

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**VARIABILIDAD DE ELECTROFEROTIPOS Y SEROTIPOS G y P DE ROTAVIRUS
EN CASOS DE GASTROENTERITIS INFANTIL**

TESIS

**QUE EN OPCION A TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA**

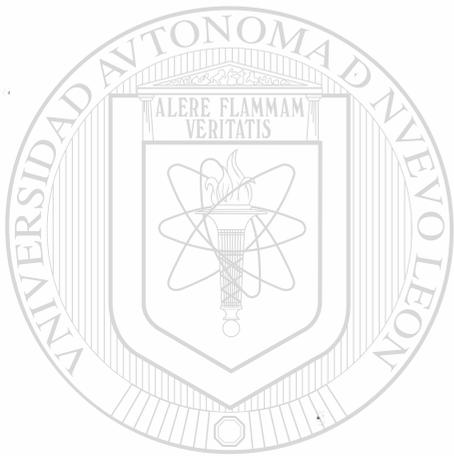
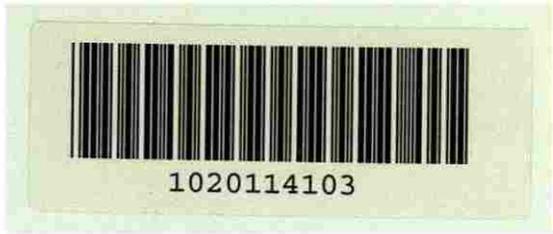
PRESENTA

Q.B.P. JUAN FCO CONTRERAS CORDERO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

MARZO DE 1995

FM
25 3 20
FCB
1985
C6



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



VARIABILIDAD DE ELECTROFEROTIPOS Y SEROTIPOS G y P DE ROTAVIRUS EN
CASOS DE GASTROENTERITIS INFANTIL

TESIS

QUE EN OPCION A TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

PRESENTA

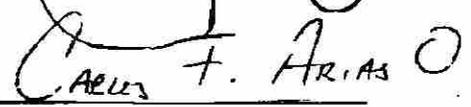
Q.B.P. JUAN FCO CONTRERAS CORDERO

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECTOR


DR. REYES SILVESTRE TAMEZ GUERRA

CODIRECTOR


DR. CARLOS F. ARIAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

MARZO DE 1995

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**VARIABILIDAD DE ELECTROFEROTIPOS Y SEROTIPOS G y P DE ROTAVIRUS EN
CASOS DE GASTROENTERITIS INFANTIL**

TESIS

**QUE EN OPCION A TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA**

PRESENTA

Q.B.P. JUAN FCO CONTRERAS CORDERO

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE

Dr. REYES S. TAMEZ GUERRA

SECRETARIO

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

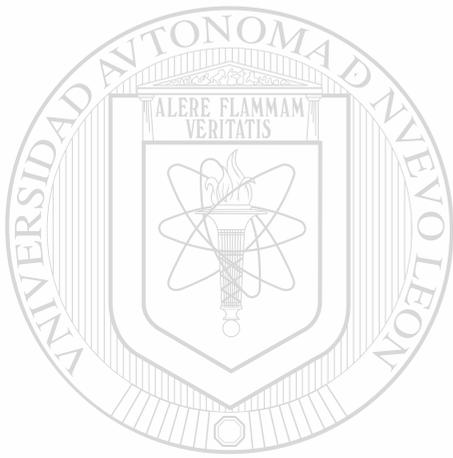
Dra. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

VOCAL

Dra. LAURA MARÍA TREJO AVILA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

MARZO DE 1995

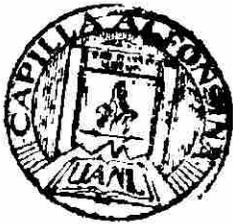


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO TESIS

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a:

MIS PADRES:

**SR. NICOLÁS CONTRERAS GODINA
SRA. JUANA CORDERO DE CONTRERAS**

Porque además de darme la vida me enseñaron a enfrentar los retos.

MI ESPOSA:

TERESA DE JESUS ARAIZ DE CONTRERAS

Por su apoyo constante para seguir adelante.

MIS HERMANOS:

**GABRIEL , JOSÉ HERIBERTO, JULIO, JESÚS, GUADALUPE, MARÍA
LETICIA Y MARTHA ELVA.**

Por el gran cariño que nos tenemos.

A MI HIJA:

LUZ ANGELICA CONTRERAS ARAIZ

Por que es mi hija y de eso estoy feliz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, U.A.N.L. por brindarme la oportunidad de mejorar mi formación académica.

Agradezco al LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA por la gran oportunidad que me dió en desarrollarme en el área de la Inmunología y Virología.

Agradezco al Dr. REYES S. TAMÉZ GUERRA maestro y amigo, por sus valiosos comentarios en la realización del presente trabajo.

Agradezco a la Dra. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA por sus valiosos comentarios en la realización de esta tesis.

Agradezco a la Dra. LAURA TREJO AVILA por sus valiosas sugerencias en la revisión de mi tesis.

Agradezco al DR. CARLOS F. ARIAS. por su gran disposición y valiosa asesoría en el desarrollo de esta investigación.

Agradezco al INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL por su gran disponibilidad en la toma de muestras para la realización del presente estudio.

Agradezco a todos mis COMPAÑEROS Y AMIGOS del LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y VIROLOGIA por su apoyo en la realización de este estudio.

Agradezco a la Q.B.P. GRISELDA EDITH MENCHACA RODRIGUEZ mi gran amiga, por su valiosa colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Y MUY ESPECIALMENTE

Agradezco a mi familia, ESPOSA, HIJA, PADRES Y HERMANOS por que cada uno de ellos a su manera me apoyaron en gran medida para continuar mi carrera.

INDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	15
OBJETIVOS	16
MATERIAL Y METODO	17
Muestras	17
Virus de referencia	17
Anticuerpos monoclonales	18
Propagación en cultivo celular	18
Extracción de RNA viral	19
Elisa	20
Diagrama de flujo	27
RESULTADOS	28
Población de estudio	28
Electroferotipos (sintomáticos)	29
Electroferotipos (asintomáticos)	35
Neonatos	38
Serotipos VP7	39
Epidemiología de serotipos G	41
Subgrupos	43
Variabilidad de VP4	45
Correlación entre electroferotipo, serotipo y subgrupo	49
DISCUSION	51
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

No. 1 Representación esquemática de la partícula de rotavirus	9
No. 2 Características estructurales y antigénicas de VP4	14
No. 3 Esquema de trabajo en la determinación de serotipos G	23
No. 4 Esquema de trabajo en la determinación de serotipos P	25
No. 5 Diagrama de flujo	28
No. 6 Prevalencia de rotavirus en niños con gastroenteritis	30
No. 7 Analisis por electroforesis de rotavirus en casos sintomáticos	31
No. 8 Variabilidad de electroferotipos y frecuencia de aparición detectados en el período de Julio a Octubre de 1993	32
No. 9 Variabilidad de electroferotipos y frecuencia de aparición detectados de Noviembre de 1993 a Enero de 1994	33
No.10 Comparación de los electroferotipos con variaciones en la migración de los segmentos 7, 8 y 9	35
No.11 Prevalencia de rotavirus en casos asintomáticos	36
No.12 Electroforesis de rotavirus aislado de niños sin diarrea	37
No.13 Variabilidad de electroferotipos de rotavirus aislado de casos asintomáticos	38
No.14 Prevalencia de rotavirus en neonatos sin gastroenteritis	39
No.15 Frecuencia de rotavirus detectados por ELISA	40
No.16 Frecuencia de aparición de serotipos G en muestras diarreicas	43
No.17 Frecuencia de epitopes relacionados a VP4	47

LISTA DE TABLAS

No. 1	Rango de hospedero de serotipos G de rotavirus grupo A	10
No. 2	Especificidades antigénicas de las proteínas estructurales	11
No. 3	Clasificación de rotavirus humano grupo A	12
No. 4	Regiones divergentes de aminoácidos encontradas en serotipos G	13
No. 5	Cepas de rotavirus usadas como referencia en la determinación de serotipos G y P	15
No. 6	Anticuerpos monoclonales y diluciones de trabajo en la determinación de serotipo G	22
No. 7	Anticuerpos monoclonales y diluciones de trabajo en la determinación de serotipos P	24
No. 8	Población estudiada en la detección de rotavirus	29
No. 9	Modelo de reactividad por ELISA de anticuerpos monoclonales específicos de serotipos G	41
No. 10	Modelo de reactividad por ELISA de anticuerpos monoclonales específicos de subgrupo	44
No. 11	Especificidad de subgrupo y serotipo G	45
No. 12	Modelo de reactividad por ELISA de anticuerpos monoclonales contra la proteína VP4	46
No. 13	Heterogeneidad de epitopes en cepas de rotavirus humanos	48
No. 14	reactividad del anticuerpo monoclonal YO2C2	49
No. 15	Electroferotipos con variación en los segmentos 7, 8 o 9, serotipo y subgrupo de cepas de rotavirus aisladas de casos de gastroenteritis	50

RESUMEN

Se realizó un estudio epidemiológico molecular de rotavirus en infantes menores de 2 años con y sin gastroenteritis, en el área metropolitana de Monterrey, N.L., México; con el objetivo de determinar la variabilidad tanto de los modelos de migración de los segmentos genicos de rotavirus, así como la variabilidad de los determinantes antigénicos de las proteínas que definen el subgrupo y serotipos G y P de rotavirus. Para lograr lo anterior, se colectaron heces fecales durante el período de Julio de 1993 a Marzo de 1994 (sintomáticos), y de Febrero de 1994 a Febrero de 1995 (asintomáticos).

Los análisis por electroforesis en un sistema continuo en geles de poliacrilamida de las muestras fecales, mostraron el modelo de migración clásico de los segmentos genicos de rotavirus en las dos poblaciones estudiadas. Donde 140 (30%) fueron aislados de los casos sintomáticos, y 55 (7%) de los infantes sin diarrea. Asimismo, estos análisis demostraron la presencia de 21 electroferotipos (14 sintomáticos; 7 asintomáticos), donde se incluían 3 cepas de rotavirus distintas a los que pertenecen al grupo A, presentándose la variabilidad de migración de estos electroferotipos en casi todos los segmentos.

De las 140 cepas aisladas de los casos sintomáticos, 118 (84%) reaccionaron con el anticuerpo 129, cuya reactividad indica la presencia de rotavirus grupo A. Posteriormente, estas cepas, se caracterizaron utilizando un panel de anticuerpos monoclonales específicos de serotipo G, P y subgrupo (SG). Los resultados indicaron que 4 cepas de rotavirus fueron serotipo G1, SGII; 112 cepas fueron serotipo G3, SGII; 1 cepa fue serotipo G3, SGI; y ninguna serotipo G4.

Asimismo, 58 cepas representando los diferentes electroferotipos detectados fueron elegidos para la determinación tanto el serotipo P, como la variabilidad de epítopes de neutralización presente en la proteína VP4. De esas, 48 (83%) reaccionaron con el anticuerpo monoclonal 1A10 específico de serotipo P1A. Ninguna de las cepas reaccionaron con los anticuerpos monoclonales utilizados específicos de serotipo P2. Además, no todos los rotavirus que reaccionaron con el anticuerpo 1A10 fueron reconocidos por los anticuerpos monoclonales 2A3 y 2G1 los cuales también reconocen cepas P1A. Indicando heterogeneidad de los epítopes de neutralización entre los serotipos P1A de los rotavirus humanos.

De esta manera, se concluye que dentro de las cepas que circularon en el período de estudio, existió variabilidad tanto a nivel genómico, como en las proteínas de superficie. Como lo indican los diferentes electroferotipos encontrados; los serotipos G detectados; así como la heterogeneidad de los epítopes de neutralización presentes en la proteína VP4.

INTRODUCCION

Los rotavirus miembros de la familia *Reoviridae*, son los agentes infecciosos más importantes de la gastroenteritis infantil, los cuales están implicados en una extrema morbilidad y representan una de las principales causas de muerte, de los países en desarrollo (Walsh y col., 1979; Snyder y col., 1982; Kapikian y col., in Field, 1990).

Estos virus, están compuestos de RNA de doble cadena arreglado en 11 segmentos, los cuales son rodeados por una cubierta de proteínas que conforman una doble cápside icosaédrica (Rodger y col., 1976; Elias, 1977; Prasad y col., 1990).

Desde su descubrimiento por Bishop en 1973, los rotavirus han causado millones de muertes entre la población infantil, y aunque los esfuerzos en prevenir la infección por este virus incluyen el mejoramiento de los servicios públicos; la frecuencia de infección se mantiene en la misma magnitud tanto en países en desarrollo como desarrollados, lo que indica que otros factores pudieran estar involucrados en la diseminación del virus entre la población más susceptible: los niños menores de 4 años (Bern y col., 1992).

Por tal motivo, diferentes grupos de investigadores están involucrados en la producción de una vacuna efectiva que prevenga esta enfermedad. Los pasos iniciales en la elaboración de dicho biológico han incluido, además de la determinación de las diferencias genéticas, el conocimiento de las variaciones en las proteínas de superficie que están involucradas en la neutralización del virus (Edelman, R. 1987; Matsui y col., 1989).

Con respecto a lo anterior, se ha demostrado que los 11 segmentos génicos de rotavirus codifican para un número igual de proteínas, tanto estructurales como no estructurales (figura 1). De éstas, muchos anticuerpos se han producido para 3 de las principales proteínas estructurales utilizadas en la clasificación de rotavirus: las proteínas de superficie **VP4** y **VP7**; así como la proteína de la cápside interna **VP6** (Ward y col., 1991; Hoshino y col., 1994; Isa y Snodgrass, 1994).

La obtención de anticuerpos tanto de tipo policlonal como monoclonal que detectan determinantes antigénicos de estas proteínas, ha permitido demostrar que gran cantidad de rotavirus circulan entre la población humana y animal, y que muchos de ellos son capaces de traspasar las barreras entre las especies (Woode y col., 1976; Woode y col., 1978 Wyatt y col 1978). De esta manera, a la fecha se ha detectado la presencia de 7 Grupos de rotavirus denominados con las letras A-G, los cuales se identifican por anticuerpos específicos que reconocen epítopes, que se comparten entre rotavirus de un mismo grupo (Dunn y col., 1993; Lindsay y col., 1994; Pedley y col., 1983). De éstos, los denominados A, B y C, presentan miembros que afectan tanto al hombre como a diferentes especies animales, correspondiendo ser al grupo A el principal responsable de gastroenteritis en infantes; mientras que los 4 grupos restantes (D, E, F, G), solamente se han detectado en animales (Estes, *in Field*, 1990; Hoshino and Kapikian, 1994).

Asimismo, siendo el grupo A el más importante en causar gastroenteritis infantil, su clasificación también se determina en subgrupos y serotipos. La definición de subgrupo, se realiza en base a epítopes presentes en la proteína VP6, y aunque solamente 2 subgrupos se han detectado a la fecha (SGI y SGII), en ocasiones se aíslan rotavirus ya sea que presenten los dos epítopes de subgrupo, o inclusive que no los presenten, por tal motivo, en base a lo anterior, actualmente se acepta la presencia de cuatro subgrupos definidos como: SGI, SGII, SGI y II, sin SGI ni SGII (Kalika y col., 1981; Greenberg y col., 1983; Hoshino and Kapikian, 1994).

Desde el punto de vista epidemiológico, la identificación de serotipos de rotavirus grupo A circulantes entre la población infectada, es uno de los puntos más importantes a considerar en la búsqueda de una biológico efectivo, que prevenga la gastroenteritis rotaviral, y es aquí donde cobra importancia la determinación no sólo de las dos proteínas de superficie que conforman al virus, sino que además, es de gran valor determinar la diversidad y variación de los epítopes que conforman estas proteínas, ya que son precisamente estos determinantes antigénicos, los que van a inducir una respuesta tanto de tipo celular como humoral que a la postre, son las que pudieran controlar y eliminar al virus del organismo infectado.

De estas dos proteínas, VP7 es la mejor estudiada y por lo tanto la que más se ha utilizado en los estudios epidemiológicos de rotavirus. Esta proteína, sirve de base para la determinación de los serotipos denominados G, nombre que recibe por ser glicosilada. Su localización es en la cápside externa, presenta un peso molecular de 34 KDa, esta formada por 336 aminoácidos y constituye el 30% del contenido protéico del virión, lo que la convierte en la más abundante de la superficie (Ericson y col., 1983; Kabcenell y col., 1985; Hoshino y col., 1985; Maass y Atkinson, 1994).

Esta proteína, ha sido la base principal de múltiples estudios epidemiológicos de rotavirus, ya que la mayoría de los anticuerpos utilizados en dichas investigaciones, van dirigidos especialmente contra esta molécula, con lo cual, se ha podido detectar y determinar la prevalencia de diferentes serotipos en el humano, así como en las diferentes especies animales los cuales infectan .

A la fecha, 14 serotipos G del grupo A se han detectado por prueba de ELISA y neutralización de focos de infección. De estos, los serotipos G1, G2, G8, G9 y G12 se han aislado exclusivamente del humano, G3, G4, G5, G6 y G10 de humanos y animales y G7, G11, 13 y 14 sólo de animales donde G7 es el único serotipo que se ha demostrado infecta a las aves (tabla 3) (Estes y Cohen, 1989; Taniguchi y col, 1990; Browning y col, 1991; Gouvea, y col., 1994;).

