3B, P4 - P11); donde 6 de ellos se han recuperado de humanos, 5 asociados con infecciones sintomáticas (P1A, P1B, P3A, P3B, P4) y uno con infecciones asintomáticas (P2A) (*Gerna, y col. 1994; Isa and Snodgrass, 1994; Hoshino and Kapikian, 1994*). Sin embargo, aún se siguen aislando cepas de rotavirus, donde de acuerdo a la secuencia del gen 4,

posiblemente se traten de nuevos serotipos P, lo cual falta confirmar por serología (tabla 4, tomada de *Hoshino y Kapikian, 1994*).

Por otra parte, son pocos los estudios epidemiológicos realizados sobre los serotipos P, empleándose en su mayoría, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual aunque es efectiva en determinarlo, no refleja el comportamiento antigénico de las cepas estudiadas (*Do Carmo, y col. 1994; Das, y col. 1994; Silberstein, y col. 1995; Steele, y col. 1995*). Sin embargo, a nivel de campo utilizando anticuerpos monoclonales, en un estudio epidemiológico realizado en Monterrey, N.L. México, además de determinar la prevalencia del serotipo P, se demostró que la proteína VP4 con el mismo serotipo P, puede presentar variabilidad de epitopes de neutralización, lo que permite conocer más el comportamiento epidemiológico molecular de rotavirus (*Contreras, y col., 1995*).

Respuesta inmune

Ya que el estatus inmunológico de un individuo infectado juega un papel crucial en la eliminación del virus, la estrategias en la elaboración de una vacuna efectiva, no solo requieren su caracterización molecular, sino además, es necesario determinar el comportamiento del sistema inmune del hospedero, durante una infección natural; información con la cual se puedan establecer diversos conceptos como son: **a)** especificidad de la respuesta inmune (VP7, VP4); **b)** duración de la respuesta inmunológica y, **c)** cual de los epitopes caracterizados es el más antigénico. Así, desde la década de los 80's, se han realizado una serie de investigaciones sobre la respuesta inmune hacia este virus, en especial, la producción de anticuerpos neutralizantes.

Debido a que rotavirus, infecta las células epiteliales de la parte baja de los vellos del intestino delgado, la principal respuesta inmune contra la infección, debe estar mediada por los anticuerpos que se producen en el lumen del sistema digestivo (*Davidson, y col. 1979*). Situación que se ha corroborado con estudios de protección pasiva en animales de laboratorio, a los cuales se les han transferido anticuerpos contra el virus, encontrándose que estos anticuerpos evitan la infección de las células blanco (*Offit, y col. 1985; Snodgrass, y col. 1978*).

Tabla 4: Clasificación genómica y antigénica de las proteínas VP4 del grupo A de rotavirus.

Serotipo P *	Genotipo **	Cepas humanas	Serotipo G	Cepas animales	Serotipo G	Especie
1 A	8	10	1,3,4,9	Ninguna	4	pec
1 B	4	2, 2 (*)	2,12	Ninguna	-	-
2 A	6	3, 1 (*)	1,2,3,4	Ninguna	-	-
2 B	6	Ninguna	-	1	4	Cerdo
3 A	9	1, 2 (*)	1,3,6	2 (*)	3	Gato
3 B	14	1	10	Ninguna	-	-
4	10	1, 1 (*)	4,8	Ninguna	e	-
5 A	3	1, 1 (*)	8	2	2	Perro, Gato,
5 B	3	Ninguna	-	1	1	Mono Rhesus
6	1	Ninguna	-	5	6,8,3	Bovino, Mono
7	5	Ninguna	-	1, 4 (*)	6,10	Bovino
8	11	2 (*)	9, 10	2, 3 (*)	10	Bovino
9	7	Ninguno	-	9	3,4,5,11	Cerdo, Caballo
10	16	Ninguno	-	1	3	Ratón
11	18	1, 1 (*)	6,8	Ninguno ^a	-	-
?	2	Ninguna	-	1	3	Mono
?	12	Ninguna	-	3	3	Caballo
?	13	Ninguna	-	1	3	Cerdo
?	15	Ninguna	-	1	10	Cordero
?	17	Ninguna	-	1	7	Bovino
?	19	Ninguna	-	1	13	Caballo

* Serotipo determinado por ensayos de neutralización y sueros hiperinmunes

** Serotipo determinado por secuencia de aminoácidos ó Hibridación RNA-RNA

(*) No probado por neutralización, sólo por hibridación RNA-RNA

Asimismo, los pocos estudios que se han realizado en establecer la respuesta antirotavirus en el intestino, al menos en ratones vacunados con cepas de rotavirus Rhesus, han demostrado la presencia de células plasmáticas productoras de anticuerpos, tanto en bazo como en la lámina propia del intestino a los 4 días de iniciada la infección; alcanzando su máximo nivel hasta las 3

semanas y permaneciendo constante, hasta las 8 semanas. Además, células plasmáticas productoras de anticuerpos de clase IgA se han encontrado hasta 10 veces más, que las células secretoras de inmunoglobulinas IgG, mientras que son muy raras las células plasmáticas que producen IgM. Razón por la cual, la respuesta generada por las células linfoides de la mucosa intestinal, y en especial la producción de IgA, debe ser considerada como un marcador importante de la respuesta inmune contra rotavirus (*Merchant, y col. 1991*).

Sin embargo, también se ha determinado que los anticuerpos producidos en las mucosas (IgA) son más lábiles a los cambios de temperatura, que los encontrados en el suero, además de ser generados preferentemente en una infección secundaria, ó inclusive en muchos de los casos, corresponden a los anticuerpos maternos (lactancia).

En experimentos realizados en animales de laboratorio, donde se compara la producción de anticuerpos IgM e IgG en suero e IgA en secreciones intestinales, se observó: a) estos anticuerpos, presentan la misma especificidad y b) los niveles de IgM e IgG obtenidos de 7-30 días después del cuadro clínico en suero, son buenos indicadores de una infección reciente por rotavirus.

Lo anterior, aunado a que los métodos para obtener muestras intestinales de pacientes con rotavirus son extremadamente complicadas, indican que estos anticuerpos pueden ser estudiados para determinar a partir de suero, la especificidad de la respuesta inmune humoral durante una infección natural (*Davidson, y col. 1983; Hjelt, y col. 1985; Grimwood, y col. 1988*).

De esta manera, en la búsqueda de anticuerpos neutralizantes, se han realizado investigaciones utilizando sueros de niños con una infección por rotavirus, los reportes indican la presencia de anticuerpos específicos dentro de las dos primeras semanas después de la infección (infección primaria), donde esta respuesta va dirigida contra el serotipo de la cepa infectante (homotípica) o inclusive contra serotipos distintos (heterotípica) (*Zheng, y col. 1988; Padilla-Noriega y col. 1990*); asimismo, también se ha comprobado en niños infectados naturalmente con rotavirus, que la producción de anticuerpos neutralizantes heterotípicos, existe una mayor protección contra serotipos G de cepas de rotavirus animales, que para

serotipos de cepas virales humanas, como es el caso de los serotipos G5, G6, G7 y G10 (*Brüssow, y col. 1991; Brüssow, y col. 1992*).

Por otra parte, en lo que respecta a la producción de anticuerpos neutralizantes en infecciones secundarias, se ha verificado que estos también pueden ser de naturaleza homotípica y heterotípica, pero que los patrones generales de seroconversión específica de serotipo, pudiera ser una propiedad intrínseca de la cepa viral infectante, y que esta respuesta puede variar de serotipo a serotipo ó de cepa a cepa de un mismo serotipo (*Arias, y col. 1994*).

Respuesta específica a proteínas de superficie

Actualmente, la manipulación genética es una herramienta de gran valor en la producción de biológicos que induzcan una protección específica y dirigida. Tanto, que varios grupos de investigadores están interesados en la producción de un inmunógeno utilizando virus o bacterias inócuas a la población humana, que presenten la información génica necesaria para la producción de proteínas virales de importancia médica (como proteínas de rotavirus). Por tal motivo, un paso preliminar en este tipo de estrategias, es la de realizar una búsqueda efectiva de los determinantes antigénicos más inmunodominantes de los virus de estudio.

Otro de los parámetros que también ha sido objeto de una gran variedad de estudios sobre la respuesta inmune humoral contra rotavirus, es la determinación de anticuerpos neutralizantes específicos de las proteínas de superficie VP4 y VP7. Pues a pesar de que ambas proteínas tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en forma independiente, al parecer esta respuesta no se produce en la misma magnitud.

Varias investigaciones apoyan que VP7 es el antígeno inmunodominante (*Kalica, y col., 1981; Greenberg, y col., 1983*); sin embargo, posteriormente se comprobó que también se generaban altos títulos de anticuerpos contra las dos proteínas, en animales que eran hiperinmunizados ó bien infectados oralmente con el virus (*Hoshino, y col., 1985; Anderson, y col., 1986; Offit, y col., 1986*).

Por otro lado, en estudios realizados en ratones, los resultados sugirieron que VP4 puede ser un antígeno inmunodominante después de una infección intestinal, no así, después de una hiperinmunización parenteral (*Shaw, y col., 1988*). Estos mismos resultados fueron obtenidos en infantes, donde mediante técnicas de radioinmunoprecipitación, fué posible detectar anticuerpos anti-VP4 en suero después de que fueron administradas oralmente dos cepas vacunales atenuadas (RIT 4237, RRV-1) (no se detectaron anticuerpos contra VP7) (*Svensson, y col., 1987*). Asimismo, en humanos adultos después de la administración de una cepa virulenta de rotavirus, cerca del 80% de los anticuerpos neutralizantes producidos, presentaron una especificidad a VP4 (*Ward, y col. 1988*). Aunque, esta situación no se corroboró en infantes vacunados oralmente con la cepa de rotavirus bovino WC3, pues VP7 mostró ser la proteína inmunodominante (*Ward, y col. 1990*).

Para determinar cual de las dos proteínas de la superficie externa de rotavirus es la inmunodominante, se ha utilizado también el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes específicos de serotipos G y P, y, mediante ensayos de competencia de estos monoclonales con los anticuerpos presentes en el suero de animales ó humanos infectados, se ha cuantificado la respuesta inmune contra ambas proteínas.

De esta manera, utilizando anticuerpos monoclonales contra VP7 y VP4, para proteger pasivamente a ratones contra cepas virulentas de rotavirus (rotavirus Rhesus: RRV); se observó que anticuerpos anti-VP7 dejan protección sólo contra el serotipo de la cepa infectante, mientras que los anti-VP4, además de proteger contra la cepa homóloga, también dejan protección contra otras cepas con serotipo diferente (OSU y UK). Razón por la cual, se sugirió que la inmunización con un virus rearreglante que contenga tanto a VP7 y VP4 con diferentes serotipos, puede proteger de la diarrea producida por 2 ó más serotipos de rotavirus, ya que VP4 puede estar induciendo una respuesta heterotípica (*Offit, y col. 1986*).

Shaw y col. por su parte, utilizando anticuerpos monoclonales específicos de serotipo G1, G2 y G3, determinaron en suero de niños que recibieron una vacuna con rotavirus serotipo G3, la especificidad de los anticuerpos

neutralizantes. Y aunque encontraron una alta respuesta de anticuerpos contra el serotipo de la cepa vacunal (72%), también encontraron en un 52% de las muestras, anticuerpos específicos para la proteína VP4, por lo que se sugiere que dicha respuesta inmune hacia la cepa vacunal, puede ser un mecanismo heterotípico mediado por ambas proteínas (*Shaw y col. 1987*). Asimismo, Taniguchi y col. utilizando esta misma metodología, pero ahora con anticuerpos monoclonales contra VP4 y VP7, también encuentran una mayor respuesta de anticuerpos contra epitopes de VP7 tanto en niños vacunados o infectados por rotavirus (*Taniguchi, y col. 1991*).

Por lo tanto, en la actualidad aún no es del todo claro, contra cual de estas dos proteínas en una infección natural, va dirigida preferentemente la respuesta de anticuerpos neutralizantes y sobre todo, cual es la frecuencia y distribución de los epitopes presentes en estas proteínas, conocimiento necesario para determinar quien es la que presenta los más importantes determinantes antigénicos (*Coulson, 1993; Hoshino, y col. 1994*).

Perspectivas

A pesar de que los parámetros importantes asociados con la protección contra la diarrea rotaviral en humanos son todavía inciertos, la eficacia de una vacuna contra rotavirus, posiblemente deberá estar relacionada con la habilidad a inducir la producción de IgA intestinal y otras formas de inmunidad local, incluyendo la inmunidad mediada por células (*Offit, y col. 1989*).

Así la principal estrategia para elaborar tal biológico, se encuentra dirigida hacia la administración oral de una cepa vacunal de rotavirus atenuada. De estas estrategias, quizás la más evaluada hasta el momento ha sido la búsqueda de una cepa de rotavirus de origen animal, la cual sea inocua para el humano, pero que sea capaz de inducir al sistema inmune y dejar protección para las cepas de rotavirus humanas virulentas (*Kapikian, y col. 1992; Kapikian, y col. 1994*). De esta manera, la eficacia y seguridad de cepas de rotavirus de bovinos, simios y una de origen humano, han sido probadas en humanos; las cepas utilizadas son: **NCDV (RIT4237)** y **WC3** rotavirus bovino con serotipo G6 y **RRV (MMU18006)** rotavirus

de mono Rhesus con serotipo G3 (*Vesikari, y col., 1983; Kapikian y col., 1985; Clark, y col., 1986; Bernstein, y col., 1990; Vesikari, y col., 1993*). Aunque estas cepas han demostrado ser seguras, la vacuna con rotavirus RRV, ha inducido fiebre en un tercio de la población de niños menores de 6 meses (*Kapikian, 1985; Kapikian, y col., 1992; Vesikari, y col., 1993*). Otra cepa de rotavirus, UK también se encuentra como candidata a ser evaluada como vacuna (*Wyatt, y col. 1985*).

Sin embargo aunque estas cepas han demostrado proteger contra el cuadro clínico entérico en algunos lugares, en otros, se ha visto un poca o nula eficacia, por lo que se sugiere que posiblemente una vacuna monovalente, no podrá proteger eficientemente contra cada uno de los 4 serotipos G más importantes epidemiológicamente; sobre todo en niños menores de 6 meses y que aun no han tenido una infección con rotavirus (*Flores, y col. 1987; Christy, y col., 1988; Bernstein, y col. 1990; Kapikian, y col. 1992; Vesikari, y col. 1993*). Debido a esto, se ha propuesto modificar el principio Jeneriano, es decir, crear apartir de una cepa animal de rotavirus, una cepa de rotavirus rearreglante que contenga proteínas virales de origen animal y de origen humano, las cuales aseguren la no inducción de la infección y al mismo tiempo, se produzcan los anticuerpos específicos contra los serotipos G más importantes en ocasionar la diarrea en humanos.

Así, cepas rearreglantes de rotavirus han sido generadas: a) **VP7 humana con serotipo 1, 2 ó 4 en cepa animal RRV** (mono Rhesus); b) **VP7 humana con serotipo 1, 2, 3 ó 4 en cepa animal UK** (bovino); c) **VP7 humana con serotipo 1 en cepa animal WC3** (bovino); de las cuales también se han elaborado cepas rearreglantes que expresan al mismo tiempo los 4 serotipos G (G1-G4), produciendo una **vacuna cuadrivalente**; donde esta incluye las siguientes cepas: D (serotipo G1) x RRV, DS-1 (serotipo G2) x RRV, RRV (serotipo G3) y ST-3 (serotipo G4) x RRV (*Midthun, y col., 1985; Midthun, y col., 1986; Clark, y col., 1990*). Aunque algunas de estas vacunas cuadrivalentes ya se ha probado en la población y han demostrado mayor efectividad que una vacuna monovalente; al parecer la protección inducida puede no ser duradera para varios brotes epidémicos consecutivos, por lo que se ha propuesto que a estas vacunas polivalentes, es necesario incluir además de las diferentes proteínas VP7 con

diferente serotipo, una proteína VP4, y generar una **vacuna pentavalente**. Tal vacuna se piensa que podría ser todavía más inmunogénica que la vacuna cuadrivalente, debido a que VP4 tiene la cualidad de inducir anticuerpos neutralizantes de reactividad cruzada; característica que aumentaría la protección contra el espectro de serotipos de rotavirus (*Gorziglia, y col., 1990*). Así Hoshino y col. han elaborado una vacuna pentavalente utilizando la cepa de rotavirus animal UK como base de las cepas virales: D (G1) x UK, DS-1 (G2) x UK, P (G3) x UK, ST-3 (G4) x UK y Wa (VP4 con serotipo P1A) x UK (*Hoshino y Kapikian, 1994*).

