

11661
3
2er

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

*CARACTERIZACION ANTIGENICA Y MOLECULAR DEL ROTAVIRUS PORCINO YM,
UN POSIBLE NUEVO SEROTIPO DE ROTAVIRUS*

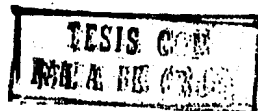
Tesis que para obtener el grado de
MAESTRO EN MICROBIOLOGIA

P R E S E N T A :

ALBERTO CICERON RUIZ MORALES

ASESOR: DR. CARLOS F. ARIAS ORTIZ

1 9 8 8





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

| | pag. |
|----------------------|------|
| INTRODUCCION | 1 |
| OBJETIVOS | 15 |
| MATERIALES Y METODOS | 16 |
| RESULTADOS | 44 |
| DISCUSION | 64 |
| LITERATURA CITADA | 69 |

INTRODUCCION

El problema de las gastroenteritis agudas es un tema de considerable importancia debido a que representa una de las principales causas de mortalidad entre la población infantil.

En 1982, Snyder y Merson con datos de estudios realizados en Africa, América Latina y Asia (excluyendo a China), estimaron que anualmente ocurren entre 744 y 1000 millones de episodios diarreicos y alrededor de 4.6 millones de muertes por esta causa, en niños menores de 5 años (54). Por ello, la Organización Mundial de la Salud ha desarrollado un Programa para el control de las enfermedades diarreicas, con el objeto de disminuir los altos índices de morbilidad y mortalidad. Cabe mencionar, que este problema no es exclusivo de la especie humana sino que afecta también a especies económicamente importantes, como el ganado bovino y el porcino entre otras.

Los rotavirus son ahora ampliamente reconocidos dentro de los agentes etiológicos causantes de gastroenteritis viral aguda, tanto en humanos como en diversas especies animales (23). Estos virus afectan principalmente a mamíferos recién nacidos, donde el grado de deshidratación debido a la diarrea llega a ser considerable y provoca en la mayoría de los casos la muerte.

Aunque los rotavirus se habían encontrado desde 1963 en el lavado intestinal de un mono vervet (41), fueron realmente considerados cuando se descubrió que infectaban a la especie humana. Actualmente, debido a su importante papel como agente etiológico de las diarreas, la investigación en rotavirus se ha encaminado hacia el conocimiento de su patogenia, así como de sus características moleculares y antigénicas (36). Todo esto, con el fin de elaborar inmunógenos capaces de inducir protección pasiva o activa contra estos virus, ya sea mediante la utilización del virus completo o mediante el uso de proteínas virales producidas por métodos de ingeniería genética.

En 1973, Bishop et al, al examinar al microscopio electrónico biopsias duodenales de niños hospitalizados que padecían gastroenteritis aguda no bacteriana, encontraron y describieron partículas virales similares a orbivirus (8). Investigaciones posteriores realizados por otros autores refirieron a los rotavirus como "virus de la gastroenteritis infantil" o como "agentes similares a reovirus" (21,50).

En 1974, Flewett et al propusieron el nombre de rotavirus, del latín rota (rueda), a este nuevo grupo de virus, ya que al microscopio electrónico las partículas virales completas, formadas por una doble cápside, tienen la apariencia de una rueda de carreta donde las proyecciones de la cápside interna sugieren la apariencia de rayos que sostienen un ligero borde liso de cápside externa (22). En este tipo de preparaciones es común observar tanto partículas completas (con doble cápside) de 70 nm de diámetro, como partículas virales que solo poseen la cápside interna con una periferia rugosa y de aproximadamente 60 nm de diámetro (33). Recientemente se ha descrito, al analizar los virus al microscopio electrónico por el método de criofractura, la presencia de peplómeros de aproximadamente 6 nm de largo, los cuales se proyectan de la superficie de la capa externa hacia el medio (61). Las partículas de doble y de una sola cápside con densidades de 1.36 gr/cm^3 y 1.38 gr/cm^3 , respectivamente, se pueden separar por centrifugación en

gradientes de densidad de cloruro de cesio. Por ello, este método es comúnmente utilizado para obtener en forma pura cualquiera de las formas del virus.