La disponibilidad de anticuerpos neutralizantes para los diferentes serotipos G, ha permitido extensos estudios para definir la diversidad y distribución de la proteína VP7 en muchas regiones del mundo incluyendo México, con lo que se ha demostrado que los serotipos G1-G4 son los que más circulan entre la población humana, y que la prevalencia varía de región en región, ya que aunque se encuentren los 4 serotipos en una misma población, siempre existe la predominancia de uno con respecto a los demás (Hoshino y col., 1985; Padilla y col., 1990; Bishop y col., 1991; Woods y col., 1992).

Sin embargo, uno de los puntos cruciales en justificar la producción de una vacuna, estriba en determinar: a) que las cepas de mayor circulación compartan epítopes de reacción cruzada b) que estos epítopes provoquen una buena respuesta de anticuerpos neutralizantes. Situación que para lograr, se requiere conocer lo mejor

posible la diversidad de los serotipos circulante en poblaciones específicas, así como los distintos determinantes antigénicos presentes en estas proteínas, la frecuencia con la que cambian estos epitopes en las cepas de campo y la respuesta de anticuerpos en una infección natural.

En este sentido, se han producido anticuerpos monoclonales para la búsqueda de sitios específicos en la proteína VP7. Estos anticuerpos a la fecha se clasifican en: específicos de monotipo, específicos de serotipo y de reacción cruzada, lo que significa que es posible realizar una diferenciación de los determinantes antigénicos en la búsqueda de un epítipo común entre los serotipos predominantes (*Coulson y col., 1986; Chiba y col., 1986; Taniguchi y col., 1988; Taniguchi y col., 1991*).

Además, la producción de anticuerpos neutralizantes, a permitido seguir estrategias en las cuales se obtienen cepas mutantes que escapan a la neutralización por estos anticuerpos. Estas mutantes, posteriormente se analizan por secuenciación de aminoácidos y se comparan entre los diferentes serotipos para determinar el grado de homología entre ellas.

Los resultados han demostrado la presencia de nueve regiones discretas de aminoácidos que son divergentes entre los distintos serotipos G, pero que a su vez son altamente conservadas entre las cepas de un mismo serotipo. Estas regiones son denominadas **VR1-VR9** (región variable) (tabla 4) (*Green y col., 1987; Green y col., 1988; Green y col. 1989; Hoshino y col., 1994*).

Lo anterior es muy significativo, ya que aunque rotavirus pasa por procesos de rearrreglos entre sus genes, estas regiones se conservan a tal grado que quizá, el número de sitios involucrados en la inducción de anticuerpos neutralizantes es finito.

Con respecto a lo anterior, el mapeo de estas regiones, ha indicado que VR5 la cual se expande desde el residuo 87 al 100, incluye sitios específicos de monotipo, serotipo y reacción cruzada; mientras que VR-7 y VR-8 (aminoácidos 142-152 y 208-221 respectivamente) contienen sitios de neutralización específico de serotipo y monotipo (*Dyall-Smith y col., 1986; Mackow y col., 1988; Taniguchi y col., 1988*).

Por tal motivo, estas investigaciones realizadas por diferentes laboratorios, han demostrado que se pueden producir anticuerpos neutralizantes contra varios serotipos

incluyendo los más importantes desde el punto de vista epidemiológico (G1-G4).

VP4 es la otra proteína de superficie involucrada en la neutralización viral. La importancia que tiene en la penetración del virus a la célula blanco, se debe a su sensibilidad a enzimas proteolíticas, y esta es la razón de que los serotipos determinados por VP4 reciban el nombre de serotipos P (sensible a proteasa).

Esta proteína cuyo peso molecular es de 88 KDd, presenta 775 aminoácidos en la mayoría de las cepas humanas y 776 en las cepas animales (aunque se han encontrado cepas de bovino que presentan una secuencia más corta de 772 residuos de aminoácidos), constituye las proyecciones de la superficie del virión que se aprecian por microscopía electrónica (Kantharidis y col., 1987; Prasad y col. 1988; Lui y col., 1988; Gorziglia y col., 1988).

Se ha demostrado que esta molécula, al igual que VP7, exhibe polimorfismo antigénico, ya que a la fecha, se han descrito 13 diferentes serotipos P en humanos y diferentes especies animales, de los cuales 6 se han definido en las cepas de rotavirus Wa, DS1, 1076, K8, Mc35 y 69M; las cuales han sido recuperadas de heces humanas. Sin embargo, es necesario mencionar que serotipos P encontrados en animales, pueden ser causa de infección en el humano, y que estos serotipos que infectan al humano, al igual que VP7, pueden ser responsables de infecciones tanto sintomáticas como asintomáticas (Hoshino, y col., 1985; Taniguchi, y col., 1988; Gorziglia, y col., 1990; Taniguchi, y col., 1994; Gouvea, y col., 1994).

Ahora bien, ya que actualmente los serotipos definidos por VP4 no han sido bien caracterizados en muestras de campo, principalmente por la falta de anticuerpos específicos neutralizantes que puedan ser utilizados en cepas obtenidas directamente de pacientes con gastroenteritis, es que los primeros esfuerzos en demostrar la distribución de esta proteína, se hicieron determinando la variabilidad del segmento genico 4.

Los reportes iniciales han descrito que los alelos de VP4 relacionados a las cepas Wa (P1A), DS1 (P1B), K8 (P3A), Mc35 (P3B) y 69M (P4) se encuentran presentes en niños aislados de niños con infección sintomática; mientras que M37

(P2A), esta presente en virus recuperados de neonatos con infección asintomática.

Actualmente, la clasificación de VP4 de rotavirus humano, esta dada en grupos genéticos y serotipos, los primeros definidos por análisis de hibridación y secuencia de nucleótidos de los genes cognatos, y son denominados **genotipos VP4** mientras que los serotipos, son definidos por neutralización con antisuero hiperinmune contra VP4 o VP8 (esta última es un producto del corte de VP4 donde se encuentran los determinantes antigenicos más inmunogénicos) y son denominados **serotipos P**. Esta clasificación incluye cepas tanto sintomáticas como asintomáticas (*Lopez y Arias 1987; Gorziglia y col., 1988; Rosen y col., 1994; Sereno y col., 1994; Estes y Cohen, 1989*).

De acuerdo a esta clasificación, los rotavirus del grupo A han sido clasificados en al menos 17 genotipos VP4; donde 8 de ellos han sido encontrados en cepas de rotavirus humanas, de los cuales 6 se han confirmado que representan diferentes tipos antigénicos.

Por otro lado, un total de 13 serotipos P se han establecido: P1A, P1B, P2A, P2B P3A, P3A, P3B y P4-P10, donde seis se han aislado de humanos, 5 asociados con infecciones sintomáticas (P1A, P1B, P3A, P3B y P4) y sólo uno con infecciones asintomáticas (P2A); tres de bovinos (P6, P7 y P8); uno de simio (P5); dos de cerdo (P2B y P9) y uno de ratón (P10) (*Isa and Snodgrass, 1994, Sereno and Gorziglia, 1994*).

Sin embargo, aún y cuando se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre el genotipo y serotipo, esta relación no se extiende a la diversidad de epitopes presentes en los serotipos P, ya que existen cepas con un mismo genotipo y serotipo, pero con variabilidad en sus epitopes de neutralización.

Lo anterior condujo a que al igual que VP7, los estudios con esta proteína (VP4) se centraran primero en el estudio comparativo de secuencias de aminoácidos entre los diferentes serotipos encontrados.

En este respecto, actualmente, se conocen un gran número de secuencias de VP4 que han permitido definir diferentes regiones divergentes. En este sentido, se han encontrado dos regiones hipervariables, una en la subunidad VP8 que se expande en los aminoácidos 71-204 y la otra sobre la subunidad VP5, en la región comprendida

del aminoácido 559-617 donde los virus relacionados antigénicamente, presentan alto grado de homología entre sus proteínas VP4 (figura 2) (*Isa and Snodgrass, 1994*).

Ahora bien, aunque se ha avanzado en el entendimiento de estas dos proteínas (VP4, VP7) que a la fecha han culminado con la determinación de un gran número de serotipos G y P. La distribución de serotipos P en humanos no esta bien documentada, ya que son pocos los estudios de campo que se han realizado.

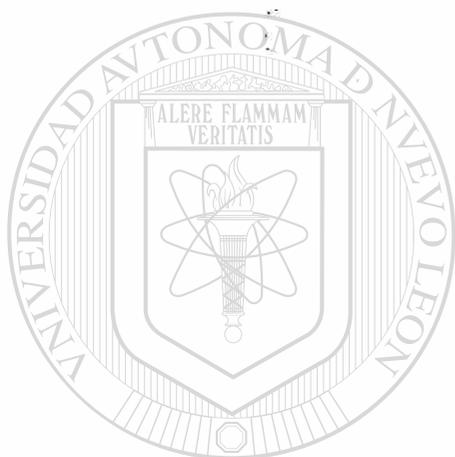
Esto significa que al igual que lo serotipos G es necesario determinar el comportamiento de esta proteína en muestras extraídas directamente de pacientes humanos, de tal manera que estos estudios se realicen para estas dos proteínas, con una misma magnitud, que den conocimiento de la presencia o ausencia de epítopes reconocidos por un anticuerpo monoclonal determinado.

Más aún, la determinación de la frecuencia con la que cambian los epítopes responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes en una infección natural, que a la postre, es lo más importante en el diseño de una estrategia de prevención, que necesariamente tendrá que ser elaborada en la producción de la posible vacuna contra la gastroenteritis rotaviral.

Lo anterior significa, que existe la necesidad de contar con un panel de anticuerpos monoclonales específicos de serotipo, que nos ayuden a identificar aquellos determinantes antigenicos que presentan la característica de evocar una buena respuesta de anticuerpos neutralizantes, y que a su vez sean epítopes de reacción cruzada, los cuales son los mejores candidatos para la inducir una respuesta inmune humoral heterotípica.

Los candidatos para lograr lo anterior, son los anticuerpos neutralizantes producidos contra la proteína VP4, ya que estudios realizados con cepas de rotavirus animales, ha establecido que aunque la reactividad de anticuerpos en suero hiperinmune va dirigida preferentemente contra VP7, quedando enmascarada la reactividad contra VP4, observaciones realizadas después de la coinfección con diferentes serotipos G, ha permitido demostrar una reacción cruzada en la formación de anticuerpos neutralizantes contra la proteína VP4 que comparten esos serotipos.

Lo anterior es muy significativo ya que en esta proteína pueden encontrarse los epitopes de reacción cruzada tan necesarios en la producción de un biológico que prevenga esta enfermedad causante de muchas muertes anuales donde se incluye a nuestra región.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

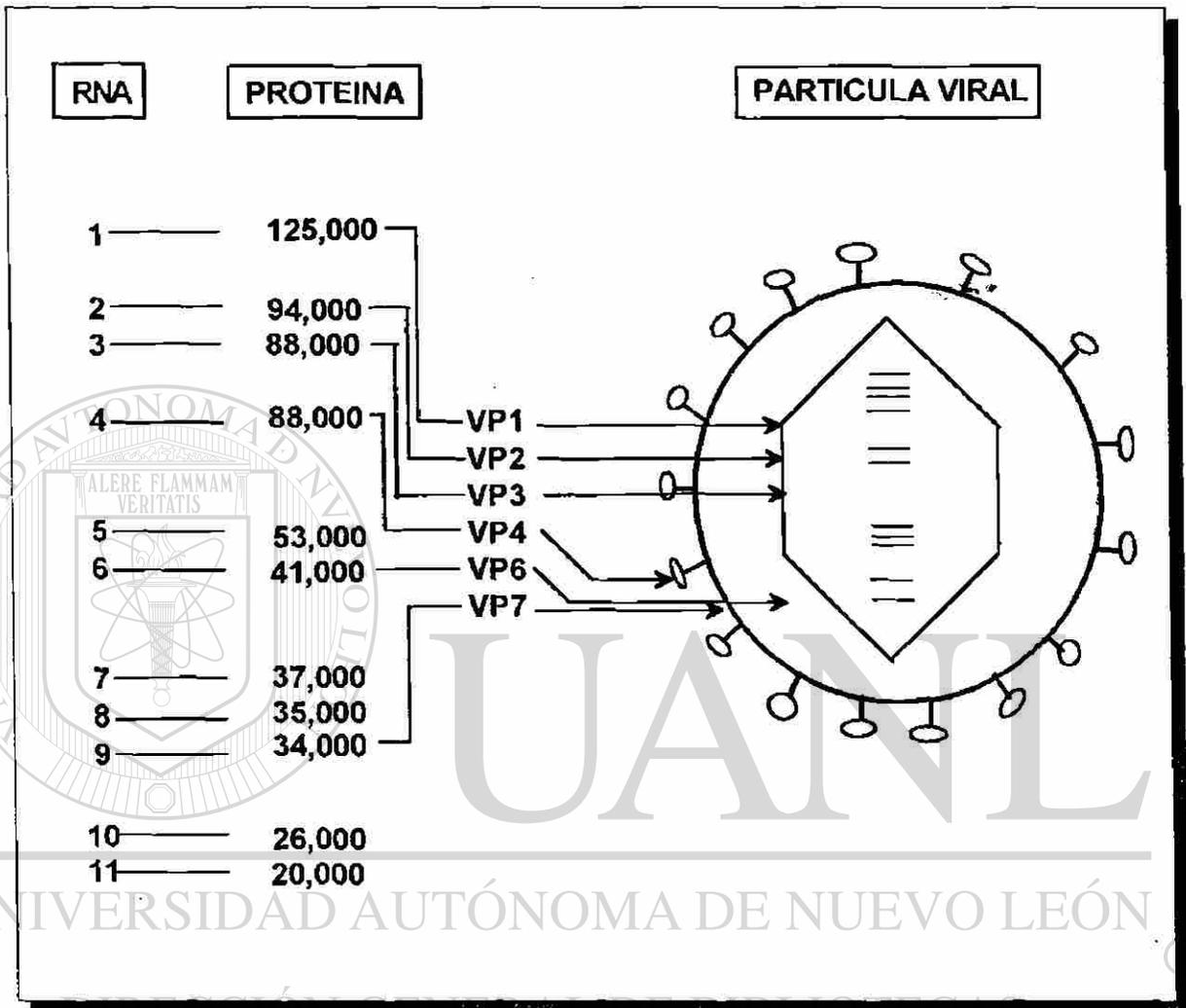
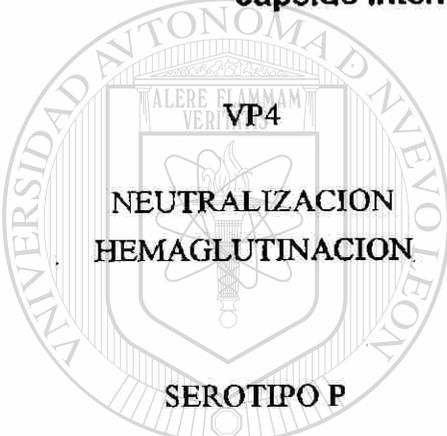


Figura 1: Representación esquemática de la partícula de rotavirus, demostrando los 11 segmentos génicos y las proteínas estructurales.

Tabla 1: Rango de hospedero de serotipos G de rotavirus grupo A

Serotipo	Humano	Simio	Equino	Porcino	Canino	Felino	Murino	Bovino	Aviar
G1	+			+					
G2	+			+					
G3	+	+	+	+	+	+	+		
G4	+			+					
G5	+		+	+					
G6	+							+	
G7	+								+
G8	+							+	
G9	+							+	
G10	+							+	
G11				+					
G12	+								
G13			+	+					
G14				+					

Tabla 2: Especificidades antigénicas de las proteínas estructurales de la cápside interna (VP6) y externa (VP4, VP7) de rotavirus.