Asimismo, diversos investigadores que participarán en la generación de la vacuna contra rotavirus, también han probado otras estrategias, tales como: *a)* Expresión de **proteínas VP7 y/o VP4 recombinantes**; *b)* Partículas de **rotavirus en microcápsulas**; *c)* Producción de **péptidos virales sintéticos**; los cuales también se han evaluado para ser administrados en forma oral o parenteral.

Sin embargo, la existosa producción de la vacuna contra rotavirus aún seguirá necesitando de una continua investigación de los mecanismos de protección tanto humorales como celulares del hospedero contra la infección viral (*Hoshino y Kapikian, 1994*). Por tal motivo, suponemos que los datos que aportarán este trabajo de investigación, en donde los resultados fueron obtenidos directamente de una infección natural con cepas de rotavirus que circulan de una manera endémica entre la población infantil, serán de gran valía para reforzar las diferentes estrategias utilizadas en la producción y/o evaluación de la vacuna anti-rotavirus.

HIPOTESIS

La principal respuesta de anticuerpos neutralizantes en una infección natural por rotavirus, se encuentra dirigida contra la proteína de superficie VP4. Y, de los epitopes presentes en ésta, el 1A10 es el más inmunodominante.

OBJETIVOS

- 1- Determinar la diversidad de serotipos G y P en muestras de campo.
- 2- Determinar la variabilidad de epitopes de la proteína VP4.
- 3- Determinar la especificidad de los anticuerpos producidos durante una infección natural.

MATERIAL Y METODO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Laboratorio Dr. Carlos Arias/Dra. Susana López del Departamento de Genética y Fisiología del Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.

COLECCION DE MUESTRAS

El material biológico fué recolectado durante el período de Octubre de 1994 a Febrero de 1995 de niños menores de 2 años con y sin síntomas de diarrea, que acudieron a atención médica en las clínicas del I.M.S.S. HGZ No. 4 (Guadalupe, N.L.), 6 (San Nicolás de los Garza, N.L.) y 17 (Monterrey, N.L.), así como el Hospital Secc. 50 S.N.T.E. para Maestros del Estado (Monterrey, N.L.). De esta manera, las muestras obtenidas en el estudio, pertenecieron a todo el Estado de Nuevo León, aunque con predominancia del Area Metropolitana.

• PROTOCOLO PARA LA TOMA DE MUESTRAS

a) Heces fecales:

Para determinar una muestra como SINTOMATICA, el niño debió ingresar al hospital con un cuadro entérico con 3 ó más evacuaciones suaves ó líquidas. Por otra parte, las muestras ASINTOMATICAS fueron tomadas de niños que acudieron a atención médica por otra causa diferente a gastroenteritis, y que en los últimos 5 días previos a la cita, no hubieran desarrollado un cuadro entérico. Estas últimas muestras sirvieron como controles en el estudio.

Asimismo, utilizando un Kit comercial de ELISA, se realizó el diagnóstico primario de la presencia del rotavirus Grupo A en las heces.

b) Suero de Fase Aguda y Fase Convaleciente;

Este tipo de muestra fué recolectada exclusivamente de los niños, SINTOMATICOS positivos para rotavirus, tomando una muestra de sangre (3 ml) sin anticoagulante, a las 24 hrs. del diagnóstico primario. Este suero fué denominado DE FASE AGUDA.

Posteriormente, el paciente fué citado 3 semanas después de la primer toma de sangre, para obtener una segunda muestra de sangre (3 ml) sin anticoagulante y, en este caso, el suero era considerado como DE FASE CONVALECIENTE.

Todas las muestras, tanto de heces fecales como sueros, fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

• **DIAGNOSTICO PRIMARIO DE ROTAVIRUS**

Como se mencionó anteriormente, para realizar este ensayo, se utilizó un Kit de ELISA comercial de la marca DAKO para la detección de rotavirus Grupo A, en el cual se utilizó anticuerpos específicos contra la proteína VP6 del virus.

En primer instancia 2 tirillas de 8 pozos eran sensibilizadas con 100 μl de anticuerpos anti-VP6 Grupo A de rotavirus diluido 1:50 en buffer de carbonato-bicarbonato 0.05 M pH 9.2; de igual manera, también se sensibilizó otras 2 tirillas de 8 pozos solo con 100 μl de buffer carbonato-bicarbonato 0.05 M pH 9.2. Posteriormente la placa con las tirillas fué incubada a temperatura ambiente por una hora. Se lavó las tirillas 5 veces con 200 μl de PBS-Tween pH 7.2 y se le adicionó a 4 pocillos (utilizando 2 pozos sensibilizados con anticuerpos anti-rotavirus y 2 pozos sensibilizados sólo con el buffer carbonato-bicarbonato 0.05 M pH 9.2) 100 μl de heces diluidas 1:20 en solución salina 0.15 M, incubándose 1 hr a temperatura ambiente.

En seguida se lavó 7 veces con PBS-Tween pH 7.2 y se añadió 100 μl de inmunoglobulinas inespecíficas de conejo (como bloqueador) diluidas 1:20 en albúmina bovina 0.5%. Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Así sin

lavados previos, se le adicionó 100 µl de conjugado (anti-rotavirus ligado a peroxidasa de rábano) diluido 1:250 en albúmina bovina 0.5%, incubándose de nuevo a temperatura ambiente por 30 minutos. Al momento de adicionar el conjugado, también se preparó el sustrato (OPD: 1,2-phenylene-diamine, 2 HCl) disolviendo una tableta de este, en 3 ml de buffer ácido cítrico-fosfatos 0.1M pH 5, bajo condiciones de obscuridad. Después del período de incubación se lavaron las tirillas 5 veces con PBS-Tween y una vez con buffer ácido cítrico-fosfatos 0.1M pH 5, en seguida se le adicionó 100 µl de sustrato al cual, antes de usarse, se le adicionó 1 µl de peróxido de hidrógeno por cada tableta de sustrato utilizada. Se incubó a temperatura ambiente 15 minutos, observando la aparición de un color amarillo oro, como resultado positivo. Al término de este tiempo, se paró la reacción con 150 µl de ácido sulfúrico 1M.

El diagnóstico podía darse directamente con la visualización de color, comparando las muestras problemas con el control positivo, o bien, en aquellas muestras que presentaban una coloración muy baja, se procedía a leer la tirilla en un Microlector de ELISA a 492 nm. El criterio que se siguió para considerar una muestra positiva por absorbancias, fué que se cumplieran los dos siguientes enunciados:

- $(\text{Media de las Absorbancias en pozos con anti-rotavirus}) - (\text{Media de las Absorbancias en pozos sin Anti-rotavirus}) = > 0.07$
- $(\text{Media de las Absorbancias en pozos con anti-rotavirus}) / (\text{Media de las Absorbancias en pozos sin Anti-rotavirus}) = > 6$

CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA CEPA DE ROTAVIRUS INFECTANTE

• DETECCION DE SEROTIPOS G Y P

El ensayo de ELISA utilizado para la determinación de los serotipos G y P, se realizó con la misma técnica, excepto por los anticuerpos monoclonales específicos de serotipo utilizados en cada caso.

Placas de 96 pozos fueron cubiertas con 75 μ l de un panel de anticuerpos monoclonales diluïdos en PBS-Az utilizando el protocolo siguiente (ver tabla 5 y 6).

Tabla 5: Anticuerpos monoclonales específicos de serotipos G.

Ac MONOCLONAL	SEROTIPO	DILUCION
5E8	G1	1: 2,000
1C10	G2	1: 2,000
159	G3	1: 10,000
ST-2G7	G4	1: 10,000
129	COMUN (VP6)	1: 5,000

Asimismo, para cada anticuerpo monoclonal se realizó por duplicado el ensayo. Por otra parte se utilizó líquido ascítico de ratón 1: 5,000 como control negativo. Las placas sensibilizadas de esta manera, se incubaron toda la noche a 4°C.

Tabla 6: Anticuerpos monoclonales específicos de serotipos P.

Ac MONOCLONAL	ESPECIFICIDAD	REACCION CRUZADA CON OTRO SEROTIPO P	DILUCION
F45:4	P1A	P8	1: 2,000
1A10	P1A	-	1: 200
RV5:2	P1B	-	1: 4,000
HS6	P2	P1A	1: 8,000
ST3:3	P2	P2 asintomático y P6 sintomático	1: 2,000

Después de la incubación, se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS-Az y se les adicionó 75 µl de suero fetal de bovino 5%-PBS-Az, incubándose 1 hr a 37⁰C. En seguida se les agregó 75 µl de heces fecales al 5% diluidas en suero fetal de bovino 5%-PBS-Az, así como 75 µl de cepas de rotavirus de referencia diluidos 1:2 en suero fetal de bovino 10%-PBS-Az. Posteriormente se incubaron 1:30 hrs a 37⁰C. Se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se le adicionó 75 µl un anticuerpo anti-rotavirus (Ig G) producido en conejo a una dilución de 1: 2,500 en suero fetal de bovino 2.5%-PBS-Az y se incubó 1 hr a 37⁰C. Después de este período se lavó de nuevo 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se le adicionó 75 µl de conjugado (anti-anti-rotavirus producido en cabra unido con fosfatasa alcalina 0.1 mg/ml) a una diluido 1:1000 en suero fetal de bovino 2.5%-PBS-Az.

Posteriormente se incubó 1 hr a 37⁰C. En seguida se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se añadió 75 µl de sustrato (p-Nitrofenil Fosfato Disodio) diluido en buffer dietanolamina pH 9.8 (1 tableta de sustrato/5 ml de buffer). Se incubó 45 min a 37⁰C.

Las placas fueron leídas en un Microlector de ELISA a 405 nm considerándose positivos las muestras con una absorbancia arriba de 0.2.

Tabla 7: Cepas de rotavirus utilizadas como controles.

CEPA VIRAL	ORIGEN	SEROTIPO G	SEROTIPO P	DILUCION
Wa	HUMANO	G1	P1A	1:2
S2	HUMANO	G2	P1B	1:2
Price	HUMANO	G3	P1A	1:2
ST3	HUMANO	G4	P2	1:2
DxRRV	VP7 HUMANO (D) x VP4 SIMIO (RRV)	G1	P5	1:2
DS1xRRV	VP7 HUMANO (DS1) x VP4 SIMIO (RRV)	G2	P5	1:2
RRV	MONO Rhesus	G3	P5	1:2
SA11	SIMIO	G3	P6	1:2
ST3xSA11	VP7 HUMANO (ST3) x VP4 SIMIO (SA11)	G4	P6	1:2

• **DIVERSIDAD DE EPITOPES EN VP4**

Los diferentes epitopes en la proteína VP4 se determinaron mediante una prueba de ELISA utilizando los anticuerpos monoclonales, descritos en la tabla 8.

Tabla 8: Anticuerpos Monoclonales específicos de epitopes de neutralización, en la proteína VP4 de rotavirus.

Ac MONOCLONAL	EPITOPE	LOCALIZACION DE EPITOPES EN VP4	SEROTIPO P
F45:4	F45	VP5*	P1A
1A10	1A10	VP5*	P1A
RV5:2	RV5	VP5*	P1B
		(epitope conformacional)	
HS6	HS6	VP8*	P2
ST3:3	ST3	VP5*	P2
		(epitope conformacional)	

El protocolo para la realización de la técnica fué el mismo que se utilizó para la determinación de serotipos P.

• **DETERMINACION DE GENOTIPO P MEDIANTE PCR**

a) **EXTRACCION DE RNA VIRAL**

En primer término se procedió a la extracción del RNA viral a partir de muestras de heces fecales, utilizando un Kit comercial para ello.

En un tubo eppendorf (1.5 ml) se adicionó 60 µl de heces fecales, 360 µl de agua bidestilada y 300 µl de freón; se mezcló en vortex por 30 segundos y se centrifugó 15 min. a 14,000 rpm. Posteriormente se obtuvo 300 µl del sobrenadante y se trasladó a otro tubo eppendorff limpio, al cual se le adicionó 340 µl de isotiocianato de guanidina 6M y 10 µl de RNAid (polvo de vidrio), se mezcló en vortex 30 segundos y se dejó en rotación constante 5 min a temperatura ambiente. En seguida se mezcló de nuevo un instante en vortex y se centrifugó 30 segundos a 2,850 rpm. Posteriormente se lavó 3 veces con 300 µl

de buffer de lavado centrifugándose 60 segundos entre cada lavado a 11,250 rpm. Al final de los lavados, el pellet se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada y se calentó en baño maría 10 minutos a 65 °C, posteriormente se centrifugó 10 min a 14,000 rpm. El sobrenadante fué recuperado y almacenado en otro tubo eppendorf limpio.

b) TRANSCRIPCIÓN INVERSA DE RNA A cDNA (RT-PCR)

En un tubo eppendorf (0.5 ml) se realizó la siguiente mezcla:

- 1.0 µl Oligos CON 2 y CON 3 (12.5 mM)
- 2.0 µl RNA viral
- 0.5 µl MMOH (50 mM)
- 0.5 µl β-Mercaptoetanol

Adicionar enseguida 10 µl del siguiente cocktail:

- 2.6 µl Agua bidestilada
- 1.0 µl Buffer de PCR 10X
- 0.5 µl MgCl₂ 50 mM
- 1.6 µl dNTPs 5mM
- 0.2 µl RNAsin
- 0.1 µl Retrotranscriptasa

Incubar a 42°C por 30 min en un Termociclador.

Una vez realizada la retrotranscripción, se procedió a amplificar el cDNA obtenido, realizándose para ello una PCR utilizando oligonucleótidos específicos del gen de la proteína VP4, los cuales nos delimitaron la región donde se encuentran las secuencias responsables de serotipo P (tabla 9); realizándose la siguiente mezcla en un tubo eppendorf de 0.5 ml.

8.5 µl	Agua bidestilada
1.15 µl	Buffer de PCR 10X
0.25 µl	MgCl ₂ 50 mM
0.50 µl	Oligos CON 2 y CON 3 12.5 mM
1.0 µl	dNTPs 5 mM
1.0 µl	cDNA
0.1 µl	Taq-DNA polimerasa
1 gota	Aceite mineral

Tabla 9: Oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen 4 de rotavirus humano.

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	LOCALIZACION (nucleótidos)	REGION AMPLIFICADA (pares de bases)	ESPECIFICIDAD
CON 2	ATTCGGACCATTTATAACC	868-887	876	VP4
CON 3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	11-32	876	VP4

En seguida los tubos eppendorf con esta mezcla, se pusieron en un Termociclador Perkin Elmer y se corrió la PCR bajo el siguiente programa (tabla 10).

Tabla 10: Frecuencias de temperaturas utilizadas para amplificar el gen 4 de rotavirus.

No. Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	1.5 min
30	94	30 seg
30	44	30 seg
30	72	40 seg

c) OBTENCION DE GENOTIPO

Una vez amplificado el segmento del gen de VP4, se procedió a tipificar las muestras utilizando los siguientes oligonucleótidos (tabla 11).

Tabla 11: Oligonucleótidos específicos de secuencia, utilizados para la obtención de genotipo P de cepas de rotavirus humanos.