En todas las especies de rotavirus la infectividad viral parece depender de la presencia de la cápside externa, la cual se pierde cuando las partículas son tratadas con agentes quelantes de calcio, como el EDTA y EGTA. Sin embargo, durante el ciclo replicativo del virus, la remoción de esta cápside es necesaria para que la RNA polimerasa endógena pueda activarse y transcribir el genoma viral para así generar la progenie (33).

El genoma de los rotavirus está compuesto por 11 segmentos de ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc), cuyos tamaños van desde 660 hasta 3700 pb. Estos segmentos pueden ser separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida, dando un patrón electroforético característico, conocido como electroferotipo (Fig. 1). En algunas cepas de rotavirus humano, los segmentos 10 y 11 migran ligeramente menos que lo usual dando un electroferotipo "corto". Sin embargo, en estudios epidemiológicos se ha visto que es más común encontrar cepas con electroferotipo "largo" (Fig. 1).

Por las características morfológicas y fisicoquímicas que presentan los rotavirus, se encuentran agrupados como un género más de la familia Reoviridae (40).

En la literatura se han reportado infecciones por rotavirus en diversas especies animales, sin embargo, el más estudiado es el rotavirus de simio SA11. Esto se debió

originalmente a la facilidad para crecerlo en cultivo de células. Posteriormente se describió que el rotavirus SA11 es muy similar antigenicamente a las cepas de rotavirus humanos pertenecientes al serotipo 3 (ver más adelante). Estas características lo han hecho atractivo como modelo de estudio, y por consecuencia, la mayor parte de la información existente sobre rotavirus está basada en este modelo. Los rotavirus humanos han presentado mayores dificultades para su adaptación en cultivo de células, y aunque existe en la literatura información sobre estrategias de cultivo, aún no se considera una práctica rutinaria (35).

Aunque los datos aportados por los primeros estudios bioquímicos sobre las proteínas de rotavirus no eran muy claros, actualmente se conoce con más detalle el asignamiento génico de proteínas tanto estructurales como no estructurales, así como las funciones de algunas de las proteínas estructurales (cuadro 1).

Cuadro 1. Características de las proteínas codificadas por los once segmentos de RNA del rotavirus de sinfo SA11.

| Segmento | Peso molecular estimado del producto de traducción | Modificación postraducciona | Peso molecular estimado del producto modificado | localización en la capsida y función |
|----------|--|-----------------------------|---|---|
| 1 | 125,000 (VP1) | ninguna | ninguno | interna (2% de la CI) |
| 2 | 94,000 (VP2) | ninguna | 88,000 | interna (15% de la CI) |
| 3 | 88,000 (VP ³) | ninguna | ----- | interna (0.5% de la CI) |
| 4 | 88,000 (VP3) | rompiamiento | 60,000 28,000 | externa (aumento de la infectividad, hemaglutinina y antígeno menor de neutralización) |
| 5 | 53,000 (NS) | ninguna | ninguno | ----- |
| 6 | 41,000 (VP6) | ninguna | ninguno | interna (51% de la CI, antígeno de subgrupo, transcriptasa viral ?) |
| 7 | 34,000 (NS) | ninguna | ninguno | ----- |
| 8 | 35,000 (NS) | ninguna | ninguno | ----- |
| 9 | 37,000 (VP7) | glicosilado | 38,000 (VP7) | externa (antígeno mayor de neutralización, serotipo, interacción con receptor de la célula) |
| 10 | 20,000 (NS) | glicosilado | 29,000 (NS) | ----- |
| 11 | 26,000 (VP9, NS ?) | si, desconocida | 27,000 (VP9) | externa ? |

VP= Proteína viral estructural, NS= Proteína no estructural, CI= Capsida interna

& Polipéptido descrito recientemente por Liu et al (47), designado como VP3 por ser el producto del segmento 3, y proponiendo como VP4 al producto del segmento 4.