 <p>UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN</p> <p>ALERE FLAMMAM VERI</p> <p>VP4</p> <p>NEUTRALIZACION HEMAGLUTINACION</p> <p>SEROTIPO P</p>	VP6	VP7
	GRUPO SUBGRUPO	NEUTRALIZACION
		SEROTIPO G

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 3: Clasificación de rotavirus humano grupo A determinados por neutralización (serotipo G y P) y análisis comparativo de secuencias (genotipo)

CEPA	SEROTIPO		GENOTIPO
	G	P	
Ku, Wa	1	P1A	8
M37	1	P2A	6
K8	1	P3A	9
DS-1, S2, RV5	2	P1B	4
1,076	2	P2A	6
P, Yo, Mo	3	P1A	8
McN13	3	P2A	6
O264, O265, E318, E319	3	P3B	9
AU-1	3	P3A	9
HCR3	3	P5A	3
VA70, Hocht, Hosakawa	4	P1A	8
ST3	4	P2A	6
IAL28	5		
PA151	6	P3A	9
PA169	6	P11	18
69M	8	P4	10
W161	9	P1A	8
Mc35	10	P3B	14
1,321	10	P8	11
L26	12	P1B	4

Tabla 4: Regiones divergentes de aminoácidos encontradas en serotipos G^a



REGION	SECUENCIA (aa)
VR-1	9-20
VR-2	25-32
VR-3	37-53
VR-4	65-76
VR-5	87-100
VR-6	119-132
VR-7	141-150
VR-8	208-224
VR-9	235-242

^a Green y col., 1987; Green y col., 1988; Green y col., 1989;

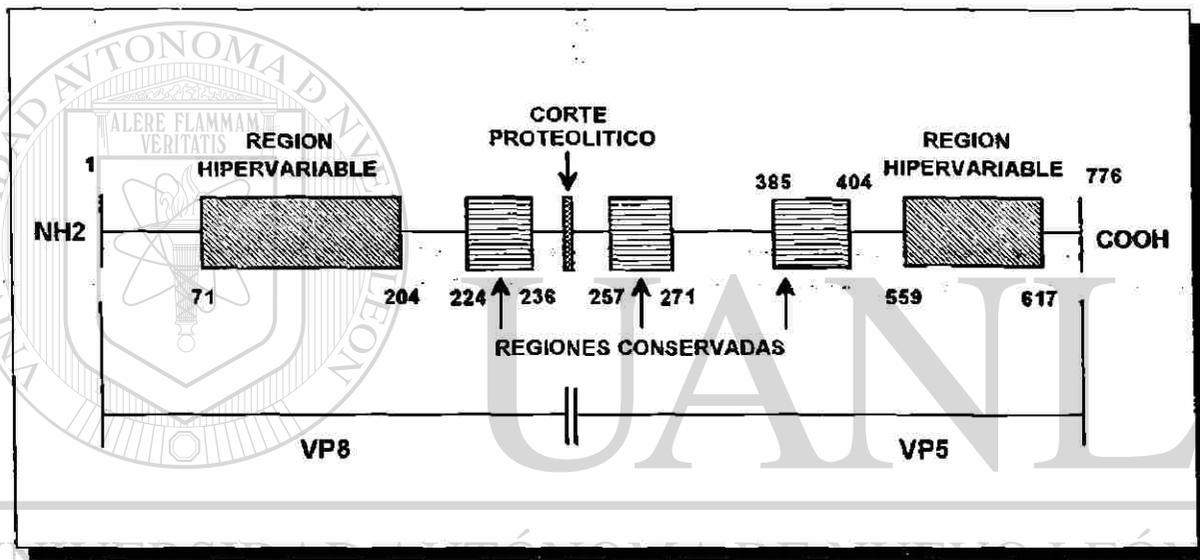
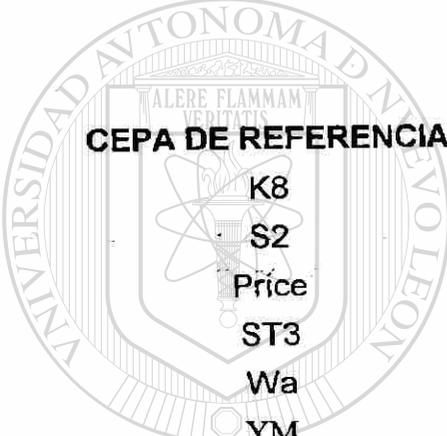


Figura 2: Características estructurales y propiedades antigénicas de la proteína VP4. (ref. Mackow y col.1988; Taniguchi y col., 1988)

Tabla 5: Cepas de rotavirus usadas como referencia en la determinación de serotipos G y P en heces de niños con gastroenteritis en el Estado de N.L, período Julio 1993-Marzo 1994



CEPA DE REFERENCIA	ORIGEN	SEROTIPO	
		G	P
K8	HUMANO	1	P3A
S2	HUMANO	2	P1A
Price	HUMANO	3	P1A
ST3	HUMANO	4	P2A
Wa	HUMANO	1	P1A
YM	CERDO	11	P9

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





HIPOTESIS

SUPONEMOS QUE EXISTE DIVERSIDAD DE ELECTROFEROTIPOS Y SEROTIPOS G Y P DE ROTAVIRUS EN NUESTRA REGION, ASI COMO VARIABILIDAD EN LOS EPITOPES DE NEUTRALIZACION EN LA PROTEINA VP4

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS

CONOCER LA PREVALENCIA DE ROTAVIRUS EN QUE CAUSA INFECCIONES SINTOMATICAS Y ASINTOMATICAS EN EL AREA DE ESTUDIO.

DETERMINAR LA VARIABILIDAD DE ELECTROFEROTIPOS CIRCULANTES EN EL AREA DE ESTUDIO.

DETERMINAR LA VARIABILIDAD DE SEROTIPOS G Y P ENTRE LOS CASOS SINTOMATICOS.

DETERMINAR LA PRESENCIA DE DIFERENTES EPITOPES DE LA PROTEINA VP4 EN LAS CEPAS AISLADAS.

MATERIAL Y METODO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. y en el Laboratorio de Virología del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.

MUESTRAS

Las muestras fecales utilizadas en este estudio, se obtuvieron de niños con o sin síntomas de gastroenteritis, las poblaciones estudiadas correspondieron a niños menores de 2 años con gastroenteritis (sintomáticos) y niños menores de 13 años incluyendo neonatos sin la enfermedad y por tal motivo considerados asintomáticos. Las heces de niños menores de 2 años con y sin gastroenteritis (incluyendo neonatos), fueron proporcionadas por las Clínicas No. 4, 6, 17, 28 del I.M.S.S. y el Hospital 50 de SNTE ubicadas en las localidades de San Nicolás de los Garza, Monterrey y Guadalupe N.L.; mientras que las correspondientes a niños asintomáticos, mayores de 2 años, fueron obtenidas de diversos centros de educación preprimaria y primaria del área metropolitana de Monterrey N.L.. Todas fueron colectadas sin conservador y mantenidas en congelación a -20°C . hasta su uso.

VIRUS DE REFERENCIA

Se utilizó como control en la electroforesis, al rotavirus de simio SA-11, el cual fué propagado en células MA-104.

Los virus de referencia utilizados en la técnica de ELISA para la detección del serotipo VP7 fueron: K8 (serotipo G1), S2 (serotipo G2), Price (serotipo G3) y ST3 (serotipo G4); mientras que para la detección del serotipo P (VP4) correspondieron a

las cepas Wa (serotipo G1, P1A), ST3 (serotipo G4, P2A), Price (serotipo G3, P1A), YM (serotipo G11, serotipo P no detectado) (tabla 5).

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales utilizados en la prueba de ELISA, fueron: KU-4, 2F1, 4F8 y ST-2G7, los cuales son específicos de los serotipos G1, G2, G3 y G4 respectivamente; los anticuerpos 255/60 y 631/9 detectan los subgrupos I y II, mientras que el denominado 129 es común para las cepas de rotavirus grupo A.

Asimismo, con respecto a los serotipos P: IA10, específico para P1A; 2A3 el cual es un anticuerpo con reactividad para el serotipo P1A, pero también reconoce algunas cepas con serotipo P2; 2G1 el cual reacciona con la mayoría de las cepas P1A, P3A y algunas cepas P2; mientras que HS6, HS11 son anticuerpos monoclonales específicos de las cepas asintomáticas con serotipo P2 y HS9 y HS10, los cuales también reconocen las cepas asintomáticas características de P2A. Además; YO2C2 el cual neutraliza los serotipos G1-G4 y es un suero policlonal preparado contra varias cepas con serotipo P.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

PROPAGACION DE ROTAVIRUS SA-11 EN CULTIVO CELULAR

Se activó 1 ml de virus SA-11 con tripsina al 1%, incubándose en baño maría a 37 °C por 30 min.

El virus activado, se añadió a un cultivo de células confluentes MA-104 las cuales fueron previamente lavadas. La suspensión viral se extendió en toda la monocapa e incubó a 37 °C por una hora. Posteriormente, se añadió 20 ml de medio esencial mínimo (MEM) sin suero fetal de ternera, y se incubó a 37 °C toda la noche, al término del cual se observó la destrucción de la integridad de la monocapa celular. Alícuotas de este lisado se sometieron a una electroforesis para la determinación del

modelo de migración de los segmentos génicos y posteriormente se utilizó como virus control en la electroforesis.

EXTRACCION DE RNA VIRAL

Las heces fueron resuspendidas en solución salina al 0.85% pH 7.2, con la cual, se preparó una suspensión al 10%.

Los resuspendidos, se agitaron fuertemente en un agitador tipo vortex por espacio de 1-2 min y se centrifugaron un instante a 14,000 rpm; posteriormente para cada muestra, a 200 ul del sobrenadante se le adicionaron 200 ul de una solución amortiguadora de rompimiento a una concentración de 2.5 X, se agitó en vortex por 2 minutos, se centrifugó un instante a 14,000 rpm y se añadieron 200 ul de fenol saturado con TRIS 0.1 M, se repitió la misma operación de agitación y posteriormente se agregaron 200 ul de cloroformo, se agitó al igual que las sustancias anteriores y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se obtuvo la fase acuosa y se guardó en congelación hasta su uso.

CONCENTRACION DE RNA VIRAL

Al genoma purificado (fase acuosa) se añadió 1 ml de etanol absoluto[®] posteriormente se congeló a -70 °C por espacio de una hora.

Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min, terminado este tiempo, se decantó inmediatamente el etanol y se procedieron a secar las muestras al vacío (SAVANT) por 30 min. A cada precipitado, se le añadieron 40 µl de agua bidestilada y se resuspendió por 2 min en vortex; posteriormente se mantuvieron en congelación hasta su uso.

ELECTROFORESIS

Se realizó en geles de poliacrilamida al 10%, utilizando como amortiguados de corrimiento TRIS-Glicina. Las muestras en solución acuosa, se mezclaron previamente

con una solución de azul de bromofenol-glicerol, en una proporción de 2:1 el cual, sirvió como indicador.

La electroforesis se llevó a cabo a 125 Volts por 14 Hrs.

TINCION CON NITRATO DE PLATA:

El gel de poliacrilamida se transfirió a una solución fijadora y se mantuvo por espacio de 30 min., se eliminó esta solución y se sustituyó por una solución de nitrato de plata al 1%, en la cual permaneció 30 min bajo condiciones de obscuridad; posteriormente, se eliminó esta solución y se realizaron 3 lavados con agua bidestilada; en seguida se adicionó una solución reveladora donde permaneció el gel, hasta la aparición de las bandas características del genoma segmentado de rotavirus. Para intensificar las bandas, se añadió una solución de ácido acético al 5%. Se realizaron de 2 a 3 lavados adicionales con agua bidestilada para eliminar el exceso de ácido acético. Los geles se conservaron en agua bidestilada.

ELISA:

Placas para ELISA de 96 pozos se sensibilizaron con 75 μ l de anticuerpos de captura específicos de serotipo (VP7 o VP4) y subgrupo (I o II) de rotavirus diluidos en PBS-Azida, se utilizó únicamente PBS-Azida como control negativo, las placas así preparadas se incubaron toda la noche a 4°C. Los anticuerpos monoclonales y las diluciones de trabajo se mencionan en la tabla 6 y 7, mientras que el esquema de trabajo se muestran en las figuras 3 - 5:

Tabla 6: Anticuerpos monoclonales y diluciones de trabajo utilizadas en la determinación por la técnica de Elisa de rotavirus grupo A, subgrupo y serotipo G.

ANTICUERPO	NOMBRE	DILUCION
Común grupo A	129	1:4000
VP7		
Serotipo G1	KU-4	1:4000
Serotipo G2	2F1	1:1000
Serotipo G3	4F8	1:5000
Serotipo G4	ST-2G7	1:10000

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

SUBGRUPO

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Subgrupo I	255/60	1:5000
Subgrupo II	631/9	1:5000

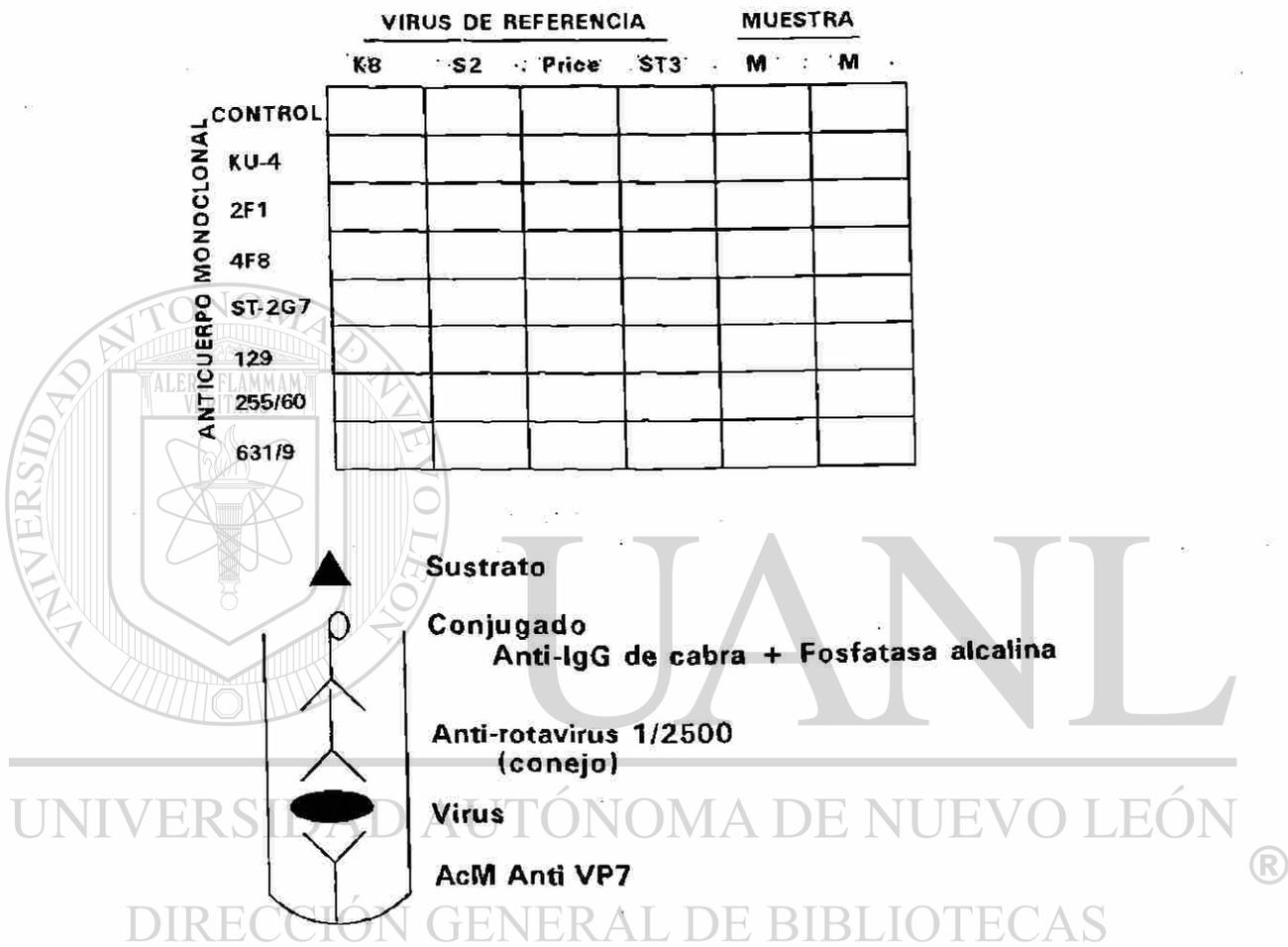
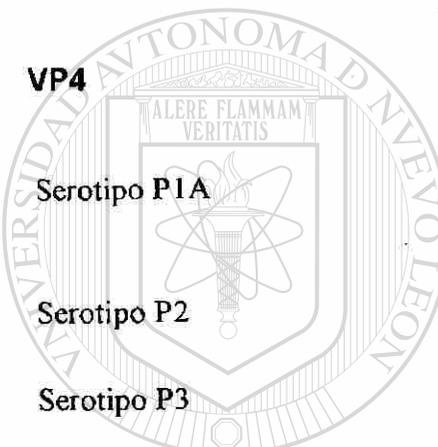


Figura 3: Esquema de trabajo utilizado en la determinación de cepas de rotavirus grupo A, subgrupo y serotipos G.

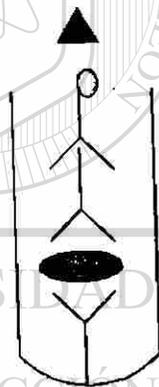
Tabla 7: Anticuerpos monoclonales y diluciones de trabajo utilizadas en la determinación de serotipos VP4 de rotavirus grupo A, mediante la técnica de Elisa



Anticuerpo	Dilución de trabajo
VP4	
Serotipo P1A	1A10 2A3 2G1
Serotipo P2	HS6 2A3
Serotipo P3	HS11 HS9 HS10 2G1
Heterotípico	YO-2C2
Policlonal	

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

	VIRUS DE REFERENCIA				MUESTRA	
	Wa	ST3	Wa	ST3		
	IP3	IP3	P4	P4	M	M
CONTROL						
1A10						
HS6						
HS11						
2A3						
2G1						
HS9						
HS10						



Sustrato

Conjugado
Anti-IgG de cabra + Fosfatasa alcalina

Anti-rotavirus 1/2500
(conejo)

Virus
Anti-VP4

Figura 4: Esquema de trabajo utilizada en la determinación de cepas de rotavirus grupo A, subgrupo y serotipo P.