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	LOCALIZACION (nucleótidos)	REGION AMPLIFICADA (pares de bases)	ESPECIFICIDAD DE SEROTIPO
1T-1	TCTACTTGGATAACGTGC	339-356	345	P1A
2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	474-494	483	P1B
3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	259-278	267	P2
4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	385-402	391	P3

Se realizó la siguiente mezcla en un tubo eppendorf de 0.5 ml:

- 9.31 µl Agua bidestilada
- 1.24 µl Buffer para PCR 10X
- 1.0 µl dNTPs 5 mM
- 0.5 µl MgCl₂ 6.25 mM
- 0.25 µl Oligonucleótidos de genotipo
- 0.1 µl cDNA amplificado
- 0.1 µl Taq-DNA Polimerasa
- 1 gota Aceite mineral

Adjunto a este proceso, también se incluyó el cDNA de 4 cepas de rotavirus como referencia (tabla 12).

En seguida los tubos ependorff con esta mezcla, se pusieron en un Termociclador Perkin Elmer y se corrió la PCR bajo el siguiente programa (tabla 13).

Tabla 12: Cepas de rotavirus utilizadas como controles.

CEPA VIRAL	ORIGEN	SEROTIPO P
Wa	HUMANO	P1A
DS1xUK	HUMANO	P1B
ST3	HUMANO	P2
K8	HUMANO	P3A

Tabla 13: Frecuencias de temperaturas utilizadas en la obtención del genotipo P de cepas de rotavirus humanas.

No. CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
1	94	30 seg
30	94	30 seg
30	42	1 min
30	72	40 seg

Al término de esta PCR, se tomó 4 µl del producto génico y se le adicionó 1 µl de Azul de bromocresol. Esta mezcla se sometió a una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% durante una hora a 95 Volts. Posteriormente el gel se tiñió con bromuro de etidio y se expuso bajo los rayos de una lámpara de luz ultravioleta, para visualizar los productos de la tipificación. Enseguida de esto, a los geles se les tomó una fotografía.

ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE

• DETECCION DE Ig A SECRETORA ESPECIFICA DE ROTAVIRUS EN HECES FECALES

Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con 75 µl de rotavirus Rhesus (RRV) ultracentrifugado diluido 1:100 (pozos A5-H5 x A12-H12) y 75 µl de células MA-104 ultracentrifugadas diluidos 1:100 (A1-H8 x A4-H4), ambos, en SFB 5%-PBS-Az; incubándose a 4⁰C toda la noche. Posteriormente se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS-Az y se les adicionó 75 µl de suero fetal de bovino 5%-PBS-Az, incubándose 1 hr a 37⁰C. En seguida se les agregó 75 µl de heces fecales diluidas 1:5, 1:10, 1:20 y 1:100 en suero fetal de bovino 5%-PBS-Az, excepto a los pozos H3-H4 y H11-H12 incubándose 1:30 hrs a 37⁰C. En seguida se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se le adicionó 75 µl de conjugado (anti-Ig A humana unido con fosfatasa alcalina 0.1 mg/ml) a una dilución 1:1000 en suero fetal de bovino 2.5%-PBS-Az, incubándose 1 hr a 37⁰C. A continuación se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se añadió 75 µl de sustrato (*p*-Nitrofenil Fosfato Disodio) diluido en buffer dietanolamina pH 9.8 (1 tableta de sustrato/5 ml de buffer). Se incubó 45 min a 37⁰C.

Las placas fueron leídas en un Microlector de ELISA a 405 nm considerándose positivos las muestras que tuvieran una abosrbancia de 0.2 y que al menos presentaran el doble de absorbancia, con respecto a los controles.

• DETECCION DE Ig M e Ig G ESPECIFICA DE ROTAVIRUS EN SUERO

Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con 75 µl de rotavirus Rhesus (RRV) ultracentrifugado diluido 1:100 (pozos A5-H5 x A12-H12) y 75 µl de células MA-104 ultracentrifugadas diluidos 1:100 (A1-H8 x A4-H4), ambos, en SFB 5%-PBS-Az; incubándose a 4⁰C toda la noche. Posteriormente se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS-Az y se les adicionó 75 µl de leche descremada, incubándose toda la noche a 4⁰C. A continuación se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS-Az y se

adicionó 75 µl de suero de fase aguda y fase convaleciente diluídas 1:5, 1:10, 1:20 y 1:100 en suero fetal de bovino 5%-PBS-Az incubándose 1:30 hrs a 37⁰C. En seguida se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se le adicionó 75 µl de conjugado (anti-Ig M humana ó anti-Ig G humana, unido con fosfatasa alcalina 0.1 mg/ml) a una dilución 1:1000 en suero fetal de bovino 2.5%-PBS-Az, para luego ser incubadas 1 hr a 37⁰C. A continuación se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se añadió 75 µl de sustrato (*p*-Nitrofenil Fosfato Disodio) diluído en buffer dietanolamina pH 9.8 (1 tableta de sustrato/5 ml de buffer). Se incubó 45 min a 37⁰C.

Las placas fueron leídas en un Microlector de ELISA a 405 nm considerándose positivos las muestras que tuvieran una abosrbancia de 0.2 y que al menos presentaran el doble de absorbancia, con respecto a los controles.

• CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

a) *MICROTITULACION DE FOCOS INFECCIOSOS POR ROTAVIRUS*

Esta técnica se utilizó previo a los ensayos de neutralización para obtener el título de focos infecciosos de todas las cepas de rotavirus a utilizar; requiriéndose para ello, cajas de 96 pozos con células MA-104 con un período de incubación de 4 días.

En primer instancia, se activó el virus a titular adicionando a 200 µl de la cepa de virus, 1 µl de tripsina 1%, incubándose 30 min a 37⁰C. Posteriormente en una caja de 96 pozos, se adicionó 90 µl de MEM sin suero a las hileras B-H, y en la hilera A se adicionó 100 µl del virus por duplicado, de cada cepá de rotavirus a titular. En seguida utilizando una micropipeta multicanal (12 puntillas), se realizaron diluciones 1:5 apartir de la hilera B en delante.

Posteriormente, las cajas con células MA-104 confluentes, se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS y se les adicionó 100 µl de MEM sin suero más 50 µl de cada dilución viral. En seguida se incubaron 14 hrs a 37⁰C y atmósfera de CO₂.

Después del período de incubación, las células fueron lavadas 1 vez con 150 μ l de PBS y se fijaron con 150 μ l de Acetona 80%-PBS durante 30 min a temperatura ambiente. En seguida se lavó 2 veces con 150 μ l de PBS y se adicionó 75 μ l de un anticuerpo contra rotavirus (anti-Ym producido en conejo) diluido 1: 2000 en PBS. Se incubó 1:30 hr a 37⁰C. Se lavó 2 veces con 150 μ l de PBS y se adicionó 75 μ l de proteína A-peroxidasa diluida 1:2000 y se incubó de nuevo 1:30 hr a 37⁰C. A continuación se lavó 2 veces con 150 μ l de PBS y se añadió 75 μ l de sustrato (carbazole), el cual se preparó y filtró momentos antes de su adición (para 10 ml de sustrato: 8.5 ml de buffer de acetatos 1X, 1.5 ml de carbazole y 10 μ l de peróxido de hidrógeno). Se incubó 15 min a 37⁰C, bajo condiciones de oscuridad. Al término de este tiempo, la reacción fué detenida lavando las placas con agua corriente y se dejaron secar sobre papel absorbente.

El título de focos infecciosos se obtuvo, leyendo las placas en un microscopio invertido, contando el número de focos en el objetivo de 20X. En nuestro caso, requeríamos utilizar una dilución de virus en la cual se produjeran entre 150 y 200 focos infecciosos, por lo que la dilución en la que se presentaba esta cantidad en la titulación, fué la empleada para los ensayos de neutralización.

b) ENSAYOS DE NEUTRALIZACION

Para cuantificar la respuesta global de anticuerpos neutralizantes contra cepas de rotavirus con diferente serotipo, los sueros de fase aguda y convaleciente se analizaron simultáneamente por un ensayo de neutralización.

Placas de 96 pozos con células MA-104 (1×10^4 células/pozo) fueron sembradas e incubadas por 4 días. En seguida, se activó 200 μ l ó más (esta cantidad dependía del título de focos infecciosos que poseía el virus) de la cepa viral a utilizar (tabla 13) (la activación del virus se realizaba antes de diluirlo) con 1 μ l de tripsina 1% y se incubó 30 min a 37⁰C. Posteriormente, 10 minutos antes de término de la activación del virus, en una placa de 96 pozos, se realizó 100 μ l de diluciones de suero de fase aguda (1:100, 1:200) y convaleciente (1:100, 1:200,

1:400, 1:800 y 1:1600) en MEM sin suero. En seguida a 50 μ l de estas diluciones se les adicionó 50 μ l del virus activado y diluido. Se incubó esta mezcla una hora a 37°C.

Tabla 14: Cepas de rotavirus con diferente serotipo, utilizadas para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes en suero.

CEPA	ORIGEN	SEROTIPO G	SEROTIPO P
Wa	HUMANO (Sintomático)	G1	P1A
S2	HUMANO (Sintomático)	G2	P1B
Price	HUMANO (Sintomático)	G3	P1A
ST3	HUMANO (Asintomático)	G4	P2

Las placas con células MA-104, se lavaron 2 veces con PBS y se les adicionó 100 μ l de MEM sin suero y 50 μ l de la mezcla virus-suero. En seguida, se incubaron 14 horas a 37°C. Al término de este tiempo, las células fueron lavadas 1 vez con 150 μ l de PBS y posteriormente se fijaron con 150 μ l de Acetona 80%-PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces con 150 μ l de PBS y se adicionó 75 μ l de un anticuerpo contra rotavirus (anti-Ym producido en conejo) diluido 1: 2000 en PBS incubándose 1:30 hr a 37°C. A continuación se lavó 2 veces con 150 μ l de PBS y se adicionó 75 μ l de proteína A-peroxidasa diluida 1:2000 y se incubó de nuevo 1:30 hr a 37°C. Se lavó 2 veces con 150 μ l de PBS y se añadió 75 μ l de sustrato (carbazole) y se incubó 15 min a 37°C, bajo condiciones de oscuridad. Al término de este tiempo, la reacción fué detenida lavando las placas con agua corriente y se dejaron secar sobre papel absorbente.

El título de anticuerpos neutralizantes se obtuvo, leyendo las placas en un microscopio invertido bajo el objetivo de 20X, utilizando el siguiente protocolo:

- a) Se contaba el número de focos infecciosos en los pozos control.
- b) En base a esta cuenta, se obtenía el número de focos infecciosos correspondientes al 60% .
- c) Tomando como base el número de focos infecciosos correspondientes a un 60%, se realizaba el conteo de focos en los pozos donde existía suero, hasta llegar a la dilución donde el número de focos era igual al 60%, considerándose esta dilución como el título de anticuerpos neutralizantes.

c) *CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.*

La magnitud de la respuesta de anticuerpos neutralizantes dirigida específicamente contra VP7 ó VP4; fué medida por ensayos de neutralización contra cepas de virus rearreglantes.

Las cepas de virus rearreglantes fueron seleccionadas dependiendo de la respuesta observada de los sueros, con las cepas de rotavirus con diferente serotipo. De esta manera, para analizar la respuesta contra VP7, el rearreglante presentaba la proteína VP7 de una cepa de origen humano y VP4 de una cepa de origen animal; mientras que para observar la reacción contra VP4, el virus rearreglante contenía VP4 humana y VP7 de origen animal (tabla 15).

El protocolo para la realización del ensayo fué exactamente igual, que el utilizado para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes contra cepas de rotavirus con diferente serotipo.

• **ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EPITOPES DE VP4 Y VP7**

La respuesta contra epitopes específicos en las proteínas de superficie se determinó mediante un ensayo de bloqueo de ELISA, con lo cual se midió la capacidad de los sueros de fase aguda y convaleciente para competir por la unión

al virus, contra anticuerpos monoclonales dirigidos hacia dominios homotípicos y heterotípicos de VP4 y VP7 (tabla 16 y 17).

De esta manera, placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con 75 µl del anticuerpo monoclonal a competir diluido en PBS-Az (placa 1). Aparte y a la par de la placa con el anticuerpo monoclonal, otra placa de 96 pozos fué bloqueada con 150 µl suero fetal de bovino 5%-PBS-Az (placa 2), incubándose estas toda la noche a 4°C.

Tabla 15: Cepas de rotavirus rearreglantes utilizadas para determinar la especificidad de anticuerpos neutralizantes contra VP4 y VP7.

CEPA VIRAL	VP7		SEROTIPO	VP4		
	Rearreglante			Rearreglante		
Wa	DxRRV	D-VP7 (humana), RRV-VP4 (simio)	VP7-G1 VP4-P5	4-10	CJN-VP4 (humana), EDIM-VP7 (ratón)	VP4-P1A VP7-ND***
S2	7DS1	DS1-VP7 (humana), RRV-VP4 (simio)	VP7-G2 VP4-P5	DS1xUK	DS1-VP4 (humana), UK-VP7 (bovino)	VP4-P1B VP7-G6
Price	*RRV	VP7 y VP4 RRV (simio)	G3, P5	4-10	CJN-VP4 (humana), EDIM-VP7 (ratón)	VP4-P1A VP7-ND
ST3	ST3xSA11	ST3-VP7 (humana), SA11-VP4 (simio)	VP7-G4 VP4-P6	**	-	-

* Para medir la respuesta contra VP7 no se utilizó un virus rearreglante; RRV es una cepa con sus dos proteínas de superficie. Sin embargo, para corroborar que la respuesta hacia RRV, fuera por el reconocimiento de la proteína VP7, se incluyó el rearreglante 3-17, el cual contiene la VP4 de RRV y la VP7 de EDIM.

** No se contó con cepas virales rearreglantes para medir la respuesta contra VP4.

*** ND: Serotipo no determinado.

Tabla 16: Anticuerpos Monoclonales utilizados para la determinación de la especificidad de₃ epitopes en VP7, de anticuerpos neutralizantes.

ANTICUERPO MONOCLONAL	ESPECIFICIDAD DE EPITOPE	SEROTIPO	VIRUS HOMOLOGO
5E8	5E8	G1	Wa
2C9	2C9	G1	Wa
2F1	2F1	G2	S2
4F8	4F8	G3	Price
2A4	2A4	G1, G3	Price
ST-2G7	ST-2G7	G4	ST3

Tabla 17: Anticuerpos Monoclonales utilizados para la determinación de la especificidad de epitopes en VP4, de anticuerpos neutralizantes.

ANTICUERPO MONOCLONAL	ESPECIFICIDAD DE EPITOPE	SEROTIPO	VIRUS HOMOLOGO
1A10	1A10	P1A	Wa
RV5:2	RV5	P1B	S2
HS6	HS6	P2	ST3
1E4	1E4	P1A, P2	Wa
YO-2C2	-	COMUN	-

Posteriormente la placa 1 se lavó 2 veces con 200 µl de PBS-Az y se bloqueó con 150 µl de SFB 5%-PBS-Az; mientras que la placa 2, se lavó una vez con 200 µl de PBS-Az y se le adicionó 50 µl del suero de fase aguda y convaleciente diluidos 1:3 en SFB 2%-PBS-Az, además de 50 µl del virus homólogo. Ambas placas fueron incubadas a 4⁰C toda la noche.

Posteriormente, la placa 1 fué lavada 2 veces con 200 µl de PBS-Az y se le adicionó 75 µl de la mezcla virus- suero (placa 2) y se incubó a 37⁰C por 3 horas. En seguida se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se le adicionó 75 µl de un anti

rotavirus producido en conejo, diluido 1:2500 en SFB 2.5%-PBS-Az y se incubó a 37°C por 2 horas. Se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se adicionó 75 µl de conjugado (anti-Ig G de conejo unido a fosfatasa alcalina) diluido 1:1000 en SFB 2.5%-PBS-Az, y se incubó a 37°C por una hora. A continuación se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Az y se añadió 75 µl de sustrato (*p*-Nitrofenil Fosfato Disodio) diluido en buffer dietanolamina pH 9.8 (1 tableta de sustrato/5 ml de buffer) incubándose 45 min a 37°C.

Las placas fueron leídas en un Microlector de ELISA a 405 nm, considerándose que existió competencia por parte del suero de fase aguda y convaleciente, cuando la absorbancia era menor de 0.2.

RESULTADOS

BROTE EPIDEMICO 1994-1995

Un total de 860 muestras de heces fecales fueron recolectadas de niños menores de 2 años con y sin diarrea, durante el brote epidémico de rotavirus entre Octubre 1994 y Febrero 1995, en el área Metropolitana de Monterrey, N.L.; obtenidas de las Clínicas No. 4, 6 y 17 del Instituto Mexicano del Seguro Social y el Hospital Secc. 50 S.N.T.E para maestros del estado. De éstas, 392 (46%) resultaron positivas para el virus; donde 337 (64%) fueron pacientes con diarrea y 55 (17%) no presentaban síntomas de gastroenteritis (figura 1).

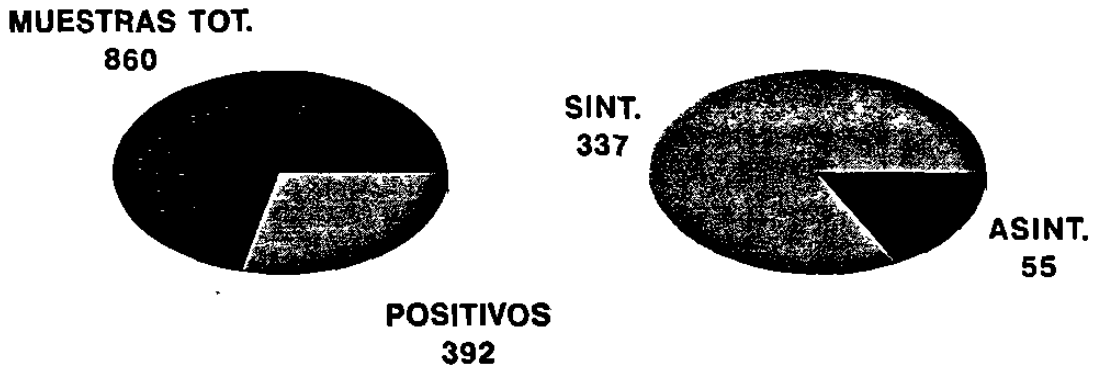


Figura 1: Número de muestras y casos positivos para rotavirus durante el brote epidémico de Octubre 1994- Febrero1995.

Durante el período de estudio se presentaron casos positivos para rotavirus en las dos poblaciones a investigar (sintomáticos y asintomáticos), sobresaliendo un porcentaje superior al 50% de casos en los meses de Enero y Diciembre (tabla 18).

Tabla 18: Datos generales del brote epidémico de rotavirus 1994-1995.

MES	No. MTAS	POSITIVOS	PORCENTAJE
Octubre	140	41	29.28%
Noviembre	157	53	33.75%
Diciembre	242	133	54.95%
Enero	220	126	57.27%
Febrero	101	39	38.6%

La frecuencia de rotavirus durante este período mostró un comportamiento similar al de años anteriores, donde en los meses previos al invierno, el incremento de los casos positivos fué progresivo hasta llegar a un punto máximo, que coincide con los meses de invierno más fríos, para posteriormente disminuir, a medida que la temporada de invierno culminaba (figura 2).

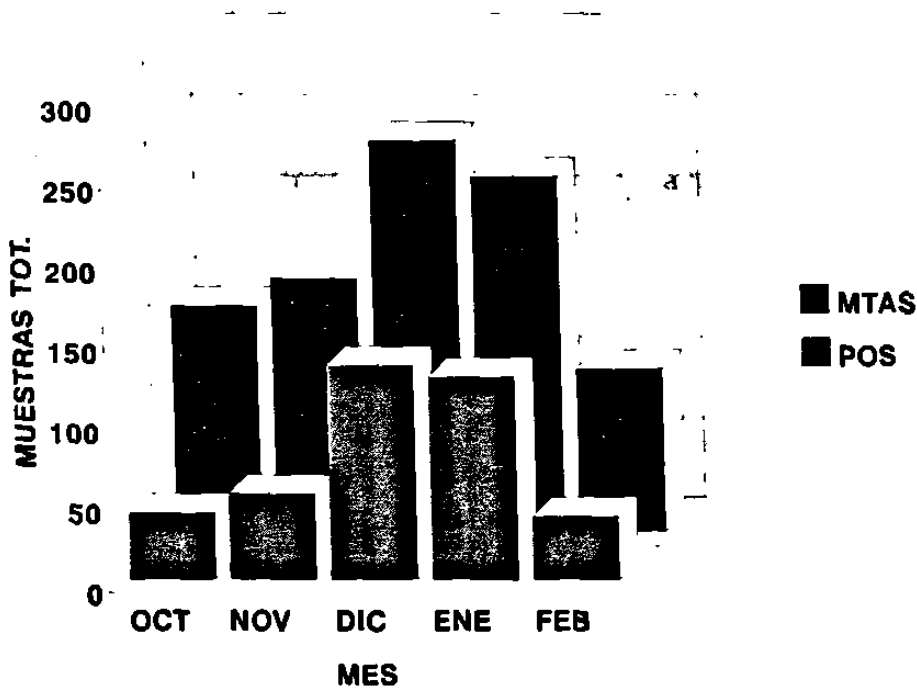


Figura 2: Frecuencia de casos de rotavirus en niños con y sin gastroenteritis durante 1994-1995.

Asimismo, a través del estudio, rotavirus fué detectado en todas las edades comprendidas en el rango de días hasta los 2 años, que fué la edad máxima de los infantes analizados. Sin embargo la mayor prevalencia fué en niños con edades de 1 a 11 meses (72 %) (figura 3).

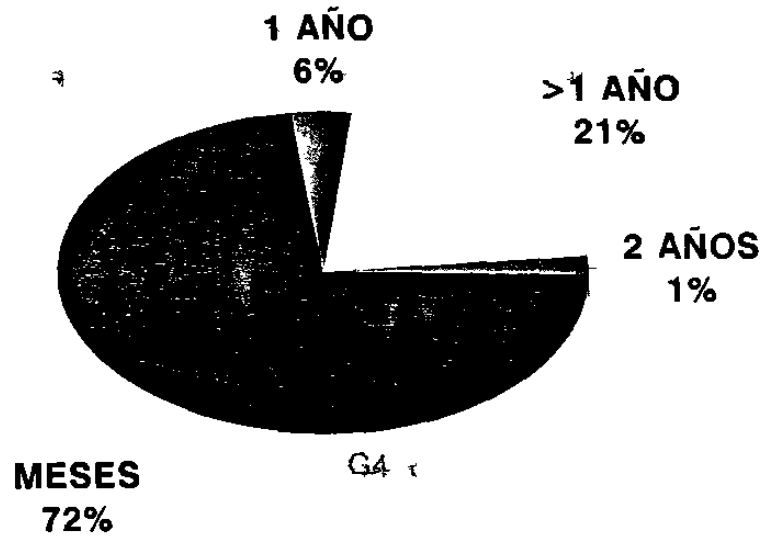


Figura 3: Frecuencia de edades en niños con rotavirus durante 1994-1995.

CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA CEPAS DE ROTAVIRUS INFECTANTE

Debido a la gran cantidad de casos positivos, para la caracterización de la cepas de rotavirus aisladas, los criterios de selección de las muestras para el análisis molecular fueron: incluir 45 muestras obtenidas de pacientes asintomáticos, y 94 muestras diarreicas representativas de todos los meses del estudio; entre estas últimas se encontraban también las muestras de heces de las cuales fué posible recolectar suero de fase aguda y convaleciente; dando un total de 139 muestras.

SEROTIPOS G

Mediante un ensayo de ELISA y utilizando anticuerpos específicos de serotipo G, en las 139 muestras de heces fecales analizadas se detectó la presencia de cepas con serotipos G1-G4 (tabla 19).

Tabla 19: Caracterización de cepas de rotavirus humano en serotipos G.

SEROTIPOS G

No. MTAS	G1	G3	G4	G1,G3	G2,G3	G3,G4	COMUN	NEG
139	60	38	1	8	1	2	2	17

Aunque en este brote existieron cepas de rotavirus con cuatro diferentes serotipos G, la mayoría de los casos presentaron sólo los serotipos G1 (43.1%) ó G3 (27.3%).

Asimismo, en 11 (7.9%) de las muestras tipificadas, se determinó dos serotipos simultáneamente (coinfecciones) (tabla 19); situación que se pudo corroborar, sólo en las coinfecciones G1, G3 mediante una electroforesis del RNA viral en geles de poliacrilamida; las cuales mostraron doble material genético con diferente migración en los segmentos 7, 8 y 9; genes responsables de codificar para la proteína VP7 (figura 4).

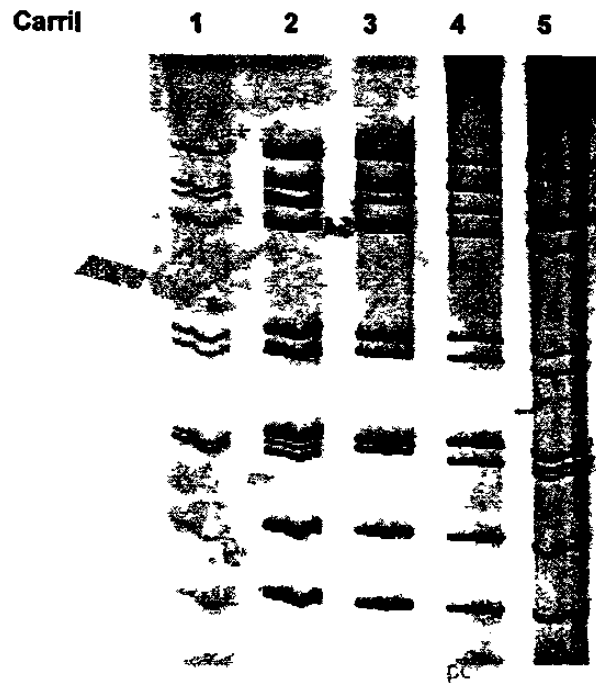


Figura 4: Coinfecciones con dos rotavirus con serotipo G diferente, en casos de gastroenteritis. Carril 2 y 5: coinfección con serotipos G1 y G3; Carril 3: coinfección con dos serotipos G3.

Por otra parte, en dos muestras aunque no se pudo detectar el serotipo G, existió reacción con el anticuerpo monoclonal 129, el cual sólo identifica la presencia de VP7, independientemente del serotipo. Además un 12.2% de las muestras no pudieron ser tipificables al menos, para los serotipos estudiados.

Sin embargo, a pesar de que los serotipos G1 y G3 fueron los predominantes en el brote epidémico, el comportamiento y cantidad de casos, fué diferente para cada serotipo, ya que el serotipo G3, se encontró presente en todos los meses del estudio en una frecuencia relativamente constante, aunque siempre en menor proporción que el serotipo G1 (sólo al inicio del estudio hubo más casos del serotipo G3); el serotipo G1, fué en aumento hasta el mes de Enero, donde se detectó con mayor frecuencia (figura 5).

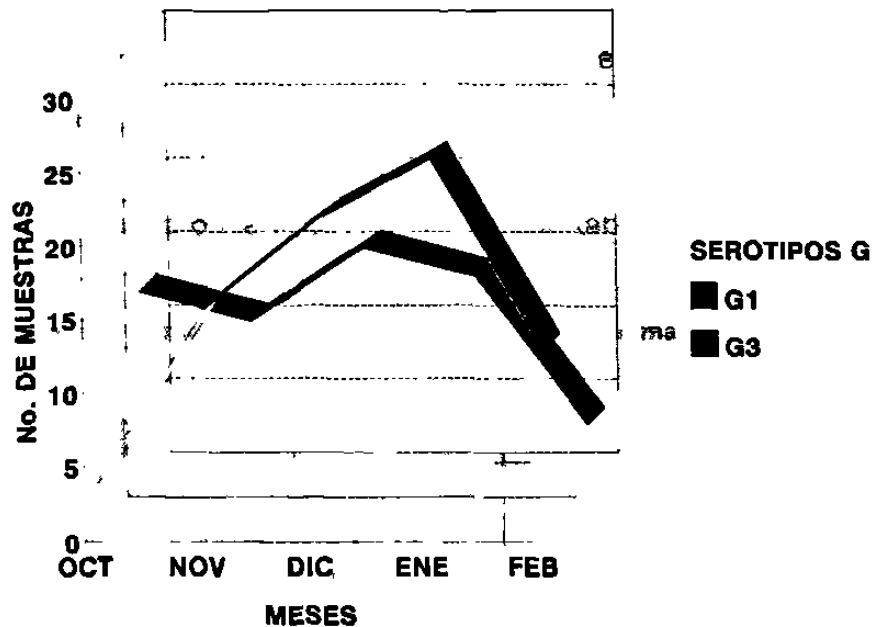


Figura 5: Comportamiento de los serotipos G1 y G3 durante el brote epidémico de rotavirus 1994-1995.

Además el comportamiento de estos dos serotipos en cuanto a tipo de población estudiada también mostró variaciones, ya que si bien, tanto sintomáticos como asintomáticos presentaron cepas con serotipos G1 y G3 (tabla 20), la distribución y frecuencia de estos serotipos en los pacientes sintomáticos, tuvo un aumento progresivo en la detección de G1 y una frecuencia constante para G3, mientras que en el caso de los pacientes asintomáticos ambos serotipos registraron un comportamiento similar durante todo el brote (figura 6 y 7).

Tabla 20: Frecuencia de serotipos G en muestras de niños sintomáticos y asintomáticos para rotavirus.

	G1	G3	G4	G1,G3	G2,G3	G3,G4	Comun	NEG	Total
SINT	40 (42.5%)	33 (35%)	1	5	1	1	0	13	94
ASINT	20 (44%)	15 (33%)	0	3	0	1	2	4	45

SEROTIPOS P

La caracterización de las cepas de rotavirus en serotipos P recuperadas de niños sintomáticos y asintomáticos, fué realizada utilizando anticuerpos monoclonales específicos de serotipo. Así las 139 muestras de heces seleccionadas mostraron la siguiente reactividad (tabla 21):

Tabla 21: Caracterización de cepas de rotavirus humano en serotipos P.

No. MTAS	SEROTIPO P	EPITOPES
67	P1A	F45:4, 1A10
33	P1A	F45:4
11	P1A	1A10
7	P1A,P1B	F45:4, 1A10, RV5:2
6	P1A,P1B	F45:4, RV5:2
1	P1B	RV5:2
14		NEG

Aunque 111 (79.8%) muestras pertenecieron al serotipo P1A, la utilización de dos anticuerpos monoclonales para la detección de este serotipo, demostró variabilidad de epitopes, ya que de éstas, 67 (48%) tuvieron los dos epitopes; 33 (23%.7) sólo el epitope F45 y, 11 (7.9%) el epitope 1A10 (tabla 21).

Asimismo, 13 (9.3%) cepas además de reaccionar con anticuerpos monoclonales para el serotipo P1A, presentaron también una reactividad con el anticuerpo monoclonal RV5, (específico de serotipo P1B). Además, en la tipificación de estos serotipos, también existió un 10% de muestras que no pudieron ser tipificables al menos, para los serotipos estudiados (tabla 21).

Por otra parte, con respecto al comportamiento de los dos serotipos P detectados durante el brote epidémico, aunque ambos se encontraron en todos los meses del estudio, el número de casos siempre fué mucho mayor para el serotipo P1A, quien resultó ser el predominante (figura 8).