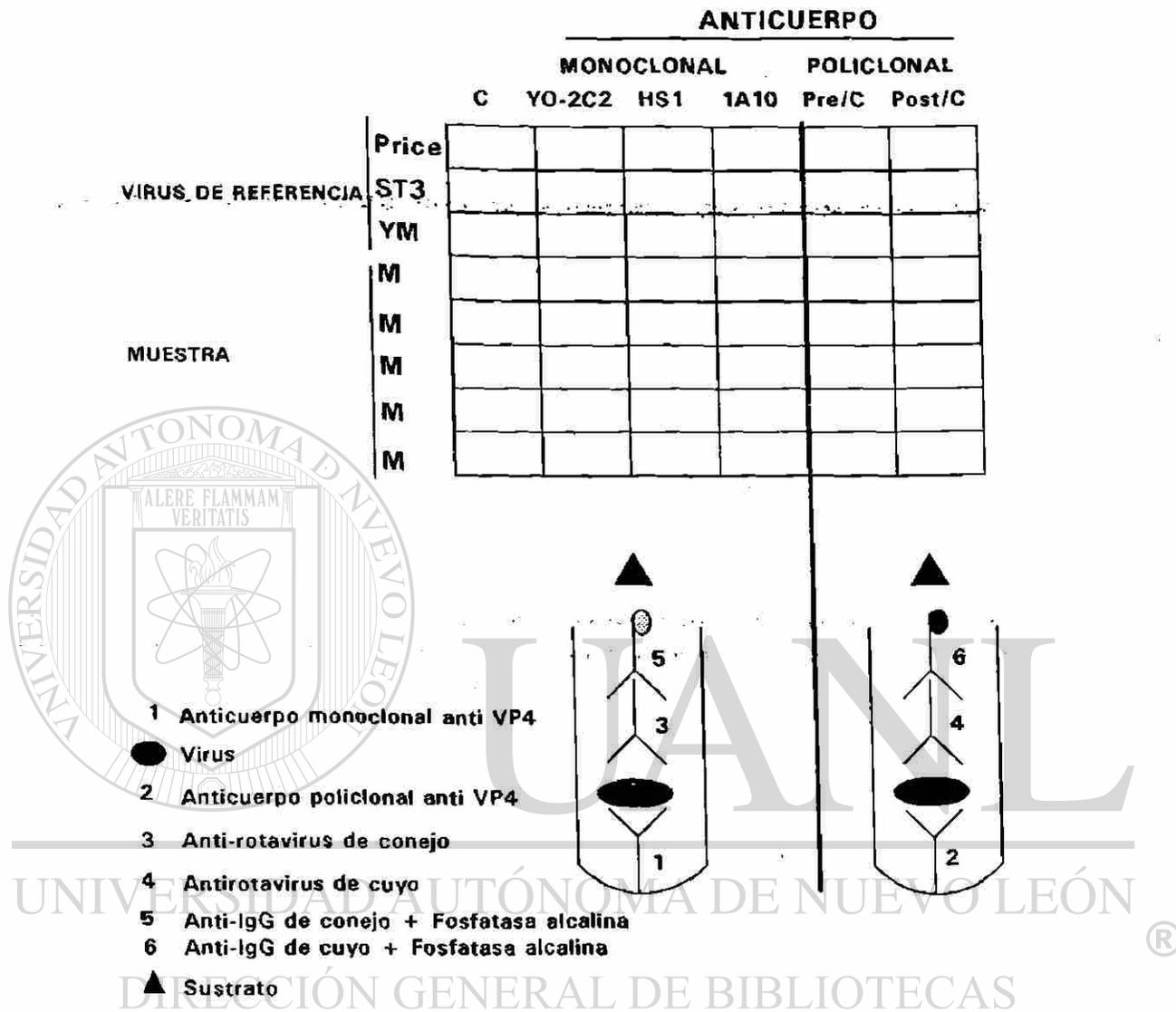


Figura 5: Esquema de trabajo utilizado en la determinación de cepas de rotavirus grupo A, subgrupo y serotipo P.

Las placas así preparadas, se lavaron 2 veces con 200 ul de PBS-Azida. En seguida se añadió 75 ul de suero fetal de ternera (SFT) como bloqueador, y se incubó a 37 °C por una hora.

Se realizaron otros dos lavados con 200 ul de PBS-Azida y se adicionó 75 ul de una suspensión de heces al 20% en PBS-Azida-SFT 5% o 75 ul del virus de referencia diluído 1:2 en PBS-Azida-SFT 10%, incubándose a 37 °C por hora y media. Las detecciones se hicieron por duplicado y todos los lavados posteriores se realizaron con PBS-Azida a menos que se mencione lo contrario.

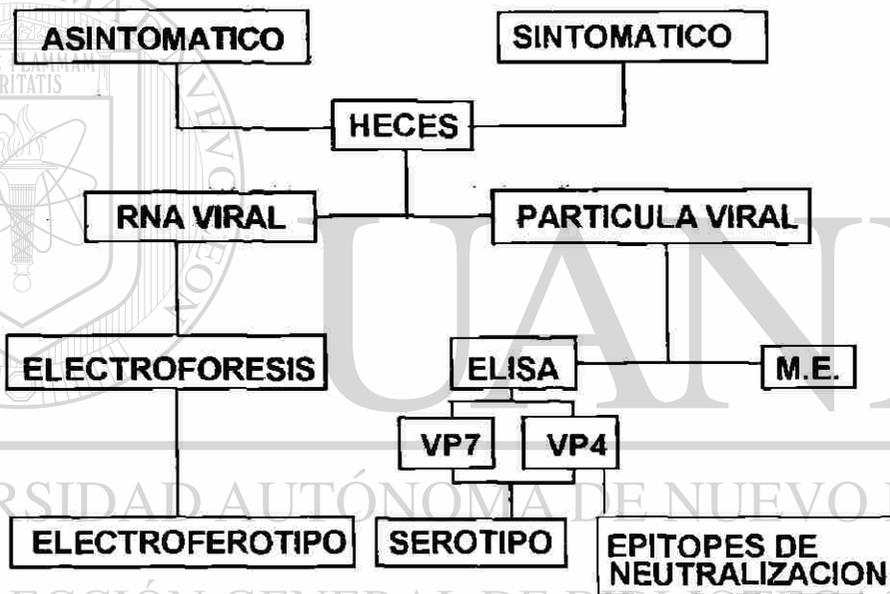
Después de la incubación se lavó 4 veces y se añadió a cada pozo 75 ul de un anticuerpo contra rotavirus producido en conejo y diluído 1: 2500 en PBS-Azida- SFT 2.5% y se incubó a 37 °C por una hora.

Nuevamente se lavó y se agregó 75 ul de conjugado (anti-anti-rotavirus producido en cabra y unido con fosfatasa alcalina 0.1 mg/ml) diluído 1:1000 en PBS-Azida-SFT 2.5%; se incubó a 37 °C durante una hora; para en seguida lavar y adicionar 75 ul de sustrato. Se incubó a 37 °C por 45 min y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia, en un microlector para ELISA a una longitud de onda de 405 nm. El criterio para la determinación de serotipo fué una absorbancia de cuando menos el doble con respecto al testigo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

POBLACION DE ESTUDIO Y COLECCION DE MUESTRAS

En este estudio, fueron incluidos niños menores de dos años de edad, admitidos con diarrea a tres hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el área metropolitana de Monterrey N.L. México; niños menores de dos años hospitalizados por síndromes diferentes a la gastroenteritis en los mismos hospitales; neonatos de hasta 3 días de nacido cuyas muestras fueron proporcionadas por el hospital de la Sección 50 de maestros del S.N.T.E., y niños sanos mayores de 2 años de diversos centros escolares de preprimaria y primaria.

De estos infantes, se colectaron muestras fecales diarreicas durante el período comprendido de Julio de 1993 a Marzo de 1994. Para los niños asintomáticos, la colección correspondió de Febrero de 1993 a Febrero de 1995; mientras que los neonatos, de Abril de 1994 a Febrero de 1995 (tabla 8).

Las heces fecales fueron probadas para la presencia de rotavirus por electroforesis en geles de poliacrilamida y teñidos con nitrato de plata.

Tabla 8: Tipo de población estudiada para la detección de rotavirus colectadas de Julio de 1993 a Marzo de 1994 (sintomáticos menores de 2 años); Febrero de 1993 a Febrero de 1995 (asintomáticos menores de 2 años); Febrero a Abril de 1994 (asintomáticos mayores de 2 años); Abril de 1994 a Febrero de 1995 (neonatos)

POBLACION	SINTOMATICA	ASINTOMATICA	TOTAL
NEONATOS		519	519
MENORES DE 2 AÑOS	465	795	1,260
MAYORES DE 2 AÑOS		485	485
TOTAL	465	1,799	2,264

ELECTROFEROTIPOS

Sintomáticos

Un total de 465 heces de niños con gastroenteritis fueron analizados para la presencia de rotavirus. De estas, 140 presentaron el modelo de corrimiento clásico con la presencia de las bandas que corresponden a los segmentos génicos del RNA de doble cadena (figura 6).

Catorce diferentes electroferotipos fueron detectados entre los casos diarreicos. Estos electroferotipos, son identificados con los números romanos I - XIV de acuerdo al orden de aparición.

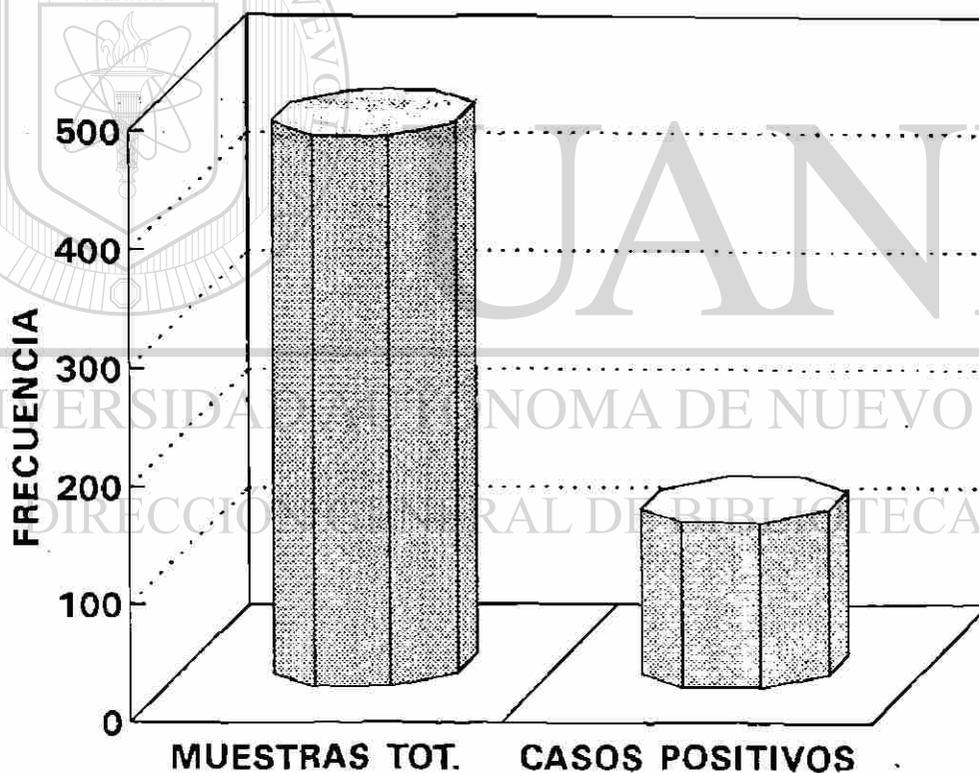


Figura 6: Prevalencia de rotavirus en casos de gastroenteritis infantil en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México.

Una comparación de los segmentos se muestra en la figura 7, donde ilustra el grado de variabilidad genética entre los 14 electroferotipos, 13 de los cuales presentan el modelo característico de rotavirus grupo A (modelo 4,2,3,2), mientras que solo uno presentó fuerte similitud a rotavirus porcino grupo C (carril 1).

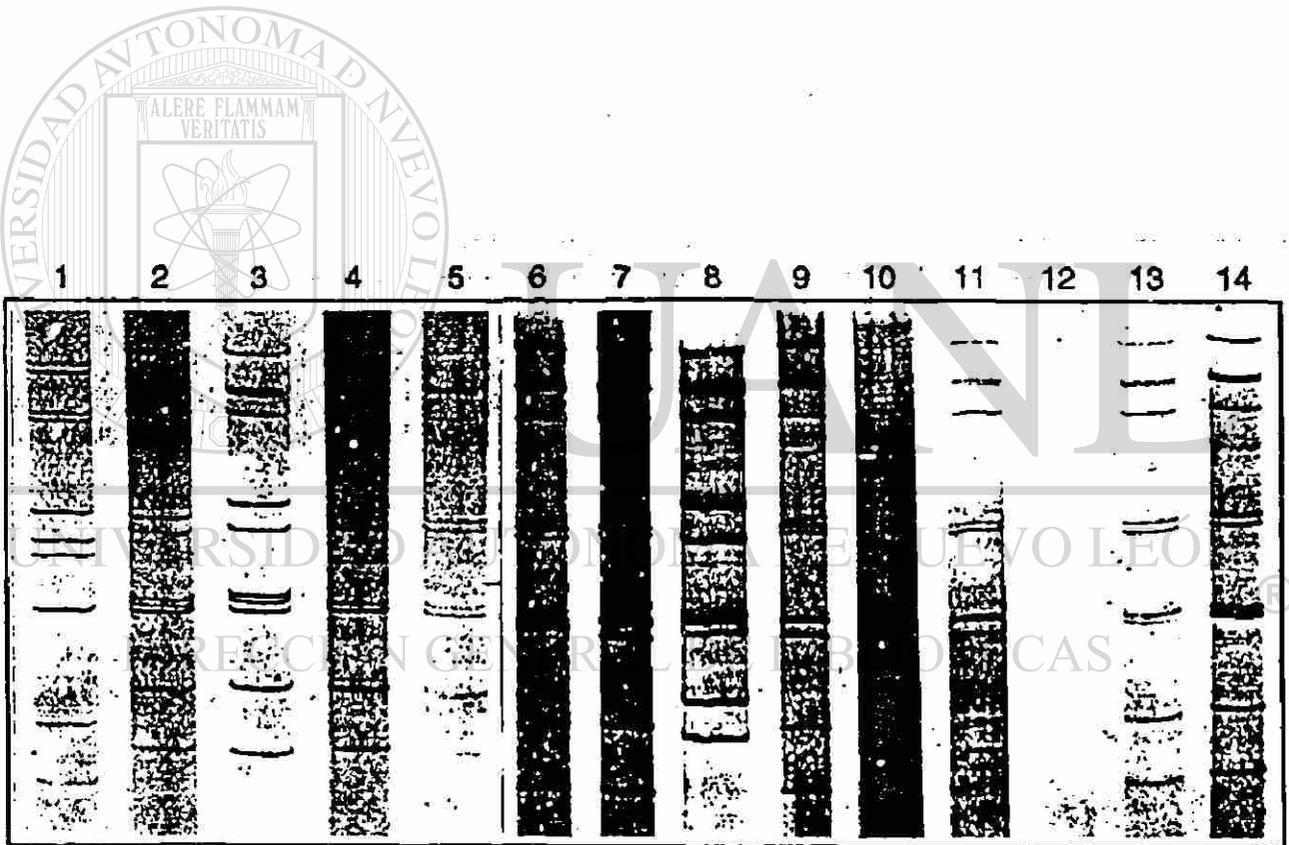


Figura 7. Analisis por electroforesis en geles de poliacrilamida del RNA de doble cadena de rotavirus humano, obtenido de heces fecales colectadas durante el estudio. Lineas 1-14 demuestran los 14 electroferotipos detectados. Linea 1 corresponde al electroferotipo de rotavirus diferente al grupo A.

Epidemiología molecular de rotavirus humano en Mty, N.L. de Julio de 1993 - Enero del 1994.

Las figuras 8 y 9 ilustran la aparición de los electroferotipos de acuerdo a la fecha de colección de muestras. Aunque el número de casos positivos detectados en un tiempo particular, no necesariamente refleja la frecuencia de diarreas en la comunidad, los resultados representados de esta manera pueden servir para dar un panorama y por lo tanto como una guía general del comportamiento de las cepas de rotavirus en nuestra región.

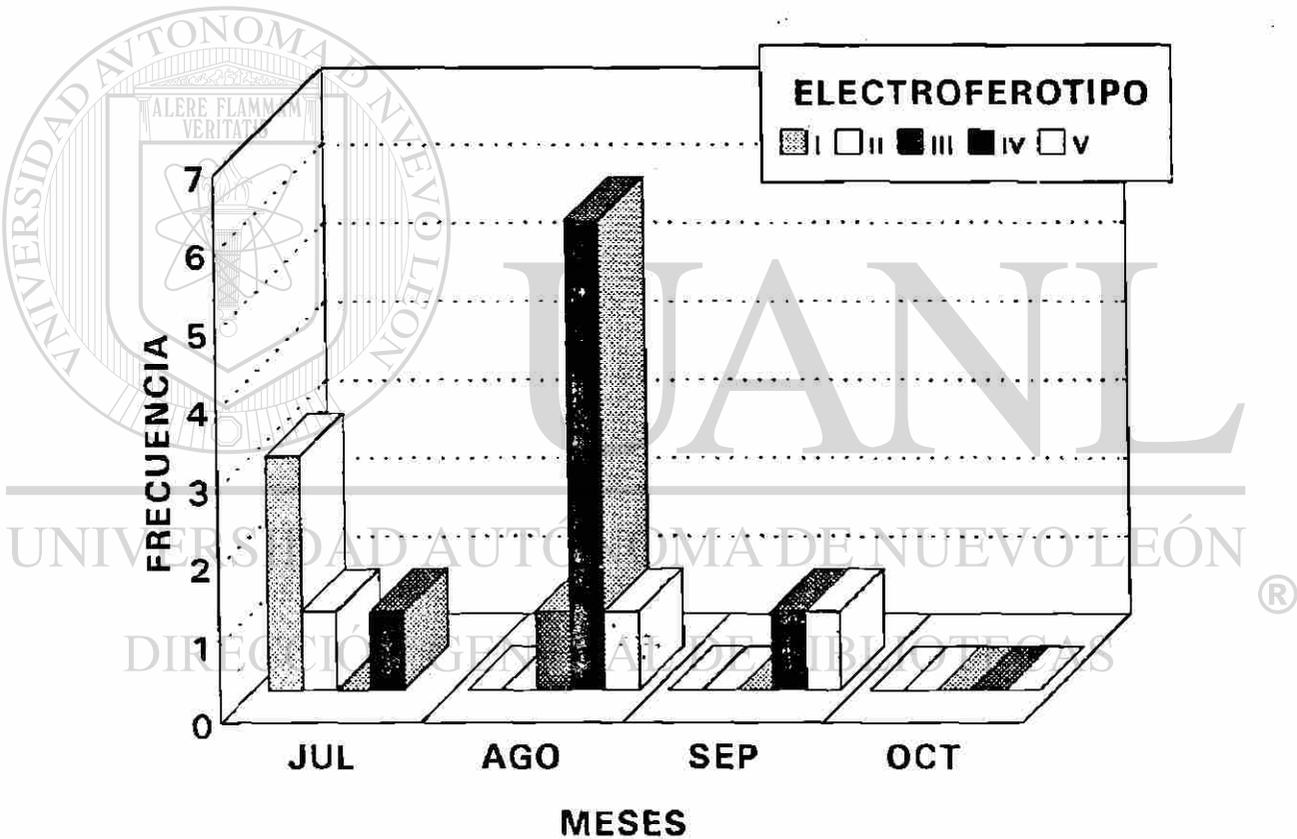


Figura 8: Variabilidad de electroferotipos y frecuencia de aparición en orden cronológico detectados en el periodo de Julio a Octubre de 1993.

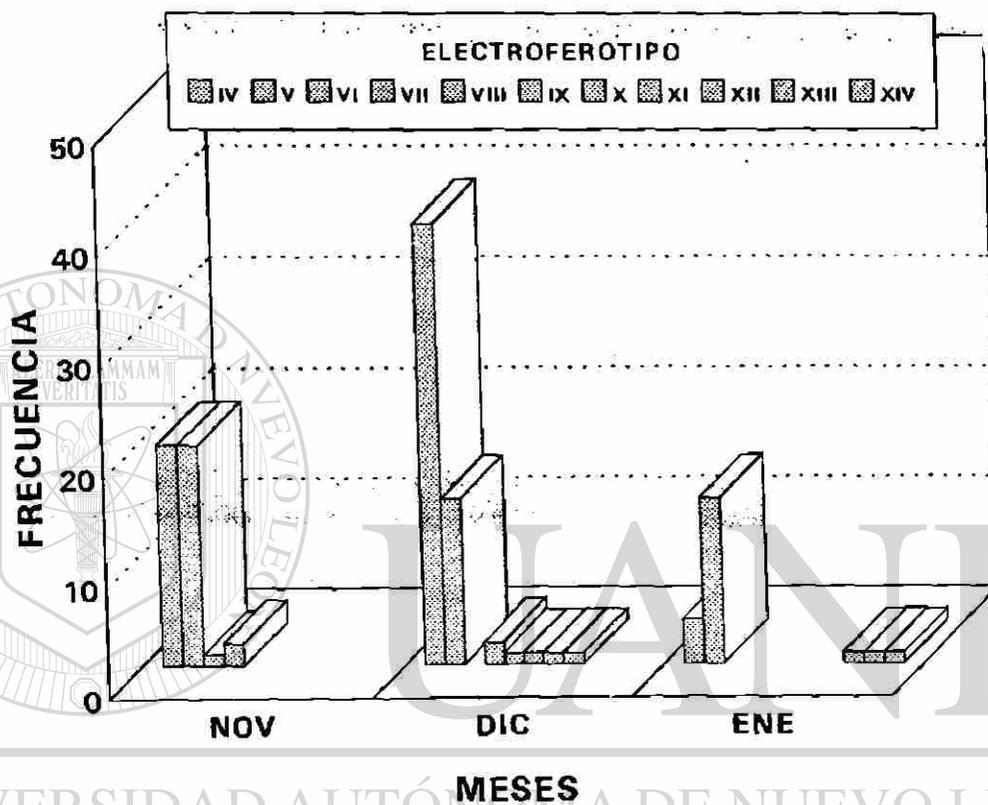


Figura 9 Variabilidad de electroferotipos y frecuencia de aparición en orden cronológico detectados en el periodo de Noviembre de 1993 a Enero de 1994.

Las gráficas ilustran el total de casos positivos por meses con gastroenteritis rotaviral. Se puede observar cuando los resultados son demostrados de esta manera,

que los 14 electroferotipos no están presentes en la misma magnitud, y que un electroferotipo fué usualmente predominante durante casi todo el período, frecuentemente en combinación con el segundo en importancia de aparición o con los electroferotipos menos comunes.

De Julio a Octubre, el electroferotipo predominante fué el número IV con el I, II, III, y V detectados menos frecuentemente, ya que inclusive el II sólo apareció en un solo caso diarreico y no volvió a ser detectado.

De Noviembre a Enero del 1994, período el cual correspondió a la mayoría de los casos positivos, el electroferotipo IV siguió siendo predominante, pero en esta ocasión asociado a la presencia de los electroferotipos V-XIV.

Trece de los electroferotipos presentaron la separación de los segmentos 10 y 11 característica del modelo de migración largo y 1, el cual apareció solo una vez en el mes de Diciembre, demostró modelo corto (electroferotipo VIII) (figura 7).

Variabilidad genética en los segmentos 4, 7, 8, 9.

Ya que las proteínas de superficie VP4 y VP7 son codificadas por los segmentos génicos 4 (VP4), y 7, 8 o 9 (VP7) según la cepa viral; se realizó una comparación de los electroferotipos que presentaron variación en alguno de estos segmentos (figura 10).

Como se puede observar, el segmento 4 fué el más estable, ya que la migración ocurrió igual en los 13 electroferotipos de rotavirus grupo A. Sin embargo, cuando se comparan los segmentos 7, 8 y 9 del electroferotipo predominante (IV) contra los 12 restantes, se encuentran 6 electroferotipos con claras diferencias en la posición de los segmentos genicos (electroferotipos II, III, VI, VII, VIII y XIII), donde se incluyen uno con electroferotipo corto y uno que presentó 12 bandas en lugar de las 11 comunes.

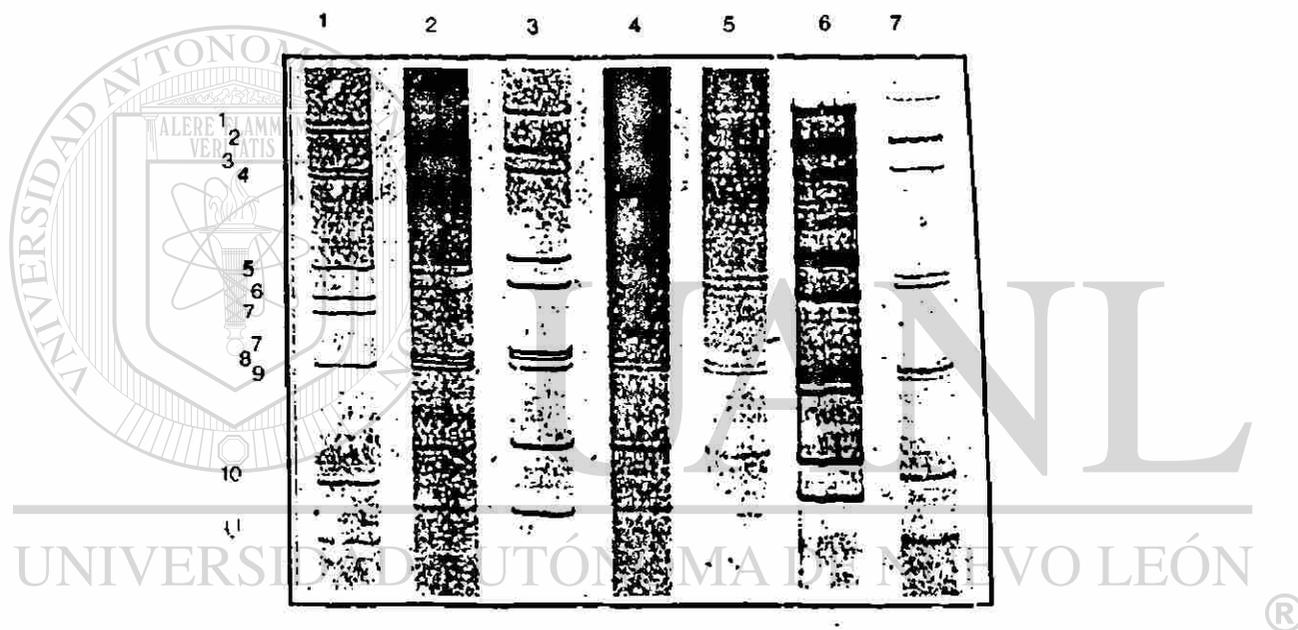


Figura 10: Comparación de los electroferotipos con variaciones en la migración de los segmentos 7, 8 y 9. Línea 3, electroferotipo predominante (IV), línea 6 electroferotipo corto (VIII), línea 7 electroferotipo con 12 bandas (XIII).

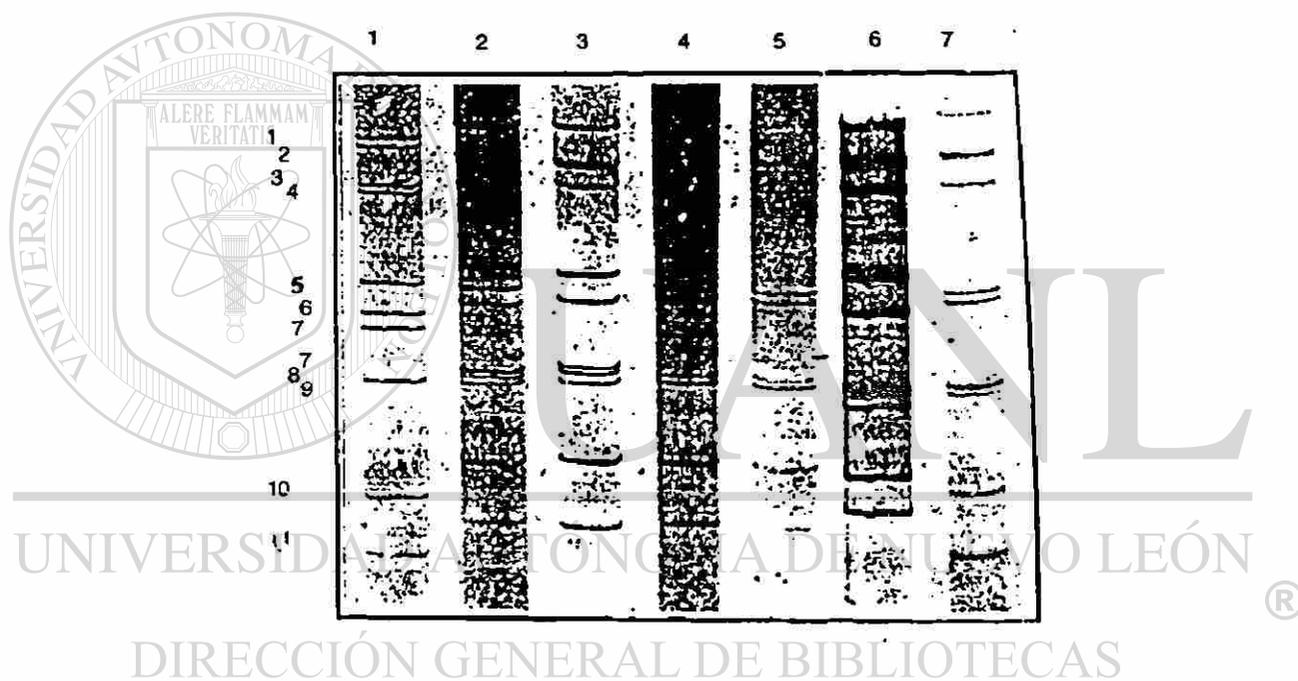


Figura 10: Comparación de los electroferotipos con variaciones en la migración de los segmentos 7, 8 y 9. Línea 3, electroferotipo predominante (IV), línea 6 electroferotipo corto (VIII), línea 7 electroferotipo con 12 bandas (XIII).

Asintomáticos

Esta población de estudio comprendió el análisis de 1280 muestras, las cuales fueron colectadas de Febrero de 1993 a Febrero de 1995, bajo el mismo protocolo que para las muestras sintomáticas.

De estas, 795 correspondieron a niños menores de 2 años, mientras que las restantes 485 se obtuvieron de niños con un rango de edad de 2 a 13 años.

De los niños hospitalizados por síndromes diferentes a la gastroenteritis, cincuenta y cinco (18 %) infantes presentaron una infección con rotavirus (figura 11).

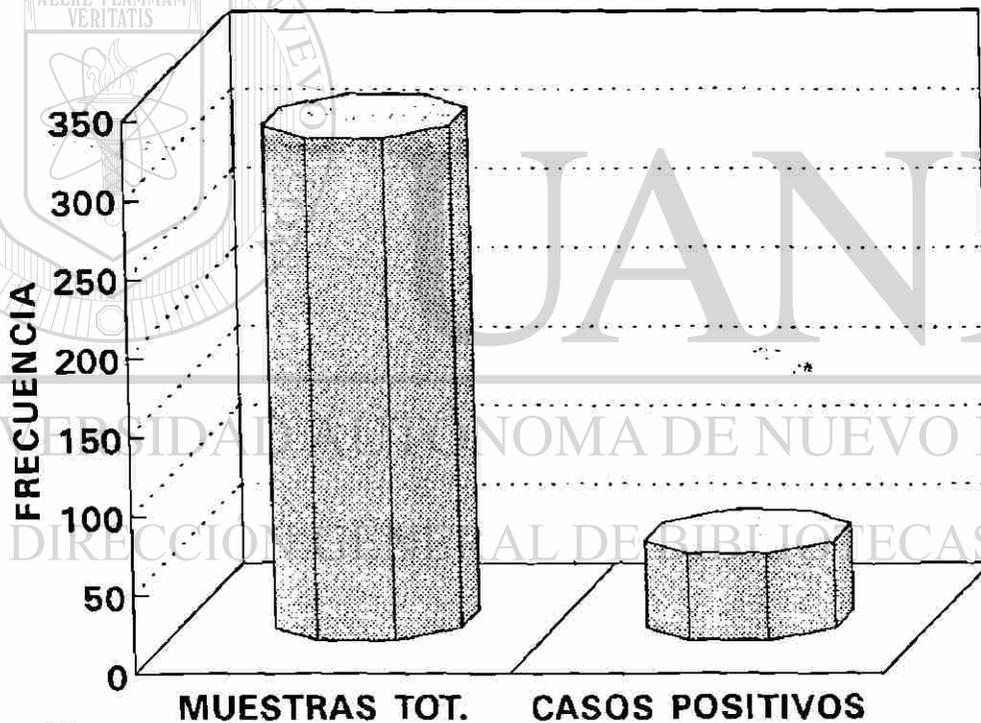


Figura 11: Prevalencia de rotavirus en casos asintomáticos colectados durante el período Octubre de 1994 a Febrero de 1995 en el área metropolitana de Monterrey, N.L., México.

Al realizar una comparación de los modelos de migración de estas cepas, se encontraron un total de 7 electroferotipos diferentes (figura 13), las cuales presentan un patrón de corrimiento diferente a los encontrados en las muestras sintomáticas. No se encontró ningún caso positivo en los infantes en edad escolar.

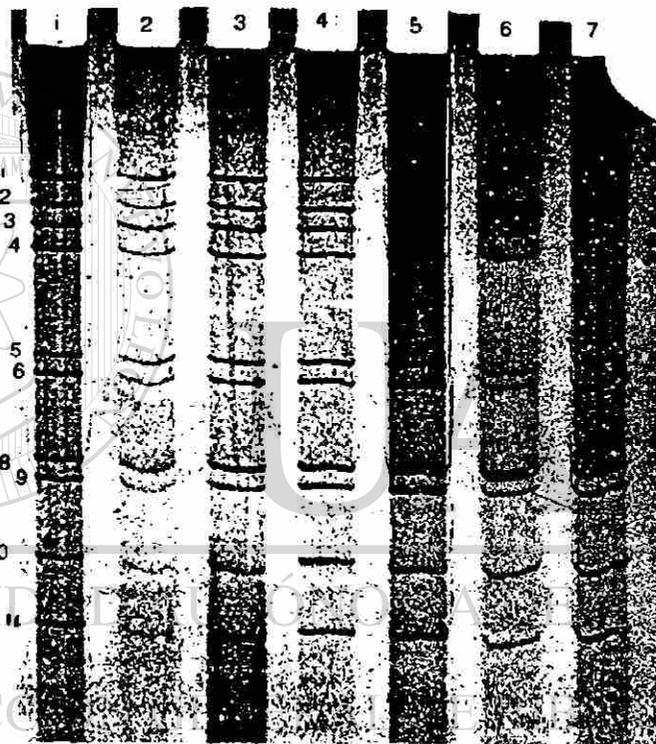


Figura 12: Analisis por electroforesis en gels de poliacrilamida del RNA de rotavirus humanos, obtenido de heces fecales de niños sin diarrea durante el período de Octubre de 1994 a Febrero de 1995.