■

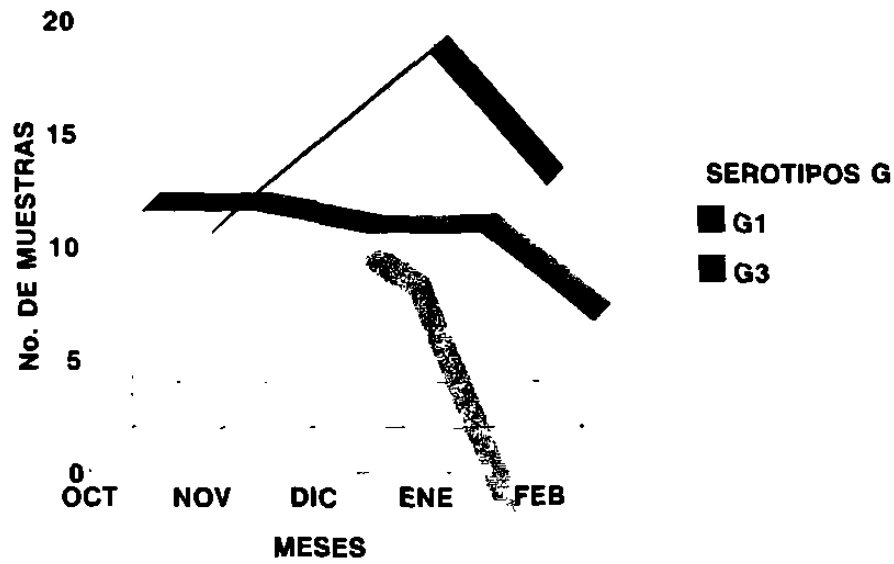


Figura 6: Comportamiento de los serotipos G1 y G3 en pacientes Sintomáticos durante el brote epidémico de rotavirus 1994-1995.

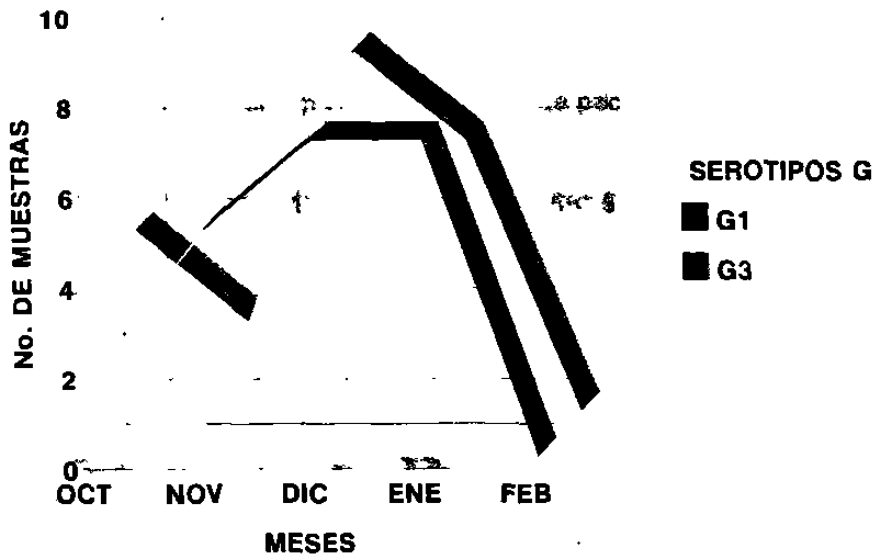


Figura 7: Comportamiento de los serotipos G1 y G3 en pacientes Asintomáticos durante el brote epidémico de rotavirus 1994-1995.

Sin embargo, el tipo y comportamiento de serotipos P en las dos poblaciones estudiadas (sintomáticos y asintomáticos), fué prácticamente la misma (tabla 22).

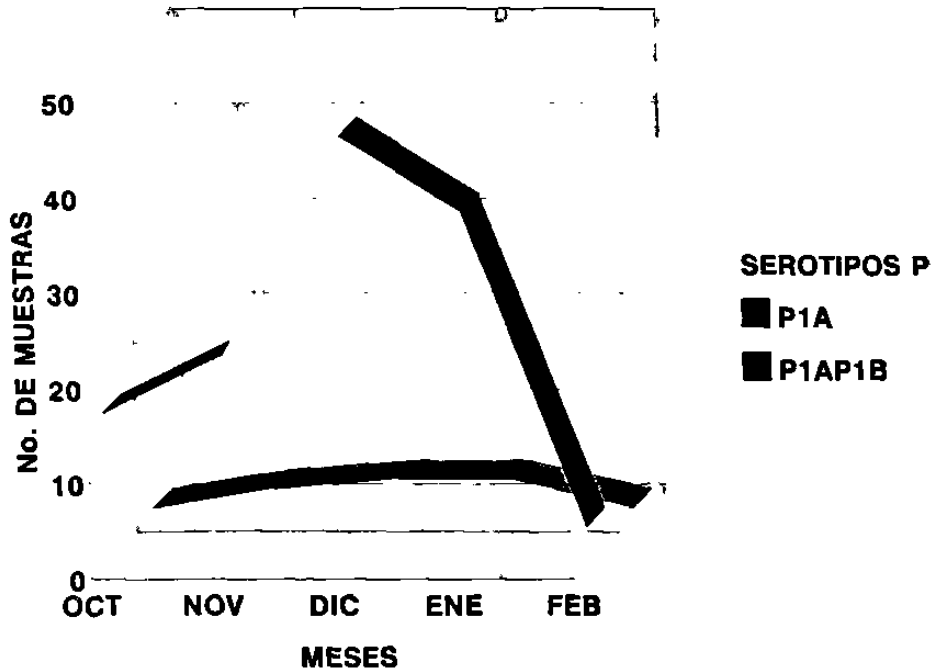


Figura 8: Comportamiento de los serotipos P1A y P1A,P1B durante el brote epidémico de rotavirus 1994-1995.

Tabla 22: Frecuencia de serotipos P en muestras de pacientes sintomáticos y asintomáticos para rotavirus.

	P1A	F45	1A10	P1ARV5	F45RV5	RV5	NEG	Total
SINT	45 (47.8%)	24	9	3	1	1	11	94
ASINT	22 (48%)	9	2	4	5	0	3	45

SEROTIPO G y P DE CEPAS DE ROTAVIRUS HUMANAS

La predominancia de serotipos, entre las cepas de rotavirus aisladas tanto de niños sintomáticos como asintomáticos, mostró que las cepas de rotavirus

circulando entre estas poblaciones; presentaron principalmente el serotipo dual G1,P1A (tablas 23 y 24).

Tabla 23: Relación de serotipos G y P de cepas de rotavirus humanas en pacientes sintomáticos.

	P1A	F45	1A10	P1ARV5	F45RV5	RV5	NEG	Total
G1	21	12	3	2	1		1	40
G3	17	9	3	1			3	33
G4	1							1
G1,G3	4		1					5
G2,G3						1		1
G3,G4							1	1
Común								0
NEG	2	3	2				6	13
Total	45	24	9	3	1	1	11	94

Por otra parte, la variabilidad de serotipo que se pudo detectar entre las diferentes combinaciones de serotipos G y P, de las cepas virales obtenidas de estas dos poblaciones, fué la presencia de cepas con serotipo G2G3,RV5 y G4,P1A; las cuales se detectaron exclusivamente en sintomáticos (tabla 23 y 24).

Tabla 24: Relación de serotipos G y P de cepas de rotavirus humanas en pacientes asintomáticos.

	P1A	F45	1A10	P1ARV5	F45RV5	NEG	Total
G1	11	3		3	3		20
G3	8	4	1		1	1	15
G1,G3		1					3
G3,G4		1					1
Común	1				1		2
NEG			1	1		2	4
Total	22	9	2	4	5	3	45

DETERMINACION DE GENOTIPO P

Sesenta y ocho cepas que presentaron reactividad para diversos anticuerpos monoclonales, se analizaron por reacción de polimerasa en cadena para determinar el genotipo correspondiente. De éstas, 60 resultaron ser genotipo 8, 1 genotipo 6 y 7 genotipo 4 (tabla 25).

Tabla 25: Genotipo P de cepas de rotavirus con variabilidad de epitopes en VP4.

GENOTIPO P				
Epitopes en VP4	P-gen 8	P-gen 6	P-gen 4	Cantidad
1A10	6	0	1	7
F45	13	0	0	13
1A10; F45	31	0	0	31
1A10; F45; RV5	7	0	0	7
RV5	0	0	4	4
1A10; RV5	0	0	2	2
F45; RV5	2	0	1	3
HS6	0	1	0	1
Total	59	1	8	68

Los resultados, confirman el serotipo P dado por los anticuerpos monoclonales, ya que las cepas que presentaban epitopes específicos de serotipo P1A (F45 y/o 1A10) pertenecieron al genotipo P-8; así como las cepas con epitopes RV5 (P1B), y HS6 (P2), resultaron ser genotipo P-4 y P-8 respectivamente (figura 9). Sin embargo, en 4 muestras, a pesar de contener epitopes para el serotipo P1A, fueron genotipo P-4, el cual está asociado al serotipo P1B (tabla 25).

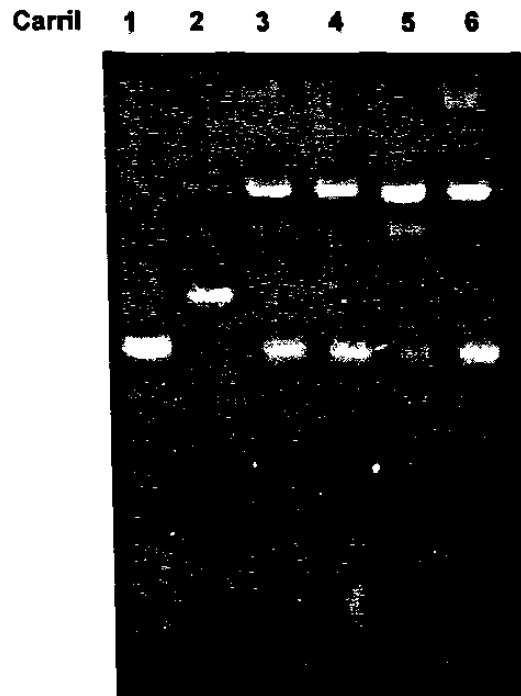


Figura 9: Genotipo P de rotavirus mediante PCR. Carril 1: Cepa Wa con genotipo P-8; carril 2: cepa DS1 con genotipo P-4; carril 3-6: muestras problema.

ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE

DETECCION DE IgA SECRETORA EN HECES FECALES

Utilizando anticuerpos monoclonales específicos de clase de Inmunoglobulina, se determinó la presencia de IgA secretora en muestras de heces fecales positivas para rotavirus, tanto de pacientes sintomáticos como asintomáticos para la gastroenteritis.

La presencia de IgA fué detectada en 43 (31.3%) muestras de heces, de un total de 137 analizadas, determinándose con mayor frecuencia en las muestras sintomáticas (tabla 26).

Tabla 26: Detección de IgA específica de rotavirus en heces fecales.

No. MTAS	TIPO DE MUESTRA	POSITIVOS	TITULO DE ANTICUERPOS
88	SINTOMATICOS	17	1:5
		1	1:20
49	ASINTOMATICOS	5	1:5

DETECCION DE IgM e IgG CONTRA ROTAVIRUS EN SUERO

A través del brote epidémico, se obtuvieron 80 sueros pareados (fase aguda y convaleciente) de niños con gastroenteritis por rotavirus, en los cuales se estudió la especificidad de la respuesta inmune humoral.

Los datos de edad, así como del serotipo G y P de la cepa de rotavirus responsable de la infección, se muestran en la tabla 27. Así, independientemente de la edad y el serotipo de la cepa infectante, en 73 (91.2%) muestras de suero, fué posible encontrar la presencia de anticuerpos de clase IgM e IgG.

Tabla 27: Edad en meses y Serotipo G, P infectante de sueros pares recolectados para la determinación de la especificidad de la respuesta inmune humoral en una infección natural por rotavirus .

Edad (*)	G1			G3				G1G3		NEG		ND	Total
	P1A	F45 (a)	P1A RV5	P1A	F45	1A10 (b)	P1A RV5	P1A	1A10	F45	NEG		
2				2									2
4		2			2								4
5				3									3
6	1	3		4			1			1			10
7	2			1		1		1				1	6
8		1		2	1	1							5
9	1	2		3	1						1		8
10		2		3									5
11				1									1
12	2	1		3	1								7
13	2												2
14				2	1			1	1				5
15	1			2	1		1						5
16	1	1					1						3
17				1		1							2
18		1					1						2
20						1					1		2
23							1						1
26					1								1
ND	1	1	1	1	1								5
Total	11	14	1	28	9	4	6	2	1	1	2	1	80

(*) Edad de los infantes en meses.

(a) y (b) El serotipo P, en cada uno de los casos, corresponde a P1A, sin embargo, estas muestras sólo presentan un epitope, razón por la cual se omite serotipo P1A, y se señala el epitope presente.

Sin embargo en 51 (63.7%) sueros, los anticuerpos IgM se detectaron tanto en suero de fase aguda como convalescente; mientras que para los anticuerpos IgG (71.2%), la mayoría se determinó en suero de fase convalescente. Asimismo, existió un suero donde no se detectó IgM y dos sueros donde no se encontró IgG, aunque en cada uno de ellos, cuando no se encontró IgM, se detectaba IgG y viceversa (tabla 28).

Tabla 28: Detección de anticuerpos IgM e IgG contra rotavirus en suero de fase aguda y convalescente de niños con rotavirus.

Ac*	SFA, SFC	SFA (a)	SFC (b)	NEG	ND**	Total
IgM	51	12	10	1	6	80
IgG	11	4	57	2	6	80

- * Ac: Anticuerpo
- ** ND: No determinado
- (a) SFA: Suero de fase aguda
- (b) SFC: Suero de fase convalescente

Por otra parte, a excepción de un sólo caso, en donde sólo se encontró anticuerpos de clase IgG en suero de fase convalescente, el título de anticuerpos de clase IgM fué siempre mayor que el título de IgG, alcanzando títulos de 1:800 y mayores, situación que demuestra que las infecciones producidas por rotavirus en estos pacientes fueron de naturaleza primaria (figura 10 y 11).

CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

Mediante ensayos de reducción de focos infecciosos por neutralización, fué posible identificar y cuantificar tanto en suero de fase aguda como convalescente, anticuerpos neutralizantes para cepas de rotavirus con diferente serotipo G y P.



Figura 10: Anticuerpos de clase IgM e IgG contra rotavirus en suero de fase aguda de niños con gastroenteritis.

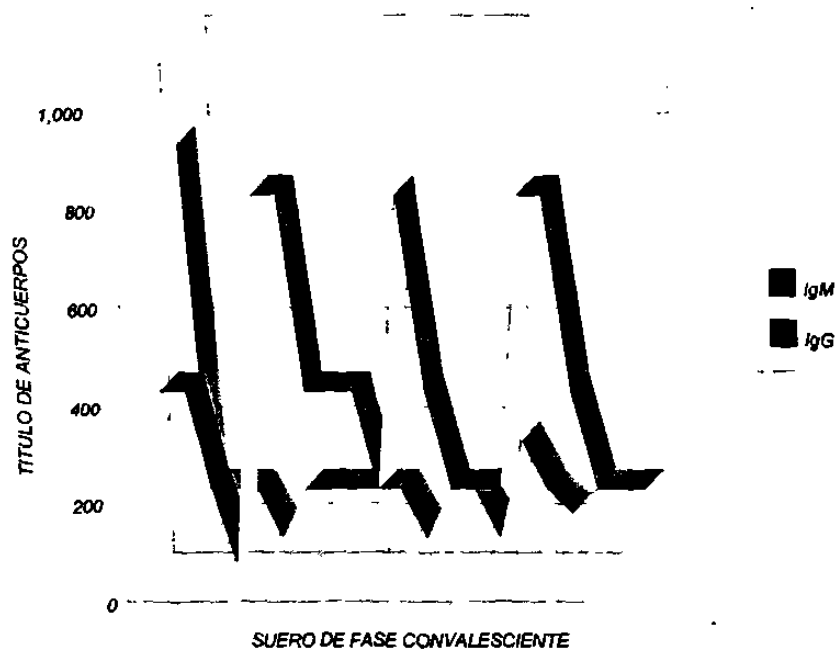


Figura 11: Anticuerpos de clase IgM e IgG contra rotavirus en suero de fase convalescente de niños con gastroenteritis.