Estos siete diferentes electroferotipos encontrados entre la población asintomática para la gastroenteritis fueron detectados solamente en el período comprendido de Octubre de 1994 - enero de 1995 figura con un pico de prevalencia en el mes de Diciembre de 1994 el cual también correspondió con el pico de variabilidad entre los electroferotipos detectados.

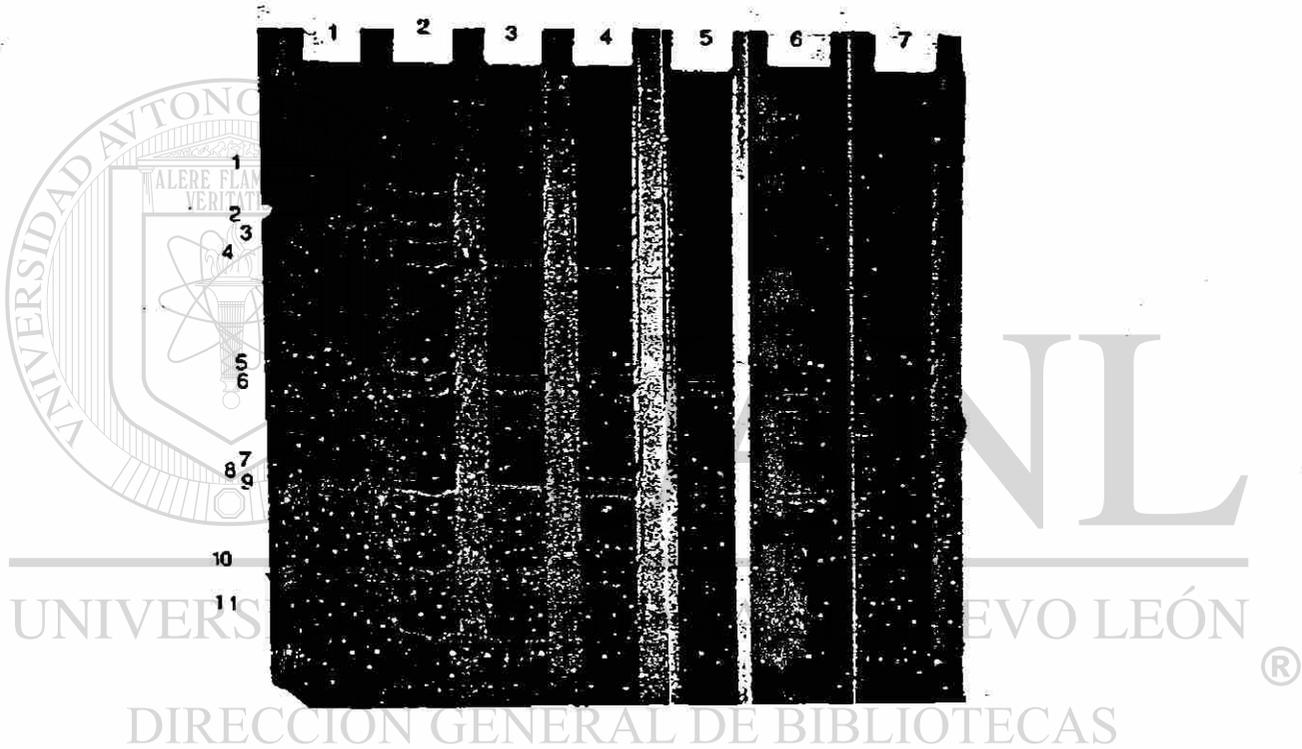


Figura 13: Variabilidad de electroferotipos de rotavirus recuperado de casos asintomáticos en el período de Octubre de 1994 a Febrero de 1995

Neonatos

Quinientas diez y nueve muestras de neonatos (de 1 a 3 días de nacido), fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida para detectar los casos de infección en esta población.

Aun y cuando la colección de muestras comprendió de abril de 1994 a Febrero de 1995, cubriendo las 4 estaciones del año, los resultados obtenidos corresponden a 1 (0.2 %) cepa rotaviral detectada (figura 14).

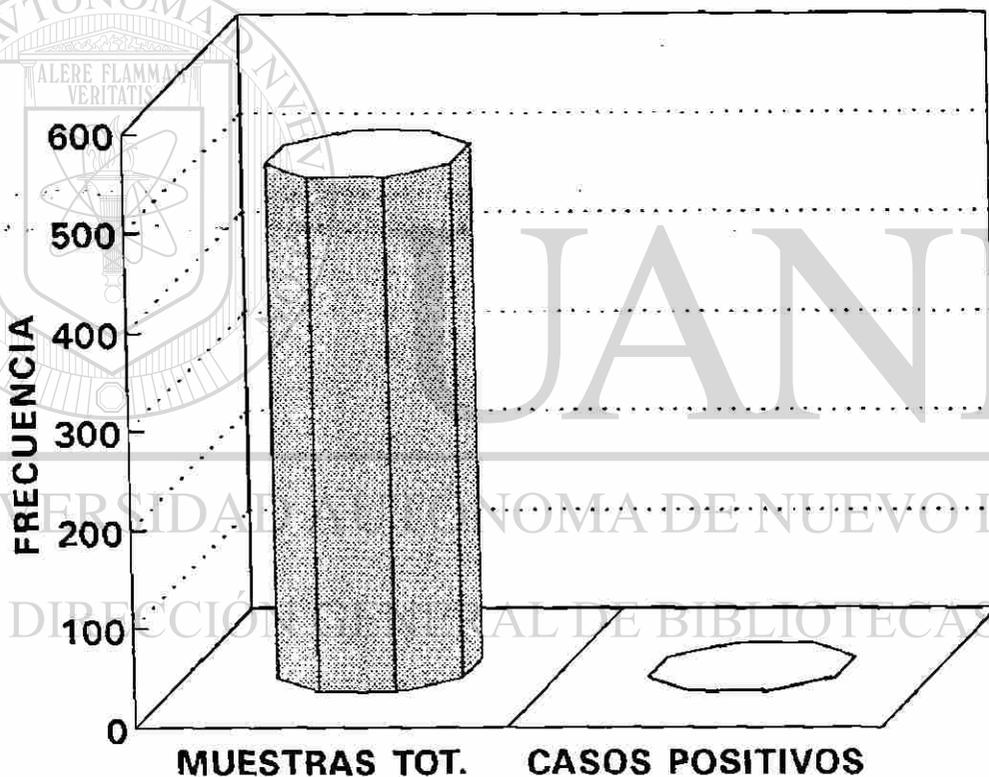


Figura 14: Prevalencia de rotavirus en casos de neonatos colectados durante el período de Abril de 1994 a Febrero de 1995, en el área metropolitana de Monterrey, N.L., México.

SEROTIPOS VP7

Para estudiar la diversidad de serotipos G entre los 140 casos positivos de niños con diarrea, se llevó a cabo una prueba de ELISA, para confirmar la presencia de la proteína VP7, utilizando como anticuerpo de captura, el anticuerpo monoclonal 129 el cual reacciona heterotípicamente contra rotavirus del grupo A (figura 15).

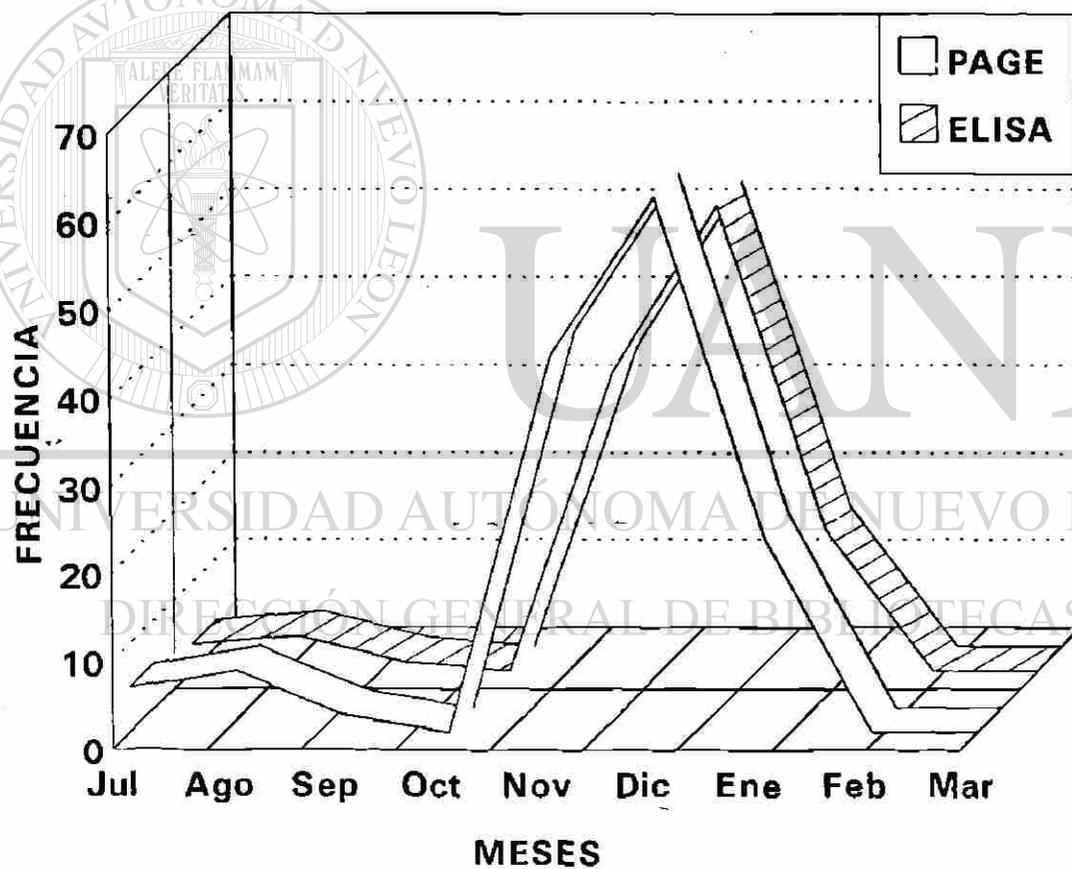


Figura 15: Frecuencia de rotavirus detectados por ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal 129 el cual es un anticuerpo de reacción cruzada para VP7.

Los valores de absorbancia, fueron registrados en un microlector para ELISA a una longitud de onda a 405 nm. utilizando como cepas de referencia a K8 (serotipo G1), S2 (serotipo G2), Price (serotipo G3) y St3 (serotipo G4), y como anticuerpos de captura a KU4 que detecta serotipo G1, 2F1 (serotipo G2), 4F8 (serotipo G3) y ST-2G7 (serotipo G4).

De esta manera, fue posible identificar el serotipo de 118 (84%) cepas al demostrar reactividad positiva para 3 de los anticuerpos utilizados.

En la tabla 9, se ilustran los casos que corresponden a los serotipo G1-G3, ninguno fue serotipo G4, además, se muestran los casos de las cepas que no fueron tipificables donde se incluyen 3 con fuerte parecido a rotavirus porcino grupo C, .

Durante los 9 meses en que fueron colectadas las muestras de niños sintomáticos, el serotipo G3 fue identificado en 113 (96%) de las 118 muestras; el serotipo G1 en 4 (3%) y el serotipo G2 en 1 (0.8), este ultimo correspondió al virus con el electroferotipo corto.

Tabla 9: Modelo de reactividad por ELISA de anticuerpos monoclonales específicos de serotipo G en casos de gastroenteritis infantil

<u>Muestras</u>		<u>Común</u>	<u>Anticuerpos monoclonales</u>				
Totales	Positivas	129	KU-4	2F1	4F8	ST-2G7	
465	140	118	4	1	113	0	24

EPIDEMIOLOGIA DE SEROTIPOS G

La aparición de cada serotipo G durante el período comprendido de Julio de 1993 a Marzo de 1994, se demuestra en la figura 16. El serotipo predominante (G3), también fue el único detectado a lo largo de todo el estudio, ya que aunque las cepas de rotavirus se comenzaron a detectar desde el mes de Julio, fué hasta el mes de Noviembre, cuando aumentó considerablemente el número de casos positivos entre las heces diarreicos, se detectó el primer serotipo G1.

Asimismo, la mayor frecuencia de casos rotavirales correspondió al período de Noviembre de 1993 a Enero de 1994, alcanzando el pico máximo en Diciembre y fué precisamente en este período, cuando aparecieron, aunque con mucho menos frecuencia los serotipos G1 (4 casos) distribuidos en Noviembre (1), Diciembre (2) y Enero (1) y el serotipo G2 que se detectó en Diciembre con solamente un caso. No hubo presencia de casos de diarrea por rotavirus en Febrero y Marzo entre las muestras analizadas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

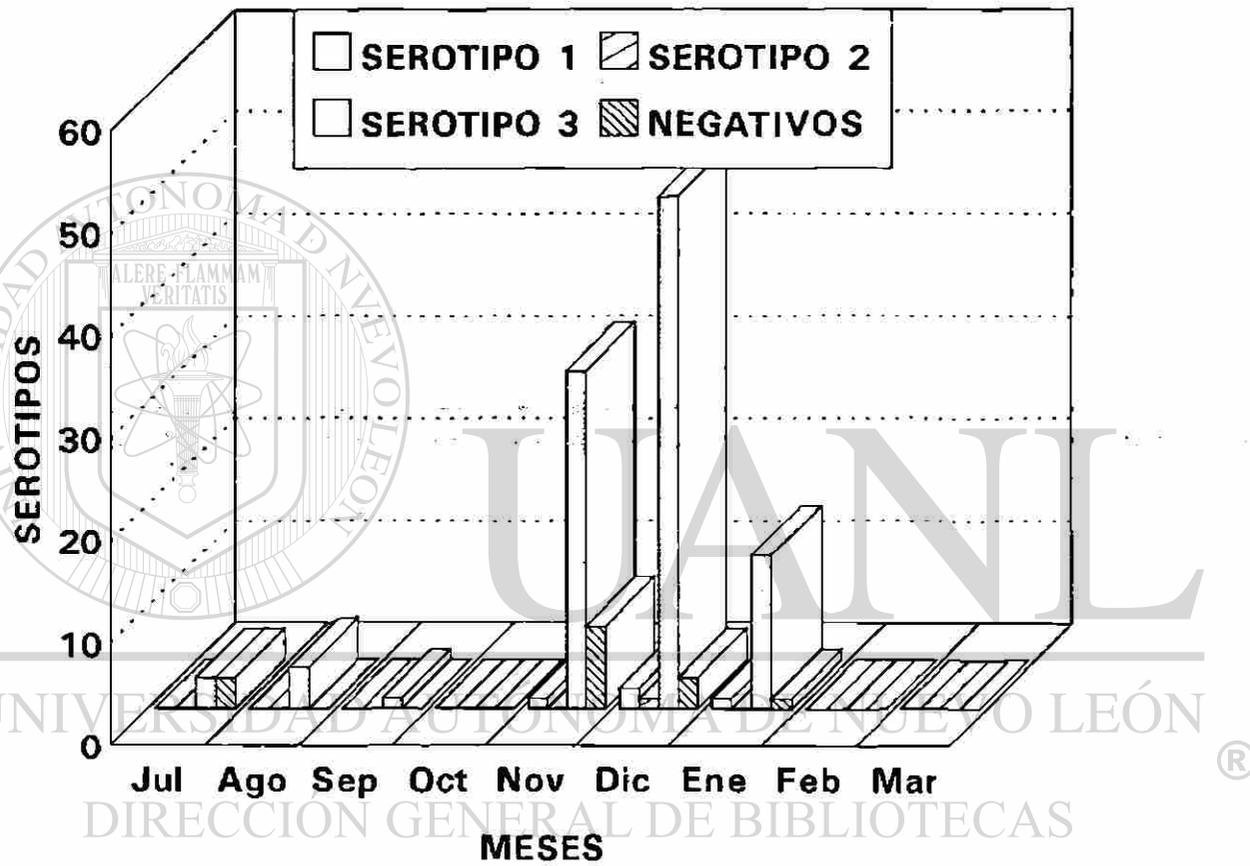


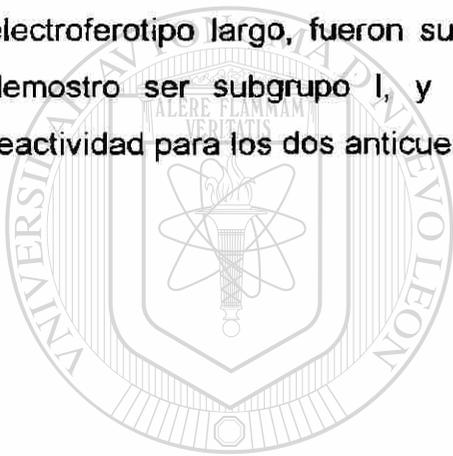
Figura 16: Frecuencia de aparición de los serotipos G en muestras diarreicas durante el período de Julio de 1993 a Marzo de 1994.

SUBGRUPOS

Una prueba inmunoabsorbente (ELISA), fue desarrollada para determinar el subgrupo de las 118 cepas que se serotipificaron para serotipo G.

Para esto, fueron utilizados los anticuerpos monoclonales 255/60 que detecta subgrupo I (SGI) y el 631/9 que identifica al subgrupo II (SGII) de rotavirus grupo A. las pruebas fueron realizadas en placas de 96 pozos de forma similar que para la determinación de serotipo G.