Así, los 80 sueros pares provenientes en su mayoría de infecciones con los serotipos G1,P1A y G3,P1A; fueron probados con las cepas virales: **Wa** (G1, P1A), **S2** (G2, P1B), **Price** (G3, P1A) y **ST3** (G4, P2), en donde sólo 51 (63.7%) presentaron seroconversión. De estos, 49 mostraron seroconversión homóloga para el serotipo P infectante (P1A), mientras que para el serotipo G, 26 (51 %) resultaron ser seroconversión homóloga (Wa o Price), 10 (20 %) además de seroconversión homóloga, existió seroconversión para otras cepas, 12 (23 %) seroconversión heteróloga, 2 (4%) sueros con coinfecciones presentaron seroconversión a una de las cepas infectantes, y 1 (2%) suero con seroconversión no se determinó el serotipo infectante.

Por otra parte, en 24 sueros donde no existió seroconversión, los títulos de anticuerpos detectados estaban en el rango de 1:100 y 1:200 y, el reconocimiento de las cepas Wa (G1) y Price (G3), también fué la respuesta predominante. En 5 sueros, no se detectó actividad neutralizante para ninguna de las cepas virales probadas; aunque en dos de ellos sí se detectaron anticuerpos de clase IgM e IgG para rotavirus.

SEROCONVERSION HOMOLOGA

Veintiseis (51 %) sueros presentaron una seroconversión homóloga hacia el serotipo G de la cepa infectante, donde 9 (35 %) correspondieron al serotipo G1 y 17 (65 %) al serotipo G3.

Asimismo, dos sueros que provenían de una coinfección con serotipos G1,G3, presentaron seroconversión sólo con la cepa Wa (G1).

SEROCONVERSION HOMOLOGA Y HETEROLOGA

De 10 sueros con seroconversión homóloga a G3, en 9 (90 %) se detectó también respuesta hacia G1, aunque 3 de estos sueros presentaron además seroconversión a otras cepas. El suero restante presentó seroconversión hacia el serotipo G4.

SEROCONVERSION HETEROLOGA

Entre los 12 sueros con seroconversión heteróloga, 5 tenían como cepa infectante G1, y 7 la cepa infectante correspondió a G3.

De estas, todas los sueros con cepa infectante G3 seroconvirtieron a G1, mientras que de los 5 sueros cuya cepa infectante fué G1, en 3 se detectó seroconversión a G3, y en 2 seroconversión a G4.

Un suero cuyo serotipo G infectante no pudo ser identificado, presentó una seroconversión con el serotipo G1 (Wa) (tabla 29).

ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA PROTEINAS VP7 Y VP4 DE ROTAVIRUS

Para determinar la especificidad de los anticuerpos neutralizantes hacia las proteínas de superficie de rotavirus (VP4 y VP7), los 51 sueros de fase aguda y convaleciente, se analizaron por neutralización, utilizando cepas de rotavirus rearreglantes, las cuales son cepas manipuladas para expresar sólo una de las proteínas a estudiar.

SUEROS CON CEPA INFECTANTE G1

De los 14 sueros con cepa infectante G1, 9 (64 %) seroconvirtieron con su cepa homóloga (Wa: G1). De estos, en 7 (78 %) se detectaron anticuerpos específicos para ambas proteínas (VP7 y VP4), donde 3 sueros, además de reaccionar con la VP7 de la cepa homóloga, reaccionaron con la VP7 de la cepa Price (serotipo G3). En dos casos (22 %), sólo se registraron anticuerpos hacia la proteína VP4.

De los 5 sueros restantes, 3 que seroconvirtieron a G3, en 2, la respuesta fué específica para VP4 y en uno, la especificidad fué dirigida hacia la proteína VP7. Sin embargo la reactividad se presentó tanto para la VP7 con serotipo G1, como para la VP7-G3.

Tabla 29: Seroconversión de anticuerpos neutralizantes contra cepas de rotavirus, en suero de fase aguda y convalescente de niños con infecciones primarias.

Suero	Edad	Serotipo Infectante	Neutralización	Suero	Edad	Serotipo Infectante	Neutralización
77647	8	1	1*	43598	14	3	3
79582	10	1	1*	54615	9	3	3
79235	ND	1	1	54917	15	3	3
79238	10	1	1	54919	10	3	3
79773	ND	1	1	54933	9	3	3
80074	7	1	1	55451	6	3	3
80172	13	1	1	55669	14	3	3
80502	12	1	1	56210	10	3	3
80858	13	1	1	65500	12	3	3
55387	7	1	3*	65660	15	3	3
55137	16	1	3*	65856	5	3	3
54941	4	1	3	21091	12	3	1,3*
80865	12	1	4	21233	7	3	1,3
80866	6	1	4	21236	20	3	1,3
32332	8	3	1*	21251	2	3	1,3
32629	15	3	1*	43616	9	3	1,3
77557	14	3	1*	43974	10	3	1,3
79325	ND	3	1*	44202	16	3	1,3,4*
21097	17	3	1	55490	15	3	3,4*
21306	6	3	1	21234	18	3	1,2,3
78112	ND	3	1	21226	8	3	1,2,3,4
32688	5	3	3*	80852	14	1,3	1*
43421	6	3	3*	80848	14	1,3	1
43500	6	3	3*	80351	6	?	1
32652	11	3	3				
32789	17	3	3				
43460	7	3	3				

ND: Edad no determinada

?: Serotipo G no tipificable

Los 2 sueros que seroconvirtieron a G4, presentaron especificidad a VP7, tanto de serotipo G3 como G4 (VP7-G3 y VP7-G4).

SUEROS CON CEPA INFECTANTE G3

De los 34 sueros con cepa infectante G3, en 17 con una seroconversión homóloga, se detectaron anticuerpos con especificidad a las dos proteínas (VP4,VP7).

En 6 casos, donde existió el reconocimiento simultáneo para dos cepas (Wa y Price); 5 presentaron una reactividad para VP7 con serotipo G3, además de

anticuerpos contra VP4; mientras que en un suero, se detectaron anticuerpos específicos para la VP7 y VP4 de ambas cepas (Wa y Price).

La especificidad de los anticuerpos neutralizantes para los sueros que neutralizaron simultáneamente 2, 3 y 4 cepas, también estaba dirigida hacia las dos proteínas VP4 y VP7.

Por otra parte, en 6 de los 7 sueros con seroconversión para la cepa Wa (serotipo G1), se encontraron anticuerpos específicos para las dos proteínas, VP4 y VP7-G3.

CEPA INFECTANTE G1,G3

El suero proveniente de una cepa viral la cual no pudo ser tipificada para serotipo G, pero que presentaba una proteína VP4 con serotipo P1A (F45), y que había mostrado una seroconversión sólo para la cepa Wa (G1), presentó anticuerpos específicos para la VP4-P1A y para la VP7-G3 (tabla 30).

Asimismo, cabe mencionar que en este análisis utilizando cepas rearreglantes, los títulos de anticuerpos fueron en general, menores a los detectados con las cepas virales de referencia (Wa, S2, Price y ST3), a excepción de los títulos registrados para la cepa RRV, (con la cual se determinaba la especificidad de los anticuerpos neutralizantes para la proteína VP7 con serotipo G3); ya que en la mayoría de los casos, los sueros que presentaron reactividad hacia esta cepa, el título de anticuerpos fueron los más altos registrados, inclusive en sueros en donde no se había registrado seroconversión para la cepa Price (G3).

Sin embargo cabe aclarar, que esta cepa no se trataba de un rearreglante, sino un virus que presentaba sus dos proteínas de superficie de origen animal (mono Rhesus); situación que provocó un estudio extra, para corroborar que tal respuesta hacia esta cepa era por el reconocimiento de la VP7. Así, se utilizó una cepa rearreglante denominanda 3-17, la cual contenía la proteína VP4 de RRV (serotipo P5) y la proteína VP7 de EDIM (rotavirus de ratón con serotipo G indeterminado); con lo cual una reacción negativa para esta cepa, nos indicaba que la respuesta dada hacia RRV era a través de VP7.

Tabla 30: Especificidad de anticuerpos neutralizantes para las proteínas VP7 y VP4 de rotavirus en suero de fase aguda y convaleciente, de niños con infecciones primarias.

Serotipo Infectante	AcN (a)	Anti-VP7 ^(b)	Anti-VP4 ^(c)	Serotipo Infectante	AcN	Anti-VP7	Anti-VP4
1	1*	-	1,3	3	3	3	1,3
1	1*	1	1,3	3	3	3	1,3
1	1	-	1,3	3	3	1,3	1,3
1	1	1	1,3	3	3	3	1,3
1	1	1	1,3	3	3	3	1,3
1	1	1,3	1,3	3	3	3	1,3
1	1	1	1,3	3	3	3	1,3
1	1	1,3	1,3	3	3	3	1,3
1	1	1,3	1,3	3	3	3	1,3
1	3*	-	1,3	3	3	3	1,3
1	3*	-	1,3	3	3	1,3	1,3
1	3	1,3	-	3	3	3	1,3
1	4	3	**	3	1,3*	3	1,3
1	4	4	**	3	1,3	3	1,3
3	1*	3	1,3	3	1,3	3	1,3
3	1*	3	-	3	1,3	3	1,3
3	1*	3	1,3	3	1,3	3	1,3
3	1*	3	1,3	3	1,3	1,3	1,3
3	1	3	1,3	3	1,3,4*	3,4	1,3
3	1	3	1,3	3	3,4*	4	1,3
3	1	1,3	1,3	3	1,2,3	2,3	1,3
3	3*	3	1,3	3	1,2,3,4	3,4	1,2,3
3	3*	3	1,3	1,3	1*	-	1,3
3	3*	3	1,3	1,3	1	1,3	1,3
3	3	3	1,3	?	1	3	1,3
3	3	1,3	1,3				

(a) AcN: Anticuerpos neutralizantes contra cepas de rotavirus con diferente serotipo G y P.

(b) Anticuerpos neutralizantes específicos para la proteína VP7: el número significa el serotipo G, al cual pertenece la proteína.

(c) Anticuerpos neutralizantes específicos para la proteína VP4; como las cepas Wa (G1) y Price (G3), presentan el mismo serotipo P: P1A, se concluye que la respuesta va hacia la VP4 de ambas cepas (G1,G3).

** No se determinó la especificidad de anticuerpos contra la proteína VP4.

Aunque los resultados con la cepa 3-17, en la mayoría de los sueros analizados fueron los esperados, en 21 sueros (41.1%) existió (aunque poca) reacción positiva, por lo que de nueva cuenta, se hizo necesario realizar otro ensayo, para descartar la posibilidad de estar titulando en estos sueros, otro tipo de molécula diferente a los anticuerpos. Por lo tanto, se escogieron 6 sueros con altos títulos de anticuerpos para la cepa RRV tanto en suero de fase aguda como convaleciente ($>1:200$ / $>1:1600$) y a una alícuota de éstos, se les adicionó β -Mercaptoetanol y se calentaron a ebullición durante un minuto; después del ensayo de neutralización se detectó que en todos los sueros tratados, el título de anticuerpos neutralizantes había sido eliminado, encontrándose el mismo número de focos infecciosos en los pozos con suero problema y en los pozos control; mientras que en los sueros no tratados, el título de anticuerpos neutralizantes permaneció sin alteración; este resultado confirmó entonces que la reacción positiva de estos sueros hacia la cepa RRV, fué mediada por anticuerpos.

Por otra parte, en todos los 51 sueros donde existió seroconversión, siempre se detectó anticuerpos neutralizantes específicos para una ó ambas proteínas de superficie de rotavirus; y cuando existió una seroconversión sólo para la cepa homóloga, se detectaron anticuerpos específicos para las proteínas VP7 y VP4 de la cepa homóloga; mientras que cuando se detectó una seroconversión contra una cepa heteróloga (G1 ó G3), sólo se detectaron anticuerpos contra la VP4 (tabla 30).

ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA EPITOPES DE VP4 Y VP7

Para determinar la especificidad de los anticuerpos neutralizantes hacia epitopes en las proteínas VP4 y VP7, se seleccionaron 40 sueros pares donde se incluían 21 de los sueros en donde existió seroconversión.

SUEROS CON REACCION HOMOLOGA A G1

En 4 de 5 de los sueros en donde existió una reacción homóloga para el serotipo G1, y que se habían detectado anticuerpos específicos para la VP7-G1 y VP4-P1A; se encontraron, anticuerpos específicos para epítopes de neutralización para VP7-G1 y VP4-P1A; mientras que en uno, se detectaron anticuerpos específicos de epítopes de la proteína VP4-P1A. Por otra parte, en todos estos sueros, también se detectó la presencia de anticuerpos específicos para el epítope 4F8, el cual se encuentra asociado a VP7 con serotipo G3 (tabla 31).

SUEROS CON REACCION HOMOLOGA A G3

En los 5 sueros que neutralizaron de forma homóloga a Price (G3), 4 presentaron anticuerpos específicos para epítopes 4F8 (VP7-G3) y 1A10,1E4 (VP4-P1A); los cuales corresponden a epítopes asociados a la cepa infectante. El quinto suero, presentó anticuerpos para epítopes de VP7 con serotipo G1 (2C9),

SUEROS CON REACCION HETEROLOGA

Los sueros con reacción heteróloga se clasificaron en dos grupos: a) aquellos donde solo se detectó respuesta heteróloga y b) aquellos que tuvieron respuesta contra cepa homóloga y heteróloga.

En los 2 sueros que corresponden al primer grupo (que seroconvirtieron contra cepa homóloga y heteróloga) en los serotipos G1 que seroconvirtieron con G3, además de anticuerpos contra epítopes de VP7-G1, se detectaron anticuerpos específicos de epítopes tanto para la VP7-G3 como para la VP4-P1A de la cepa heteróloga.

Sin embargo, los sueros que provenían de una infección con serotipo G3, y que habían seroconvertido con la cepa Wa (G1), sólo se detectaron anticuerpos para epítopes de la proteína VP4-P1A de la cepa heteróloga, resultado muy semejante al aportado por los ensayos de neutralización (tabla 31).

Tabla 31: Especificidad de anticuerpos neutralizantes hacia epítopes de neutralización en VP7 y VP4 de rotavirus, en suero de fase aguda y convaleciente de niños con una infección primaria.

Suero	Edad	Serotipo Infectante/ AcN	Anti-VP7	Anti-VP4	Epítopes/VP7	Epítopes/VP4
77647	8	1/1	-	1,3	2C9, 4F8	1A10, 1E4
79238	10	1/1	1	1,3	2C9, 4F8	1A10, 1E4
79773	ND	1/1	1	1,3	4F8	1A10, 1E4
80172	13	1/1	1	1,3	2C9, 4F8	1A10, 1E4
80858	13	1/1	1,3 ^c	1,3	5E8	1A10, 1E4
55387	7	1/3	1,3 ^c	1,3	2C9, 4F8	1A10, 1E4
54941	4	1/3	1,3 ^a	-	5E8, 4F8	1A10, 1E4
32332	8	3/1	3	1,3	4F8	1A10, 1E4
32629	15	3/1	3	-	4F8	1A10, 1E4
79325	ND	3/1	3	1,3	2C9, 4F8	1A10 ^a
21097	17	3/1	3	1,3	4F8	1A10, 1E4
21306	6	3/1	3	1,3	4F8 ₁	1A10, 1E4
43421	6	3/3	3	1,3	2C9, 4F8	1A10, 1E4
43460	7	3/3	3	1,3	4F8, 2A4	1A10, 1E4
54917	15	3/3	3	1,3	4F8	1A10, 1E4
54919	10	3/3	3	1,3	4F8	1A10, 1E4
65500	12	3/3	3	1,3	4F8	1A10, 1E4
21091	12	3/1,3	3	1,3 ₃	4F8	1A10, 1E4
21233	7	3/1,3	3	-	4F8	1A10, 1E4
21236	20	3/1,3	3	1,3	4F8	1A10, 1E4
43974	10	3/1,3	1,3	1,3	4F8	1A10, 1E4

Epítopes VP7: 2C9 y 5E8 epítopes para G1; 4F8 epítope para G3.
 Epítopes VP4: 1A10 y 1E4 epítopes para P1A.