De esta manera, 116 (98%) cepas las cuales previamente demostraron electroferotipo largo, fueron subgrupo II; 1 (1%) una cepa con electroferotipo largo demostro ser subgrupo I, y 1 (1%) cepa con electroferotipo corto resulto con reactividad para los dos anticuerpos (subgrupo I y II) (tabla 10).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Tabla 10: **Modelo de reactividad por ELISA de anticuerpos monoclonales específicos de subgrupo en muestras de casos de gastroenteritis infantil.**

<u>MUESTRAS</u>		<u>COMUN</u>		<u>SUBGRUPO</u>	
TOTALES	POS	129	255/60	631/9	NEG
465	140	118	2	116	22

Tabla 11: Especificidad de subgrupo y serotipo G de cepas de rotavirus aisladas en Monterrey, N.L., México.

SUBGRUPO	G1	G2	G3	G4	TOTAL
SGI	0	0	1	0	1
SGII	4	0	112	0	116
SGI+II	0	1	0	0	1
TOTAL	4	1	113	0	118

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



VARIABILIDAD DE VP4

Ya que otro de los objetivos que nos propusimos alcanzar fue determinar la diversidad de epitopes sobre la proteína VP4, la estrategia a seguir fue la utilización de un panel de anticuerpos monoclonales que nos detectaran el serotipo P más importante epidemiológicamente (P1A) y el serotipo característico de las infecciones asintomáticas (P2). por tal motivo, se eligieron para la determinación de P1A, los anticuerpos 1A10, 2A3 y 2G1 donde además 2A3 detecta cepas con serotipo P2 y 2G1 que también presenta reacción cruzada con serotipos P2 y P3.

Asimismo se utilizaron los anticuerpos HS6, HS9, HS10 y HS11 los cuales detectan epitopes presentes en las cepas asintomáticas con serotipo P2.

De las 118 cepas caracterizadas como serotipos G, se eligieron 58 para estudiar la diversidad de epitopes de la proteína VP4, las cuales representaban los 13 diferentes electroferotipos del grupo A detectados en las muestras diarreicas.

Cuarenta y ocho de las 58 muestras fueron reconocidas por al menos 2 anticuerpos monoclonales que reconocen al serotipo P1A. De estas, 41 cepas reaccionaron con los tres anticuerpos 1A10, 2A3 y 2G1; 6 reaccionaron con 1A10 y 2A3, y 1 cepa reacciono con 1A10 y 2G1 (tabla 12, figura 17).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 12: Modelo de reactividad por ELISA de anticuerpos monoclonales contra la proteína VP4 de las cepas de rotavirus de casos de gastroenteritis infantil

MODELO DE REACTIVIDAD ANTI VP4				
MUESTRAS	1A10+2A3+2G1	1A10+2A3	1A10+2G1	NEG
58	41	6	1	10

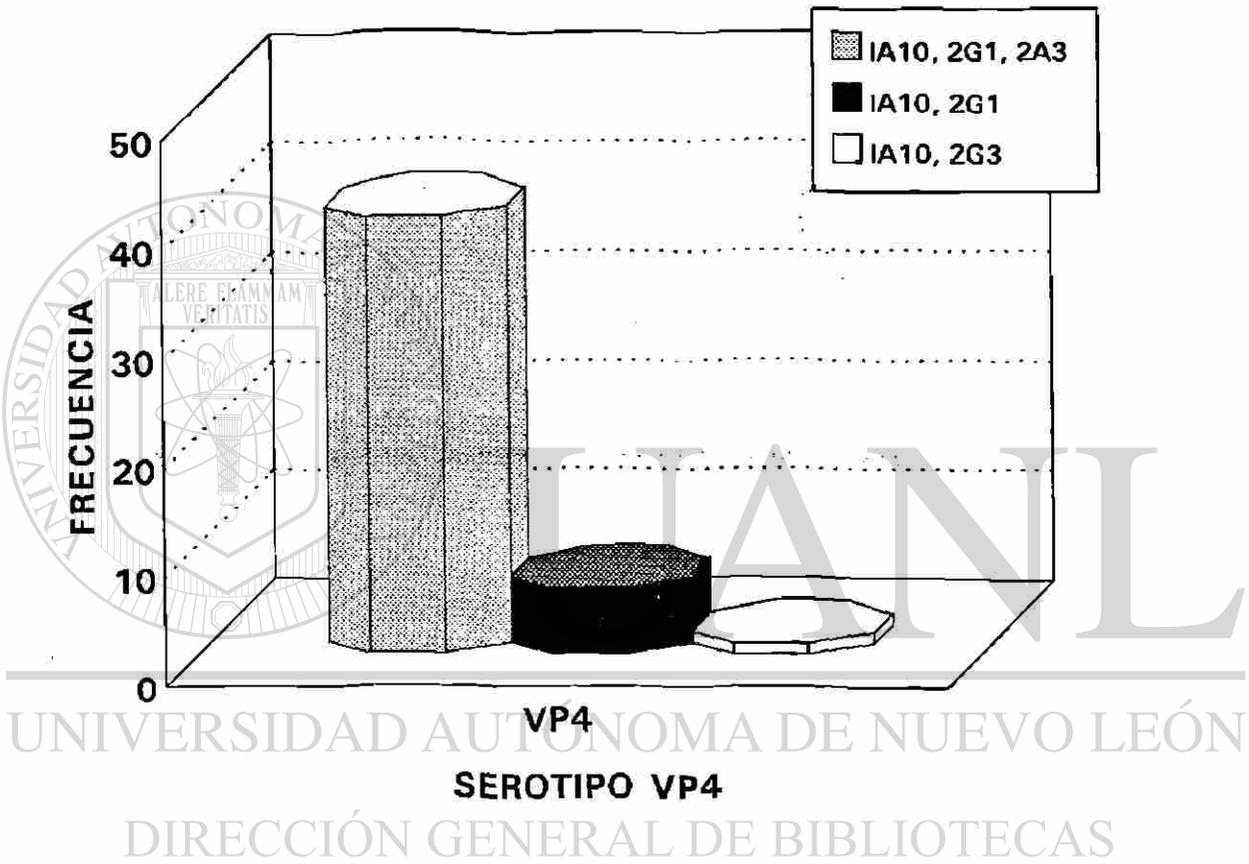


Figura 17: Frecuencia de epitopes relacionados a la proteína VP4 de cepas de rotavirus de casos de gastroenteritis infantil

Ahora bien, cuando este modelo de reactividad de los anticuerpos contra la proteína VP4 se analizó para determinar el serotipo G correspondiente, se encontró que los 4 serotipos G1 presentaron un modelo diferente ya que 2 fueron reconocidos por los 3 anticuerpos, 1 por 1A10, 2A3 y otro por 1A10, 2G1, mientras que los restantes 44 serotipos G3, no se encontró reactividad con el par de anticuerpos que reconocen 1A10 y 2G1 (tabla 13).

Tabla 13: Heterogeneidad de epitopes en cepas de rotavirus humanos y su correlación con la especificidad de serotipos G.

MODELO DE REACTIVIDAD ANTI VP4				
SEROTIPO G	1A10+2A3+2G1	1A10+2A3	1A10+2G1	TOTAL
G1	2	1	1	4
G3	39	5	0	44
TOTAL	41	6	1	48

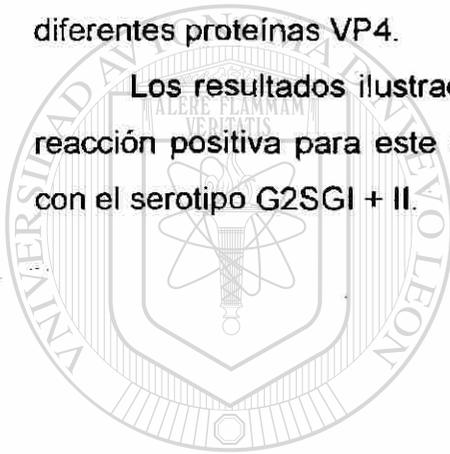
Por otro lado, ya que los epitopes reconocidos por 2A3 y 2G1 pueden localizarse en cepas asintomáticas, se procedió a determinar si alguna de las cepas que reaccionaron con este anticuerpo también eran reconocidas por los anticuerpos HS6, HS9, HS10 o HS11.

Los resultados demuestran que ninguna de las cepas utilizadas demostraron reactividad para ninguno de estos anticuerpos.

Sin embargo, el hecho de que solamente 48 cepas de las 58 probadas reaccionaron con alguno de los anticuerpos que reconocen al serotipo P1A, se procedió a determinar si la proteína VP4 se encontraba presente en las 10 cepas restantes, donde 9 de ellas previamente se habían determinado como serotipos G3, SGII, y 1 como serotipo G2, SGI + II.

Para realizar lo anterior, se utilizó como anticuerpo de captura en una prueba de ELISA, al anticuerpo monoclonal YO2C2 el cual presenta reacción cruzada con diferentes proteínas VP4.

Los resultados ilustrados en la tabla 14 indican que 9 de las 10 cepas dieron reacción positiva para este anticuerpo, donde inclusive se encontraba la única cepa con el serotipo G2SGI + II.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 14: Reactividad del anticuerpo monoclonal YO2C2 en cepas no reconocidas por anticuerpos específicos de serotipo P1A.

MUESTRAS	<u>SEROTIPO</u>	<u>ANTICUERPO</u>	
		<u>Rx. CRUZADA</u>	
58	P1A	YO2C2	NEG
	48	9	1

CORRELACION ENTRE ELECTROFEROTIPO, SEROTIPO Y SUBGRUPO

Una correlación entre los electroferotipos que presentaron variación en los segmentos 7, 8 o 9, los subgrupos y serotipos se llevo a cabo con el objetivo de establecer una evidencia del comportamiento de las cepas aisladas en Monterrey, N.L. México.

La tabla 15 ilustra los resultados obtenidos de este analisis. donde se indica que algunas variaciones en los segmentos genicos 7, 8 o 9 coincidieron con variabilidad del serotipo G, y algunas cepas caracterizadas como serotipo G no demostraron reactividad para el serotipo P, mientras que en otras cepas a pesar de la variabilidad presentada en los mdelos electroforeticos, esa variacion no se manifestó en cambios de serotipo.

Tabla 15: Electroferotipo con variación en los segmentos 7, 8 o 9, serotipo y subgrupo de cepas de rotavirus aisladas de casos de gastroenteritis en Monterrey, N.L., México.

ELECTRO-FEROTIPO	PATRON ELEC-TROFORETICO	SUBGRUPO	SEROTIPO G	SEROTIPO P
II	LARGO	ND	ND	ND
III	LARGO	II	ND	ND
IV	LARGO	II	G3	P1A
VII	LARGO	II	G3	P1A
VII	LARGO	II	G1	P1A
VIII	CORTO	I+II	G2	ND
XIII	LARGO	II	G1	P1A

DISCUSION

La infección por rotavirus humanos entre la comunidad infantil, ha sido registrada continuamente en muchas partes del mundo (*Rodger, et al, 1981; Padilla-Noriega, et al, 1990; Steel, et al, 1992*). Sin embargo, un estudio de esta naturaleza es realizado por primera vez en el área metropolitana de Monterrey, N.L. México.

En este reporte, nosotros encontramos el inicio del brote epidémico en el mes de Noviembre, ya que aunque se aislaron algunas cepas de rotavirus en los meses previos (a excepción de Octubre) estas fueron esporádicas.

Un total de 465 niños con gastroenteritis fueron colectadas de Julio de 1993 a Marzo de 1994. De esos niños, 140 (30%) fueron positivos para rotavirus con un pico de frecuencia de infección en Diciembre, lo cual esta de acuerdo con las registradas en otras regiones del mundo, incluyendo México (*Bishop, et al, 1991*).

El análisis del RNA de estas cepas, demostraron la presencia de 14 diferentes electroferotipos. De estos, únicamente el registrado como electroferotipo IV, fué detectado frecuentemente, y fué el único que persistió a todo lo largo del estudio. Aunque, el electroferotipo V también se hizo presente, principalmente en el período de mayor prevalencia de rotavirus (Noviembre-Diciembre).

Estudios previos en otras regiones, han demostrado que un simple electroferotipo puede predominar en una comunidad a través de años sucesivos (*Rodger, et al, 1981; Schnagl, et al, 1981*). Este conocimiento, podrá extenderse a nuestra región al ser estos, los primeros datos registrados de la variación de electroferotipos, mismos que servirán de base para conocer el comportamiento de las cepas de rotavirus detectadas a través de los años, en nuestra comunidad.

Sin embargo, un dato que consideramos importante en el estudio epidemiológico de rotavirus, es la aparición secuencial de varios electroferotipos durante el período de esta investigación; lo cual indica que las cepas de rotavirus cambian rápidamente, lo que sugiere alteraciones en el genoma viral dentro de la comunidad en infecciones naturales.

Los posibles mecanismos para que se manifieste la modificación del genoma viral y por lo tanto, la diversidad genética revelados por los patrones electroforéticos, pueden incluir la recombinación entre cepas *in vivo*, sobre todo por las coinfecciones que puede presentar los individuos en la comunidad (*Ramig, et al 1983; Kapikian, et al 1985 Desselberger, et al, 1988*). La cepa obtenida de un paciente que reveló 12 segmentos en lugar de los 11 característicos de rotavirus (figura 2, carril 13), sugiere una infección simultánea por más de una cepa. Aunque, la diversidad en los modelos de migración también puede ser una manifestación de la modificación del largo de los segmentos de RNA durante una infección.

Varios estudios han reportado la presencia de mezcla de electroferotipos de rotavirus en pacientes diarreicos. La evidencia sugiere que es significativa la interacción entre diferentes electroferotipos en pacientes coinfectados en condición natural, por lo que es importante determinar las condiciones epidemiológicas que apoyen tales fenómenos.

Por otro lado, de los 14 diferentes electroferotipos detectados entre las muestras positivas, algunos presentaron variaciones mínimas sobre todo en los segmentos 2 y 3 (que codifican para las proteínas VP2 y VP3 respectivamente) que no están relacionadas con la capacidad antigénica; mientras que en otros, la mayor frecuencia de variación se dió entre los segmentos 7, 8 y 9, los cuales si están involucrados en la expresión de epitopes de superficie, que inducen una respuesta inmunológica efectiva en la neutralización del virus (*Beards, et al, 1982; Nakagomi, et al, 1987; Snodgrass, et al, 1990; Dunn, et al, 1993*).

En este respecto, la diversidad antigénica que existe entre rotavirus son importantes implicaciones en las estrategias a seguir, para la elaboración de una vacuna efectiva.

Por tal motivo fué interesante para nosotros determinar las variaciones en los segmentos que codifican para las proteínas de superficie.

Así, aunque está demostrado que el segmento 9 codifica para la proteína de superficie VP7 (*Both, et al, 1983; Mason, et al, 1983*), en ocasiones dependiendo de la cepa, este segmento génico puede migrar también en la posición 7 u 8, por lo que fué

importante analizar esta variedad en las cepas recuperadas de casos de infección sintomática.

En este sentido, nosotros encontramos 7 electroferotipos los cuales presentaron diferencias muy marcadas en la migración de estos segmentos, inclusive esta se reflejó en la banda 9, ya que en algunos electroferotipos (figura 5 carril 4 y 5) la desigualdad en migración de esta banda con respecto al electroferotipo predominante (figura 5 carril 3) fué muy significativa, probablemente por tratarse de cepas que presentan menor número de nucleótidos en su secuencia.

Ya que actualmente se han preparado anticuerpos monoclonales altamente específicos contra antígenos de serotipo y subgrupo (*Brüssow, et al, 1991; Brüssow, et al, 1992; Gerna, et al, 1992; Gouvea, et al, 1994*), nosotros realizamos una prueba inmunoenzimática para determinar si las variaciones electroferotípicas se reflejaban en las proteínas de superficie.

En primer lugar, la mayoría de las muestras analizadas 118 de 140, fueron identificadas tanto para serotipo como subgrupo, donde el 96% demostraron ser serotipo 3 subgrupo II, por lo que los diferentes electroferotipos encontrados demuestran que los cambios genómicos determinados por electroforesis, no pueden ser usados para la identificación del serotipo G de una cepa viral; aunque la complementación de estas técnicas moleculares y serológicas, pueden utilizarse en evaluar tanto la caracterización, así como las alteraciones de las cepas de rotavirus durante un brote epidémico. Además la detección de nuevos electroferotipos en una comunidad, puede predecir la circulación de serotipos diferentes, que puedan jugar un papel importante en futuras epidemias.

Por otro lado, 22 muestras que demostraron la presencia de rotavirus por la determinación del electroferotipo, no pudieron ser identificadas para serotipo G y subgrupo, lo anterior podría deberse a que las cepas en cuestión, no fueran partículas completas con ausencia de la cápside externa donde se encuentran los epitopes reconocidos por los anticuerpos específicos de serotipo, o quizás porque aunque se tratara de partículas completas, los anticuerpos monoclonales usados no reconocieran los determinantes antigénicos, por lo que no se puede excluir entre nuestras muestras,

la presencia de rotavirus con propiedades antigénicas distintas, ya que inclusive tres cepas de rotavirus no identificadas por ELISA mostraron un modelo electroforético diferente a los rotavirus grupo A con fuerte parecido a rotavirus porcino grupo C.

Por otro lado, la literatura registra la presencia entre la comunidad infantil de cepas de rotavirus que producen infecciones asintomáticas (*Hoshino, et al, 1985*). Nosotros analizamos 797 muestras de heces de niños sin síntomas de diarrea, colectados a los largo de 2 años, en las cuales encontramos 55 casos positivos solamente en los niños menores de 2 años.

Al realizar un análisis de los electroferotipos y su comparación con los encontrados en las cepas sintomática, detectamos una fuerte diferencia en el patrón de corrimiento. Lo que puede indicar que existe una relación entre el patrón electroforético y la capacidad de producir enfermedad. Sin embargo, un análisis exhaustivo de la comparación de los electroferotipos encontrados en la misma región durante el mismo lapso de tiempo, es necesario para apoyar esta hipótesis. Situación que no se dió en el presente estudio, ya que durante el brote epidémico, la cantidad de muestras colectadas entre la población sin síntomas diarreicas fué baja.

Ahora bien, ya que los estudios actuales han demostrado variaciones electroferotípicas y la presencia de 14 serotipos G que circulan éntre la comunidad produciendo infecciones tanto sintomáticas como asintomáticas, los esfuerzos actuales van encaminados a la determinación de la variabilidad de epitopes presentes o relacionados a la otra proteína de superficie de rotavirus: VP4.

En este sentido, en el presente estudio se determinó esta variabilidad utilizando 58 muestras diarreicas que previamente se caracterizaron en electroferotipos o serotipos G, donde se incluían los 13 electroferotipos con patrón característico de rotavirus grupo A. Nosotros pudimos caracterizar 48 de estas cepas como serotipo P1A, demostrando además heterogeneidad de epitopes en la proteína VP4, ya que 41 cepas reaccionaron con los 3 anticuerpos utilizados que reconocen epitopes de este serotipo (1A10, 2A3, 2G1), 6 reaccionaron con 1A10, 2A3, y 1 con 1A10, 2G1. Aunque también encontramos en este primer estudio en nuestra comunidad, que el serotipo P predominante fué P1A, ya que representó el 83% de las cepas tipificables.

El hecho de que no todas las cepas de rotavirus fueron reconocidas por los anticuerpos 2A3 y 2G1, indica que existe diversidad de epitopes dentro de la proteína VP4 con serotipo P1A. Ya que está demostrado que todos esos anticuerpos presentan actividad neutralizante, sería importante determinar cuál o cuáles epitopes dentro de VP4 son inmunodominantes en una infección natural, ya que previos resultados en este sentido, han demostrado que una respuesta inmune primaria en infecciones con rotavirus es una propiedad intrínseca de la cepa de virus. Por lo que es importante estudiar la diversidad y distribución de los epitopes presentes dentro de varios serotipos P y evaluar la respuesta inmune específica de estos epitopes en niños infectados en forma natural.

Por otro lado, aun y cuando la mayoría de las 58 cepas se caracterizaron como serotipo P1A, 10 cepas de rotavirus incluídas en la tipificación de serotipo P, donde se encontraban 9 serotipos G3, SGII y un serotipo G2, SGI+II, no fueron reconocidas por los anticuerpos monoclonales de serotipo utilizados.

Sin embargo, ya que no se puede descartar la posibilidad de que estas cepas no presentaran la proteína VP4, se procedió a utilizar un anticuerpo que presenta reacción cruzada entre varios serotipos P. El hecho de que 9 de estas cepas fueron reconocidas por este anticuerpo donde además se encontraba el único serotipo G2, sugiere que esos virus puedan pertenecer a un serotipo P conocido pero no identificado por el panel de anticuerpos utilizados, como por ejemplo P1B para el caso del serotipo G2, o representar un nuevo serotipo P, lo cual podría contestarse al realizar la determinación del genotipo VP4 de esas cepas.

CONCLUSIONES

1. Existe variabilidad de electroferotipos de rotavirus en el área metropolitana de Monterrey, N.L.
 2. existe prevalencia de rotavirus entre la población sin gastroenteritis menores de 2 años (7%)
 3. La prevalencia de rotavirus entre la población de neonatos es relativamente baja (0.2%)
 4. El patrón electroforético de los casos asintomáticos son diferentes al de los casos diarreicos.
 5. Existe variabilidad de serotipos G en el área de estudio
 6. El serotipo VP7 predominante fue serotipo G3
 7. El serotipo P predominante fue P1A
-
8. Existe heterogeneidad de epitopes sobre la proteína VP4 del serotipo P1A
 9. El epitope con mayor prevalencia entre las cepas P1A fue 1A10
 10. La cepa de rotavirus predominante fue P1A, G3

REFERENCIAS

1. Beards, G.M. 1982. Polymorphism of genomic RNAs Within rotavirus serotypes and subgroups. *Archives of Virology*. 74:65-70.
2. Bern, C., J. Martinez, I. de Zoysa, and R.I. Glass. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. *Bull. W.H.O.* 70: 705-714.
3. Bishop, R.F., L.E. Unicomb, and G. L. Barnes. 1991. Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973-1989. *J. Clin. Microbiol.* 29: 862-868.
4. Both, G.W. J.S. Mattick, A.R. Bellamy. 1983. Serotype-specific glycoprotein of simian 11 rotavirus: coding assignment and gene secuencie. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.80:3091-3095.
5. Browning, G.F., T.A. Fitzgerald, R.M. Chalmers, and D.R. Snodgrass. 1991. A novel group A rotavirus G serotyp: serological and genomic characterization of equine isolate F123. *J.Clin. Microbiol.* 29: 2043-2046.
6. 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. Clinical Microbiology*. 30:911-914.
7. 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. Clinical Microbiology*. 29:869-873.
8. Coulson, B.S., J.M.Tursi, W.J.McAdam, and R.F.Bishop. 1986. derivation of neutralizing monoclonal antibodies to human rotaviruses and evidence that an immunodominant neutralization site is shared between serotypes 1 and 3. *Virology* 30: 302-312.
9. Chiba, S., T. Yocoyama, S. Nakata, Y.Morita, T. Urasawa, K. Taniguchi, S.Urasawa, and T. Nakao.1986.Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet* ii: 4517-4521.
10. Desselberger, U.1988. Molecular epidemiology of rotaviruses *Immun. Infekt.* 16:182-188.
11. Dunn, S.J., R.L. Ward, M.M. McNeal, T.L. Cross, and H.B. Greenberg. 1993. Identification of a new neutralization epitope on VP7 of human serotype 2 rotavirus and evidence for electropherotype differences caused by single nucleotide substitutions. *Virology* 197:397-404.

12. Dyall-Smith, M.L., I. Lazdins, G.W. Tregear, I.H. Holmes. 1986. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 3465-3468.
13. Dunn, S.J., H.B. Greenberg, R.L. Ward, O. Nakagomi, J.W. Burns, P.T. Vo, K.A. Pax, M. Das, K. Gowda, and C. Durga Rao. 1993. Serotypic and genotypic characterization of human serotype 10 rotaviruses from asymptomatic neonates. *J.C. Microbiol.* 31:165-169.
14. Edelman, R. 1987. Perspective on the development and deployment of rotavirus vaccin. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6: 704-710.
15. Elias, M.M. (1977). Separation and infectivity of two particle types of human rotavirus. *J. Gen. Virol.* 37: 191-194.
16. Ericson, B.L., D.Y. Graham, B.B. Mason, H.H. Hanssen, and M.K. Estes. 1983. Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA11. *Virology* 127: 320-332.
17. Estes, M.K. (1990) in *Virology (2nd edn)* (Fields, B.N. et al., eds), pp. 1329-1352, Raven Press.
18. Estes, M.K, and Cohen. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53:410-449.
19. Gerna, G., A. Sarasini, M. Parea, S. Arista, P. Miranda, H. Brúsow, Y. Hoshino, and J. Flores. 1992. Isolation and Characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *J. Clinical Microbiology.* 30:9-16.
20. Gouvea, V., L. de Castro, M. do C. Timenetsky, H. Greenberg, and N. Santos. 1994. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in brazilian children. *J. Clinical Microbiology.* 32:1408-1409.
21. Gorziglia, M., K. Nishikawa, Y. Hoshino, and K. Taniguchi. 1990. Similarity of the outer capsid protein VP4 of the Gottfried strain of porcine rotavirus to that of asymptomatic human rotavirus strains. *J. Virol.* 64: 414-418.
22. Gorziglia, M., K. Green, K. Nishikawa, K. Taniguchi, R. Jones, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock. 1988. Sequence of the four genes of rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J. Virol.* 62: 2978-2984.
23. Gouvea, V., N. Santos, and M. do C. Timenetsky. 1994. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1338-1340.
24. Gouvea, V., N. Santos, and M. do C. Timenetsky. 1994. VP4 Typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1353-1337.

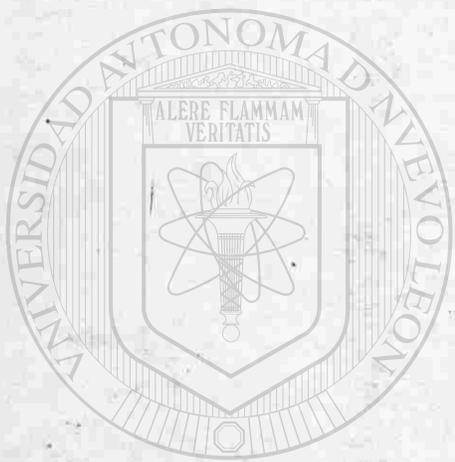
25. Green, K.Y., Y. Hoshino, and N. Ikegami. 1989. Sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes. *Virology*. 168: 429-433.
26. Green, K.Y., K. Midthun, M. Gorziglia, Y. Hoshino, A.Z. Kapikian, and R. Chanock. 1987. Comparison of the amino acid sequences of the major neutralization protein of four human rotavirus serotypes. *Virology*. 161: 153-159.
27. Green, K.Y., J.F. Sears, K. Taniguchi, et al. 1988. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. *J. Virol.* 62: 1819-1823.
28. Greenberg, H., V. McAuliffe, J. Valdesuso, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalika, y. Hoshino, and N. Singh. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39: 91-99
29. 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 rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8701-8704.
30. Hoshino, Y., R.G. Wyatt, J. Flores, K. Midthun, and A. Z. Kapikian. 1985. Serotypic Characterization of rotaviruses derived from asymptomatic human neonatal infections. *J. Clin. Microbiol.* 21: 425-430.
31. 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.

32. 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. ®
33. Hoshino, Y. and Kapikian, A.Z. 1994. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 185:179-227.
34. Isa, P. and D.R. Snodgrass. 1994. Serological and genomic characterization of equine rotavirus VP4 proteins identifies three different P serotypes. *Virology*. 201: 364-372.
35. Kabcenell, A.K., and P.H. Atkinson. 1985. Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *J. Cell Biol.* 101: 1270-1280.
36. Kalika, A.R., H.B. Greenberg, R.T. Espejo, J. Flores, R.G. Wyatt, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock. 1981. Distinctive ribonucleic acid pattern of human rotavirus Subgroups 1 y 2. *Infection and Immunity* 33: 958-961.

37. Kantharidis, P., M.L. Dyal-Smith, and H.I. Holmes. 1987. Marked sequence variation between segment 4 genes of human RV-5 and simian SA11 rotaviruses. *Arch. Virol.* 93:111-121.
34. Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. (1990) in *Virology* (2nd edn) (Fields, B.N. et al., eds), pp. 1353-1404, Raven Press.
35. Kapikian, B.S. Coulson, R.F. Bishop, H. B. Greenberg, G. Gerna, and G. M. Schiff. 1991. Reactivities of serotyping Monoclonal Antibodies With culture-adapted human rotavirus. *J.C. Microbiol.* 29: 449-456.
36. Lindsay, D.A., S.L. Vonderfecht, and Joseph J. Eiden. 1994. Group B rotavirus VP2: Sequence analysis, expression, and gene coding assignment. *Virology* 199: 141-150.
37. Liu, M., P.A. Offit, M.K. Estes, 1988. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology.* 163: 26-32.
38. Lopez, S., and C.F. Arias. 1987. The nucleotide sequence of the 5' and 3' ends of rotavirus SA11 gene 4. *Nucleic Acid Res.* 15: 4691.
39. Maass, D.R. and P.H. Atkinson. 1994. Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues. *J. Virology.* 68:366-378.
40. Mackow, E.R. R.D. Saw, S.M. Matsui, P. Vo. D.A. Bemfield, H.B. Greenberg. 1988. Characterization of homotypic and heterotypic VP7 neutralization sites of rhesus rotavirus. *Virology.* 165: 511-517.
-
41. Mason B. B., D.Y. Graham, M.K. Estes. 1983. Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.* 46:413-423.
42. Matsui, S.M. Mackow, E.R. Greenberg H.B. 1989. The molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.* 36: 181-214.
43. Nakagumi, O., T. Nakagomi, Y. Hoshino, J. Flores, and A. Z. Kapikian. 1987. Genetic analysis of a human rotavirus that belongs to subgroup I but has an RNA pattern typical of subgroup II human rotaviruses. *J. Clinical Microbiology.* 25:1159-1164.
44. Noriega, L.P., C. F. Arias, S. Lopez, F. Puerto, D.R. Snodgrass, K. Taniguchi, and H. B. Greenberg. 1990. Diversity of rotavirus serotypes in mexican infants with gastroenteritis. *J. Clinical Microbiology.* 28:1114-1119.
45. Pedley, S., J. C. Bridger, J. F. Brown, and M. A. McCrae. 1983. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *J. Gen. Virology* 64:2093-2101.

46. Prasad, B.V., G.J. Wang, J.P.M. Clerx, W. Chiu. 1988. Three - d imensional structure of rotavirus. *J.Mol. Biol.* 199: 269-275.
47. Raming, R.F.1983. Genetic studies with simian rotavirus S.A.11. In: Compans, R. W. Bishop D.H.L. , eds. *Double-stranded RNA viruses*. New York: Elsevier, 1983:321-327.
48. Rodger D. Schnagl and Ian H. Holmes. (1976).Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (Rotavirus). *Journal of Virology* 19: 267-270.
49. Rodger, S. M., R.F. Bishop, C. Birch, B. McLean, and I. H. Holmes. 1981. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. Clinical Microbiology.* 13:272-278.
50. Rosen, B. I., A. V. Parwani, S. Lopez, J. Flores, and L. J. Saif. 1994. Serotypic differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. *J. Clin. Microbiol.* 32:311-317.
51. Schanagl, R. D., S. M. Rodger, and I. H. Holmes. 1981. Variation in human rotavirus electropherotypes occurring between rotavirus gastroenteritis epidemics in Central Australia. *Infect. Immun.* 33:17-21.
52. Sereno, M.M., and M. I. Gorziglia. 1994. The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type. *Virology.* 199: 500-504.
53. Snodgrass, D.R., T. Fitzgerald, I. Campbell, F.M.M. Scott, G.F. Browning, D. L. Miller, A.J. Herring, and H.B. Greenberg. 1990. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *J.Clinical Microbiology.* 28:504-507.
54. Snyder, J.D. and Merson, M.H. (1982) *Bull. W.H.O.* 60: 605-613
55. Steel, H.M., S. Garnham, G.M. Beards, and D.W.G. Brown. 1992. Investigation of an outbreak of rotavirus infection in geriatric patients by serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). *Journal of medical virology.* 37:132-136.
56. Taniguchi, K., Y. Morita, T. Urasawa, S. Urasawa. 1987. Cross - reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: Analysis with monoclonal antibodies and antigenic variant. *J. Virol.* 62: 1726-1730.
57. Taniguchi, K., T. Urasawa, N. Kobayashi, M. Gorziglia, and S. Urazawa. 1990. Nucleotide secuencia of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. *J. Clin. Microbiol.*

58. Taniguchi, K., W.L. Maloy, K. Nishikawa, et al. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J. Virol.* 62:2421-2426.
59. Taniguchi, K., T. Urasawa, N. Kobayashi, M. U. Ahmed, N. Adachi, S. Chiba, and S. Urasawa. 1991. Antibody reponse to serotype-specific and cross-reactive neutralization epitopes on VP4 and VP7 after rotavirus infection or vaccination. *J. Clin. Microbiol.* 29:483-487.
60. Taniguchi, K., Y. Hoshino, K. Nishikawa, et al. 1988. Cross-reactive and serotype specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus: nucleotide sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 62: 1870-1874.
61. Taniguchi, K., T. Urasawa, and S. Urasawa. 1994. Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains. *Virology.* 200: 390-400.
62. Walsh, J.A. and Warren, K.S. (1979) *N. Engl. J. Med.* 301: 967-974
63. Ward, R. L. M. M. McNeal, J.D. Clemens, D.A. Sack, M. Rao, N.Uda, K.Y. Green, A.Z.
64. Woode, G.N. 1976. Pathogenic rotaviruses isolated from pigs and calves. *CIVA ound. Symp.* 42: 251-260.
65. Woode, G.N. and C.F. Crouch. 1978. Naturally occurring and experimentally induced rotavirus infections of domestic and laboratory animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173:522-526.
-
66. Woods, P. A., J. Genetsch, V. Gouvea, L. Mata, A. Simhon, M. santosham, Zhi-S. Bai, S. Urasawa, and R.I. Glass. 1992. Distribution of serotypes of human rotavirus in different populations. *J. Clin. Microbiol.* 30: 781-785.
67. Wyatt, R.G., A.R. Kalica, C.A. Mebus, H.W. Kim, W.T. London, R.M. Chanock and A.Z. Kapikian. 1978. Reovirus-like agents (rotavirus) associated with diarrheal illness in animals and man. *Perspect. Virol.* 10: 121-145.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®