DISCUSION

El brote 94-95 de rotavirus resultó con una morbilidad de cerca del 50% (46%), mucho más alta que en brotes anteriores según reportes obtenidos entre nuestra población por *Contreras y col. 1995*, así, además de la detección del virus en pacientes con diarrea, se encontró un 15 % de casos de niños asintomáticos portadores de rotavirus, situación que hasta este momento no se tenía registrado en nuestra región; aunque estudios epidemiológicos en otras regiones por *Champsaur y col. 1995*, indican que los casos de infecciones asintomáticas en niños ocurre muy frecuentemente y al menos en niños hospitalizados, como sucedió en este caso, un 36% de éstos desarrollan diarrea, mientras un 24% no presentan síntomas.

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de casos de rotavirus, el comportamiento de la epidemia a través del período de estudio (Octubre 1994-Febrero 1995) fué idéntica a los de años anteriores, y muy semejante a los patrones epidémicos de rotavirus en Norte América, donde a medida que entra la temporada de invierno, los casos positivos comienzan a aparecer, y se van incrementando conforme avanza el invierno, hasta llegar a un valor máximo, para posteriormente ir disminuyendo, a la par que termina la temporada fría (*Christensen, 1989; Le Baron, y col. 1990*). Asimismo, en este estudio se corrobora que la población más afectada por rotavirus, son los niños menores de 2 años, tal y como lo describen *Kapikian y Chanock 1976; Bishop, 1986*.

En relación a las características antigénicas de las cepas de rotavirus, responsables del brote epidémico, se observó que la alta morbilidad registrada en este brote, posiblemente se debió a un incremento de cepas de rotavirus G1, serotipo para el cual, prácticamente no existía protección entre la población infantil; ya que en brotes anteriores, el serotipo G3, había sido el predominante (*Contreras y col. 1995*). Y, aunque también se detectaron un número

considerable de casos entéricos con cepas virales serotipo G3; éstas siempre fueron en menor proporción que las cepas G1.

Asimismo, el comportamiento de los serotipos G entre las dos poblaciones de estudio (sintomáticos y asintomáticos), fué un poco diferente, pues en los sintomáticos existió mayor número de casos con G1, que con G3; mientras que entre los asintomáticos esta proporción fué muy semejante.

Dado que el tipo de serotipos G detectado entre las dos poblaciones fué el mismo, esto nos indica que circularon las mismas cepas virales en ambas, y que no existió un serotipo exclusivo para cada población, tal como se describe para las cepas de rotavirus que infectan a neonatos, las cuales producen infecciones asintomáticas y son antigénicamente distintas a las cepas sintomáticas (*Flores, y col. 1986; Albert, y col. 1987; Flores, y col. 1988*); por lo que consideramos que el carácter de ser sintomático ó asintomático para una infección por rotavirus, al menos en este caso, se debió más a las propiedades intrínsecas de cada niño, que a las características antigénicas de la cepa viral en cuestión.

Este mismo resultado también se observó en cuanto al serotipo P de las cepas virales, donde el serotipo P1A fué el predominante en todas las muestras, tanto sintomáticas como asintomáticas; y, aunque, algunas cepas también presentaron reactividad para el epítotope RV5, el cual pertenece al serotipo P1B, (epítotope de cepas sintomáticas al igual que P1A), se volvió a confirmar que las cepas virales responsables de las infecciones presentaron características antigénicas típicas de cepas sintomáticas, y la presencia de infantes que no desarrollaron la enfermedad, fué propia de cada niño.

Por otra parte, ya que algunas muestras presentaron reactividad con varios anticuerpos monoclonales para diferente serotipo P, se realizó un análisis de estas muestras, mediante PCR, con el objetivo de determinar la relación entre el serotipo encontrado y del genotipo P, ya que aún y cuando a nivel superficial pudiera existir una reacción cruzada, era nuestro interés el conocer si esto fué un reflejo del genoma.

Este análisis demostró que en todas las muestras con un serotipo definido por los anticuerpos monoclonales, la correlación con el genotipo P obtenido fue completa; asimismo, se pudo observar que las muestras que presentaban los dos epitopes estudiados para el serotipo P1A (F45 y 1A10) y que además también reaccionaron con el epitope RV5 (P1B), resultaron ser genotipo P-8, el cual sólo está asociado al serotipo P1A. Mientras que las cepas, que sólo poseían un epitope para P1A además del epitope RV5, pertenecieron al genotipo P-4, relacionado con el serotipo P1B. Sin embargo, cabe destacar que estas muestras con genotipo P-4, todas tenían un serotipo G2, que también está asociado a cepas P1B, P-4. Por lo que posiblemente en estas cepas virales, el serotipo P es P1B, y la reactividad con epitopes pertenecientes al serotipo P1A, sea una reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales; situación que se podría definir al realizar la secuenciación de estos genes, y determinar los cambios genéticos relacionados a las regiones que involucran la antigenicidad de los epitopes.

Asimismo, aunque la mayoría de las VP4 tipificadas presentaban los dos epitopes de neutralización (1A10 y F45), existieron muchas que sólo contenían uno de los dos epitopes mencionados, resultado muy semejante al obtenido por **Contreras y col. 1995**, en donde se observó variabilidad de epitopes en VP4 de cepas virales de campo. Aunque cabe mencionar, que el epitope 1A10, el cual también fue detectado por Contreras y col. en la misma área de estudio, mostró ser un epitope, que se ha conservado entre la proteína VP4 de las cepas de rotavirus, de dos brotes epidémicos sucesivos en una misma región geográfica, dato por demás importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que puede servir de base para la posible introducción y valoración de una vacuna contra rotavirus en nuestra región.

En la determinación de la respuesta inmunológica, los niveles de IgA en heces fecales tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos fueron relativamente bajos, suponemos que el hecho de encontrar muy poca reactividad

para esta inmunoglobulina, se pudo deber a varios factores: a) las muestras obtenidas de pacientes positivos para el virus; no fueron analizadas inmediatamente para la detección de IgA secretora, sino que eran almacenadas a -20°C , y el análisis se realizó hasta 3-6 meses después de la toma de la muestra; b) las muestras se congelaron y descongelaron; c) se estima que la vida media de la IgA secretora en heces es de 4-10 días de la infección. Razones por las cuales pensamos que las IgA secretoras, si era el caso de que estaban presentes en las muestras fecales, fueron desnaturalizadas, ya que son mucho más lábiles que las inmunoglobulinas séricas ó simplemente, no fueron producidas. Por esta razón, la cuantificación de los niveles anticuerpos IgM e IgG en suero de fase aguda y convaleciente fué muy importante y, el hecho de encontrar altos títulos de anticuerpos de clase IgM en suero de fase aguda y ligeramente títulos menores en fase convaleciente en todos los sueros analizados, indicó que las infecciones virales fueron de naturaleza primaria (*Riepenhoff-Talty, y col. 1981; Davidson y col. 1983*).

Así, para analizar la respuesta inmune humoral, nosotros partimos de 80 sueros con infecciones primarias de rotavirus serotipos G3,P1A (58.7%) y G1,P1A (32.5%). Donde sólo 51 presentaron una reacción de seroconversión, aunque únicamente en 15 sueros se encontraron anticuerpos neutralizantes tanto en suero de fase aguda como convaleciente, ya que en los 36 restantes, se registraron anticuerpos exclusivamente en el suero de fase convaleciente, aunque con títulos iguales o mayores de 1:400, razón por la que suponemos que en estos sueros también existe una seroconversión, pero que posiblemente el título de anticuerpos en fase aguda fué menor a 1:100, que era la dilución más baja con la que trabajamos, situación que también propició escoger sólo aquellos sueros que presentaban títulos de 1:400 en adelante, para asegurarnos que el incremento de anticuerpos, independientemente del título en fase aguda (1:25, 1:50, etc.) si fuera 4 veces mayor, y existiera una seroconversión real en estos sueros.

De esta manera, dentro de los 51 sueros con seroconversión, en 14 con serotipo infectante G1, 9 reconocieron sólo a su cepa homóloga (Wa:G1), 3 seroconvirtieron con serotipo G3 (price) y 2 con G4 (ST3); concordando con lo descrito por *Arias, y col. 1995* donde el patrón de respuesta, fué característico al serotipo infectante.

Por otra parte, en 34 infecciones con serotipo G3, existió una seroconversión en 17 con su cepa homóloga, 7 seroconvirtieron con G1, a 8 reaccionaron simultáneamente con G1 y G3; y 4 sueros, además de reconocer a su cepa homóloga, en 2 existió seroconversión con G4, y en otras 2 con G1 y G2. Así, aunque el patrón de respuesta de las infecciones con serotipo G3P1A, fué muy similar al mostrado en las infecciones con serotipo G1P1A, aquí se presentaron mayor cantidad de sueros con una respuesta heterogénea a más serotipos G diferentes, ya que mientras una cepa G1 dejó sólo protección contra otros dos serotipos, una cepa G3, dió protección para 3 serotipos diferentes; esta última situación coincide con la descrita por *Brussow y col. 1991* en donde también se encontró una reacción primaria heterogénea en infecciones ocasionadas por serotipos G1, el cual también existió protección contra 3 serotipos adicionales: G3, G4 y G9; sólo que en nuestro caso, las infecciones provienen de una cepa G3 y protección para G1, G2 y G4.

Además en dos sueros provenientes de una coinfección con serotipos G1,G3, sólo existió seroconversión para el serotipo G1, al igual que un suero, que provenía de una cepa que no había sido tipificable al menos para serotipo G, pero que presentaba una VP4 con serotipo P1A (F45). Este último caso, también se correlacionó con el encontrado por *Arias y col. 1995*, en donde 2 sueros cuya cepa infectante tampoco había sido posible tipificar para serotipo G, pero que pertenecía al subgrupo II, seroconvirtió sólo con serotipo G1. Cabe mencionar que la cepa no tipificable en nuestro caso, reaccionó con un anticuerpo monoclonal COMUN, el cual sólo detecta la presencia de la proteína VP7.

En el presente estudio, aunque se detectó tanto una respuesta homotípica (26 sueros: 51%) como heterotípica (25 sueros: 49%), suponemos que en muchos de los casos, la respuesta heterotípica fué dada principalmente a través de VP4,

ya que tanto las cepas de referencia Wa (G1) y Price (G3) presentan el mismo serotipo P, al igual que las cepas infectantes analizadas; sin embargo, no podemos descartar que en algunos casos, la heterogeneidad de la respuesta se deba a VP7, como lo sugiere *Arias, y col. 1995*.

Esta suposición de que en las infecciones primarias analizadas, VP4 era la responsable de la respuesta heterotípica observada, fué corroborada en parte, al determinar la especificidad de los anticuerpos neutralizantes para las proteínas VP7 y VP4 en cepas virales rearreglantes, en donde las proteínas se encuentran separadas. De esta manera, al menos para las infecciones en donde sólo existió una respuesta homóloga, se detectaron anticuerpos contra la VP7 y VP4 de la cepa homóloga en la misma proporción, observándose que en estos casos, el reconocimiento fué a través de ambas proteínas. Sin embargo, en las infecciones con respuesta heteróloga, en el 80% (20 sueros), los anticuerpos neutralizantes se dirigieron principalmente contra la proteína VP4 de la cepa heteróloga, aunque en 3 sueros también se detectaron anticuerpos contra la VP7 de cepas diferentes.

Cabe mencionar que cuando la infección era con un serotipo G1 y existía seroconversión sólo con G3, una respuesta contra la VP4-P1A fué la predominante; pero, cuando la infección era con serotipo G3 y una seroconversión sólo con el serotipo G1 ó bien G1 y G3 simultáneamente, de igual forma, la respuesta contra la VP4-P1A era la predominante, aunque también existía reactividad contra la VP7 homóloga (G3).

Asimismo, en los sueros en donde existió una seroconversión para serotipo G2 y G4, además de G1 y G3, se presentó una respuesta hacia VP7-G4 y VP7-G2; mientras que en la respuesta hacia los serotipo G1 y G3, los anticuerpos hacia la proteína VP4 fué la que prevaleció. Mientras tanto, la cepa cuyo serotipo G no había sido definido, y que había seroconvertido sólo con el serotipo G1 (Wa), mostró anticuerpos contra la VP4-P1A y contra la VP7-G3, patrón de respuesta igual, al que presentaron cepas G3 infectantes que seroconvirtieron con G1 exclusivamente; por lo que suponemos que en base a esta reactividad, posiblemente el serotipo G de esta cepa, sea G3.

Así, nuestros resultados en este aspecto, no podemos compararlos con otros realizados, ya que aunque se han realizado análisis de la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra las dos proteínas de superficie virales, los estudios han sido en niños vacunados con cepas animales de rotavirus ó bien, en adultos infectados oralmente, y no, en una infección natural con cepas endémicas del área geográfica en cuestión, como lo es en nuestro caso.

Sin embargo, teniendo como antecedentes estos resultados, se analizó de nueva cuenta la especificidad de los anticuerpos neutralizantes para las proteínas VP7 y VP4, pero ahora, especialmente para epitopes de neutralización en cada una de ellas, mediante un ensayo inmunoenzimático de competencia.

De esta manera, de los 51 sueros con seroconversión, en 21 fué posible llevar acabo tal experimento y los resultados obtenidos fueron muy similares a los aportados por los ensayos de neutralización, aunque también se presentaron algunas contradicciones sobre la presencia de anticuerpos específicos de epitopes, y la ausencia de neutralización para la proteína en cuestión. Tal es el caso, que en sueros que provenían de una infección G1 y que presentaban una seroconversión sólo con la cepa homóloga, en algunos a pesar de haberse detectado anticuerpos neutralizantes contra la VP7-G1, no se detectaron anticuerpos específicos de epitopes y viceversa; situación que nos hace pensar que posiblemente, estas contradicciones en los resultados se deben más bien, a las diferencias en cuanto a la sensibilidad de detección de los métodos de estudio, pues mientras que en un ensayo de ELISA, las cantidades de muestra problema que se requieren para dar una señal positiva, están en el orden de los nanogramos, en los ensayos de neutralización, no sabemos la cantidad exacta de anticuerpos que se requieren, para ver el efecto de neutralización de muchos virus, y que estos no puedan infectar a una célula.

CONCLUSIONES

1. En el brote epidémico de rotaviurs 1994-1995, existió un 46% de gastroenteritis viral, siendo los niños menores de 1 año (72%), durante los meses Diciembre-Enero los más afectados.
2. Las características antigénicas de las cepas virales predominantes durante el brote 1994-1995, resultaron ser G1,P1A y G3,P1A.
3. La aparición de cepas de rotavirus con serotipo G1,P1A fué el factor determinante, para la alta frecuencia de casos con gastroenteritis, en el brote 1994-1995.
4. Existe variabilidad de epitopes en VP4, de cepas de rotavirus humanas obtenidas de campo.
5. Se detectó la presencia del epitope 1A10 en las proteínas VP4, en dos brotes epidémicos consecutivos de una misma región geográfica.
6. En una respuesta inmune primaria, existe homogeneidad y heterogeneidad de anticuerpos neutralizantes hacia cepas de rotavirus con diferente serotipo.
7. Infecciones con serotipo G1,P1A dejan protección, contra cepas virales con serotipos G1,P1A; G3,P1A y G4,P2.
8. Infecciones con serotipo G3,P1A dejan protección, contra cepas virales con serotipos G1,P1A; G2,P1A; G3,P1A y G4,P2.
9. En una respuesta homóloga, los anticuerpos neutralizantes van dirigidos contra las proteínas VP7 y VP4 de la cepa homóloga.

- 10.** En una respuesta heteróloga, los anticuerpos neutralizantes principalmente se encuentran dirigidos, contra la proteína VP4 de la cepa heteróloga.

- 11.** El epítopo 4F8 presente en la proteína VP7 con serotipo G3, fue el inmunodominante tanto en sueros con una respuesta homóloga, como heteróloga.

- 12.** El epítopo 1A10 y 1E4 presente en la proteína VP4 con serotipo P1A, fue el inmunodominante tanto en sueros con una respuesta homóloga, como heteróloga.

- 13.** En una respuesta inmune primaria contra rotavirus, existe una respuesta tanto homotípica como heterotípica hacia diferentes serotipos G_i y la VP4 con epítopos 1A10 y 1E4, son los responsables en su mayoría, de la reacción cruzada para estos serotipos.

BIBLIOGRAFIA

- Albert, M.J., L.E. Unicomb, and R.F. Bishop.** 1987. Cultivation and characterization of human rotaviruses with "super short" RNA patterns. *J. Clin. Microbiol.* 25: 183-185.
- Albert, M.J., L.E. Unicomb, G.L. Barnes, and R.F. Bishop.** 1987. Cultivation and characterization of rotavirus strains infecting newborn babies in Melbourne, Australia, from 1975 to 1979. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1635-1640.
- Anderson, E.L., R. Belshe, J. Bartram, F. Crookshanks-Newman, R.M. Chanock, and A.Z. Kapikian.** 1986. Evaluation of rhesus rotavirus vaccine (MMU 18006) in infants and young children. *J. Infect. Dis.* 153: 823-831.
- Arias, C.F., M. Lizano and S. López.** 1987. Synthesis de Escherichia coli and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* 68: 633-642.
- Arias, C.F., S. López, J.D.P. Mascarenhar, P. Romero, P. Cano, Y.B. Gabbay, R.B. de Freitas, and A.C. Linhares.** 1994. Neutralizing antibody immune response in children with primary and secondary rotavirus infections. *J. Clin. Microbiology* (Artículo enviado).
- Beards, G.M., A.D. Campbell, N.R. Cottrell, J.S.M. Peiris, N. Rees, R.C. Sanders, J.A. Shirley, H.C. Wood, and T.H. Flewett.** 1984. Enzyme-linked immunoabsorbent assay based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. *J. Clin. Microbiol.* 19: 248-254.
- Beards, G., L. Xu, U. Ballard, U. Desselberger, and M.A. McCrae.** 1992. A serotype 10 human rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1432-1435.
- Bernstein, D.I., V.E. Smith, D.S. Sander, K.A. Pax, G.M. Schiff, and R.L. Ward.** 1990. Evaluation of WC3 rotavirus vaccine and correlates of protection in healthy infants. *J. Infect. Dis.* 162: 1055-1062.
- Bishop, R.F., G.P. Davidson, I.H. Holmes, and B.J. Ruck.** 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* ii: 1281-1283.
- Bishop, R.F.** 1986. Epidemiology of diarrhoeal disease caused by rotavirus. In: Holmgren J., A. Lindberg, R. Mollby eds. *Development of vaccines and drugs against diarrhoea.* England: Chartwell Bratt. pp: 158-170.

- Bishop, R.F.** 1994. Natural history of human rotavirus infections. In: Kapikian, A. Viral infections of the gastrointestinal tract. Marcel Dekker. New York. Basel. Hong Kong. pp: 131-165.
- Both, G.W., A.R. Bellamy, and D.B. Mitchell.** 1994. Rotavirus Protein Structure and Function. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 185: 68-127.
- Brüssow, H., P.A. Offit, and J. Sidoti.** 1991. Neutralizing antibodies to heterologous animal rotavirus serotypes 5, 6, 7, and 10 in sera from ecuadorian children. *J. Clin. Microbiol.* 29: 869-873.
- Brüssow, H., G. Gerna, J. Sidoti, and A. Sarasini.** 1992. Neutralizing serum antibodies to serotype 6 human rotaviruses PA151 and PA169 in ecuadorian and german children. *J. Clin. Microbiol.* 30: 911-914.
- Champsaur, H., E. Questiaux, J. Prevot, M. Henry-Amar, D. Golszmidt, M. Bourjouane, and C. Bach.** 1984. Rotavirus carriage, asymptomatic infection, and disease in the first two years of life. I. Virus shedding. *J. Infect. Dis.* 149: 667-674.
- Christensen, M.L.** 1989. Human viral gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 51-89.
- Clark, H.F., T. Furukawa, L.M. Bell, P.A. Offit, P.A. Perrella, and S.A. Plotkin.** 1986. Immune response of infants and children to low-passage bovine rotavirus (strain WC3). *Am. J. Vet. Res.* 140: 350-356.
- Clark, H.F., Y. Hoshino, L.M. Bell, J. Groff, G. Hess, P. Bachman, and P.A. Offit.** 1987. Rotavirus isolate W161 representing a presumptive new human serotype. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1757-1762.
- Contreras, J.F., G.E. Menchaca, L. Padilla-Noriega, R.S. Tamez, H.B. Greenberg, S. López and C.F. Arias.** 1995. Heterogeneity of VP4 neutralization epitopes among serotype P1A human rotavirus strains. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2: 506-508.
- Coulson, B.S.** 1987. Simple and Specific Enzyme Immunoassay Using Monoclonal Antibodies for Serotyping Human Rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 25: 509-515.
- Coulson, B.S.** 1993. Typing of human rotavirus VP4 by an enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1-8.
- Das, B.K., J.R. Gentsch, H.G. Cicirello, P.A. Woods, A. Gupta, M. Ramachandran, R. Kumar, M.K. Bhan, and R.I. Glass.** 1994. Characterization of Rotavirus Strains from Newborns in New Delhi, India. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1820-1822.

- Davidson, G.P., and G.L. Barnes.** 1979. Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis. *Acta Paediatr. Scand.* 68: 181-186.
- Davidson, G.P., R.J. Hogg, and C.P. Kirubakaran.** 1983. Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect. Immun.* 40: 447-452.
- Do Carmo, M., S.T. Timenetsky, N. Santos, and V. Gouvea.** 1994. Survey of Rotavirus G and P Types Associated with Human Gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J. clin. Microbiol.* 32: 2622-2624.
- Estes, M.K. and J. Cohen.** 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 53: 410-449.
- Fields, B.N.** 1990. *Virology*. Second edition. D.M. Knipe et al Raven Press, Ltd. pp: 1378-1381.
- Flores, J., K. Midthun, Y. Hoshino, K. Green, M. Gorziglia, A. Kapikian and R.M. Chanock.** 1986. Conservation of the fourth gene among rotaviruses recovered from asymptomatic newborn infants and its possible role in attenuation. *J. Virol.* 60: 972-979.
- Flores, J., J. Sears, K.Y. Green, Y. Perez-Schael, A. Morantes, G. Daoud, M. Gorziglia, Y. Hoshino, R.M. Chanock, and A.Z. Kapikian.** Genetic stability of rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infections. *J. Virol.* 62: 4778-4782.
- Flores, J., K. Taniguchi, K. Green, Y. Perez-Schael, D. García, J. Sears, S. Urasawa, and A.Z. Kapikian.** 1988. Relative frequencies of rotavirus serotypes 1, 2, 3 and 4 venezuelan infants with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 26:2092-2095.
- Flores, J., I. Perez-Schael, M. Blanco, A.M. Rojas, E. Alfonzo, Y. Crespo, W. Cunto, A.L. Pittman, and A.Z. Kapikian.** 1993. Reactogenicity and Immunogenicity of a High-Titer Rhesus Rotavirus-Based Quadrivalent Rotavirus Vaccine. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2439-2445.
- Gerna, G., A. Sarasini, A. Di Matteo, L. Zentilin, P. Miranda, M. Parea, F. Baldanti, S. Arista, G. Milanese, and M. Battaglia.** 1990. Serotype 3 human rotavirus strain with subgroup I specificity. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1342-1347.
- Gerna, G., J. Sears, Y. Hoshino, A. Duncan Steele, O. Nakagomi, A. Sarasini, and J. Flores.** 1994. Identification of a New VP4 serotype of human rotavirus. *Virology.* 200: 66-71.

Gorziglia, M., G. Larralde, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock. 1990. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 7155-7159.

Gouvea, V., L. De Castro, M. Do Carmo Timenetsky, H. Greenberg, and N. Santos. 1994. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1408-1409.

Greenberg, H.B., J. Valdesuso, K. van Wyke, K. Midthun, M. Walsh, V. McAuliffe, R.G. Wyatt, A.R. Kalica, J. Flores, and Y. Hoshino. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47: 267-275.

Grimwood, K., J.C.S. Lund, B.S. Coulson, I.L. Hudson, R.F. Bishop, and G.L. Barnes. 1988. Comparison of Serum and Mucosal Antibody Responses Following Severe Acute Rotavirus Gastroenteritis in Young Children. *J. Clin. Microbiology.* 26: 732-738.

Heath, R., C. Birch, and I. Gust. 1986. Antigenic analysis of rotavirus isolates using monoclonal antibodies specific for human serotypes 1, 2, 3, and 4, and SA11. *J. Gen. Virol.* 67: 2455-2466.

Hjelt, K., P.C. Grauballe, P.O. Schiøtz, L. Andersen, and P.A. Krasilnikoff. 1985. Intestinal and serum immune response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4: 60-66.

Hoshino, Y., R.G. Wyatt, H.B. Greenberg, J. Flores, and A.Z. Kapikian. 1984. Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J. Infect. Dis.* 149: 694-702.

Hoshino, Y., m.M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock. 1985. Independent Segregation of Two antigenic Specificities (VP3 and VP7) Involved in Neutralization of Rotaviruses Infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8701-8704.

Hoshino, Y., M.M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, R.M. Chanock, and A. Z. Kapikian. 1987. Analysis by plaque reduction neutralization assay of intertypic rotaviruses suggests that reassortment occurs in vivo. *J. Clin. Microbiol.* 25: 290-294.

Hoshino, Y., L.J. Saif, M.M. Sereno, R.M. Chanock, and A.Z. Kapikian. 1988. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J. Virol.* 62: 744-748.

- Hoshino, Y., K. Nishikawa, D.A. Benfield, and M. Gorziglia.** 1994. Mapping of antigenic sites involved in serotype-cross-reactive neutralization on group A rotavirus outer capsid glycoprotein VP7. *Virology*. 199: 233-237.
- Hoshino, Y. and A.Z. Kapikian.** 1994. Rotavirus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infants and young children. *Trends in Microbiology*. 2: 242-249.
- Isa, P. and R. Snodgrass.** 1994. Serological and genomic characterization of equine rotavirus VP4 proteins identifies three different P serotypes. *Virology*. 201: 364-372.
- Kalica, A.R., H.B. Greenberg, R.G. Wyatt, J. Flores, M.M. Sereno, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock.** 1981. Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology*. 112: 385-390.
- Kapikian, A.Z., J. Flores, Y. Hoshino, R.I. Glass, K. Midthun, M. Gorziglia and R.M. Chanock.** 1986. Rotavirus: the major etiologic agent of severe infantile diarrhea may be controllable by a "Jennerian" approach to vaccination. *J. Infect. Dis.* 153: 815-822.
- Kapikian, A.Z., and R.M. Chanock.** 1990. Rotaviruses, p. 1353-1404. In B.N. Fields, D.M. Knipe, R.M. Chanock, M.S. Hirsch, J.L. Melnick, T.P. Monath, and B. Roizman. *Virology*. Raven Oress, New York.
- Le Baron, C.W., J. Lew, R.I. Glass, J.M. Weber, G.M. Ruiz-Palacios.** 1990. Rotavirus Study Group. Annual rotavirus epidemic patterns in North America. *JAMA*. 264: 983-988.
- Matson, D.O., M.L. O'ryan, L.K. Pickering, S.Chiba, S. Nakata, P.Raj and M.K. Estes.** 1992. Characterization of serum antibody responses to natural rotavirus infections in children by VP7-sepecific epitope-blocking assays. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1056-1061.
- Matsui, S.M., E.R. Mackow and H.B. Greenberg.** 1989. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.* 36: 181-214.
- Nakagomi, O., A. Ohshima, Y. Aboudy, I. Shif, M. Mochizuki, T. Nakagomi, and T. Gottlieb-Stematsky.** 1990. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotavirus of feline and canine origin. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1198-1203.
- Offit, P.A., R.D. Shaw, and H.B. Greenberg.** 1986. Passive Protection against Rotavirus-Induced Diarrhea by Monoclonal Antibodies to Superficie Proteins VP3 and VP7. *J. Virol.* 58: 700-703.

- Offit, P.A., H.F. Clark, G. Blavat, and H.B. Greenberg.** 1986. Reassortant rotavirus containing structural proteins VP3 and VP7 from different parents induce antibodies protective against each parenteral serotype. *J. Virol.* 60: 491-496.
- Padilla-Noriega, L., C.F. Arias, S. López, F. Puerto, D.R. Snodgrass, K. Taniguchi and H. Greenberg.** 1990. Diversity of rotavirus serotypes in Mexican infants with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1114-1119.
- Padilla-Noriega, L., R. Werner-Eckert, E.R. Mackow, M. Gorziglia, G. Larralde, K. Taniguchi and H.B. Greenberg.** 1993. Serological analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31: 622-628.
- Raj, P., D.O. Matson, B.S. Coulson, R.F. Bishop, K. Taniguchi, S. Urasawa, H.B. Greenberg, and M.K. Estes.** 1992. Comparisons of rotavirus VP7-typing monoclonal antibodies by competition binding assay. *J. Clin. Microbiol.* 30: 704-711.
- Riepenhoff-Talty, M., S. Bogger-Goren, P. Li, P.J. Carmodoy, H.J. Barrett, and P.L. Ogra.** 1981. Development of serum and intestinal antibody response to rotavirus after naturally acquired rotavirus infection in man. *J. Med. Virol.* 8: 215-222.
- Shaw, R.D., P.T. Vo, P.A. Offit, B.S. Coulson, and H.B. Greenberg.** 1986. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology.* 155: 434-451.
- Shaw, R.D., K.J. Fong, and G.A. Losonsky.** 1987. Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. *Gastroenterology.* 93: 941-950.
- Silverstein, I., L.M. Shulman, E. Mendelson, and Y. Shif.** 1995. Distribution of Both VP4 Genotypes and VP7 Serotypes among Hospitalized and Nonhospitalized Israeli Children. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1421-1422.
- Snodgrass, D.R., and P.W. Wells.** 1978. Passive immunity in rotaviral infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 565-568.
- Steele, A.D., M.C. Van Niekerk, and M.J. Mphahlele.** 1995. Geographic Distribution of Human Rotavirus VP4 Genotypes and VP7 Serotypes in Five African Regions. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1516-1519.
- Taniguchi, K., Y. Morita, T. Urasawa, and S. Urasawa.** 1987. Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Virol.* 61: 1726-1730.

Taniguchi, K., W.L. Maloy, K. Nishikawa, K.Y. Green, Y. Hoshino, S. Urasawa, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock and M. Gorziglia. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. J. Virol. 62: 2421-2426.

Vesikari, T., E. Isolauri, A. Delem, et al. 1983. Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children. Lancet ii: 807-811.

Unicomb, L.E., B.S. Coulson, and R.F. Bishop. 1989. Experience with an enzyme immunoassay for serotyping human group A rotaviruses. J. Clin. Microbiol. 27: 586-588.

Urasawa, S., T. Urasawa, K. Taniguchi, F. Wakasugi, N. Kobayashi, S. Chiba, N. Sakurada, M. Morita, O. Morita, M. Tokieda, H. Kawamoto, Y. Minekawa, and M. Ohseto. 1989. Survey of human rotavirus serotypes in different locales in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. J. Infect. Dis. 160: 44-51.

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

Ward, R.L., D.R. Knowlton, G.M. Schiff, Y. Hoshino, and H.B. Greenberg. 1988. Relative concentration of serum neutralizing antibody to VP3 and VP7 proteins in adults infects with a human rotavirus. J. Virol. 62: 1543-1549.

Zheng, B., S. Han, Y. Yan, X. Liang, G. Ma, Y. Yang, and M.H. Ng. 1988. Development of neutralizing antibodies and group A common antibodies against natural infections with human rotavirus. J. Clin. Microbiol. 26: 1506-1512.