Cuando se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida extractos de células infectadas con el rotavirus SA11, se pueden observar cuando menos once diferentes proteínas que no se observan en células no infectadas (6). Seis de ellas, denominadas VP1, VP2, VP3, VP4, VP5 y VP6 son incorporadas en la doble cápside del virus, mientras que las otras no están presentes en el virus completo, y por lo tanto son denominadas proteínas no estructurales. De las seis proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP6 conforman la cápside interna del virus, mientras que VP4 y VP5 conforman la cápside externa (33,47).

Experimentos utilizando anticuerpos monoclonales contra VP6 han permitido identificarla como la portadora de epítopos comunes entre rotavirus aislados de distintas especies (29,32,35). Por otro lado, se ha demostrado por análisis serológico de virus que han intercambiado genes de una cepa con otra (rearrreglo genómico), que cuando menos existe un epítipo no común en el polipeptido VP6 cuando se compara entre diferentes cepas. Esto último ha hecho clasificar a los rotavirus en dos grandes subgrupos, denominados subgrupo I y subgrupo II. Interesantemente, las cepas de rotavirus humanos clasificados como subgrupo I corresponden a cepas con electroferotipo "corto" y de serotipo 2; mientras que las de subgrupo II corresponden a cepas con un electroferotipo "largo" y serotipo 1, 3 o 4. No existe una explicación clara entre la posible correlación,

subgrupo-electroferotipo-serotipo. Como excepción, recientemente se ha descrito la caracterización de un rotavirus humano del subgrupo I, electroferotipo largo, y perteneciente al serotipo 3 (37).

Para el caso de rotavirus animales este comportamiento es diferente, ya que todos los reportados con la excepción de una cepa bovina y dos de conejo descritas recientemente (60), tienen electroferotipos "largos", y pertenecen al subgrupo I (excepto los rotavirus porcinos Gottfried y SB-1A, y la cepa R2 de conejo pertenecientes al subgrupo II).

Con relación a las proteínas de cápside externa VP3 y VP7, se sabe que en ellas se encuentran determinantes antígenicos que inducen en el hospedero la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de inhibir la infección viral in vivo (7,30,49,62). Esto se ha demostrado mediante pruebas de neutralización, utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales que reconocen ambas proteínas (49). VP3, de 88Kd de peso molecular, además de ser la hemaglutinina viral, es responsable de provocar un aumento de la infectividad del virus cuando este es tratado con tripsina (19,20). Se ha demostrado que al incubar partículas completas de rotavirus SA11 en presencia de tripsina, VP3 sufre un corte proteolítico que genera dos polipeptidos de 60Kd y 28Kd, denominados VP5 y VP8 respectivamente (19). Puesto que la tripsina actúa específicamente sobre el virus y no sobre la célula, es probable que las terminales de uno o ambos polipeptidos generados activen

un paso temprano de la replicación viral y como consecuencia ocurra el aumento de la infectividad que parece ser común en todas las especies de rotavirus.

Con el conocimiento de la secuencia deducida de aminoácidos para la proteína VP3 de SA11 y a través de la secuenciación directa del extremo NH₂ terminal de VP5 y VP8, se ha precisado la región de corte con tripsina responsable del aumento de la infectividad. Los dos sitios potenciales de corte están localizados en las argininas en posición 241 y 246 de la secuencia completa (38). Estudios más específicos, comparando las secuencias de aminoácidos en la región de corte obtenidas de rotavirus de origen humano y animal, muestran que las argininas están conservadas en las mismas posiciones (39). Esto sugiere que el mecanismo por medio del cual se lleva a cabo este aumento de la infectividad es el mismo en todas las especies de rotavirus.

Por otro lado, la glicoproteína VP7, de 37Kd de peso molecular, codificada por el gene 9 en el rotavirus SA11, es quizá la más atractiva para producir inmunogenos con tecnología de ADN recombinante con el fin de obtener vacunas para proteger contra la diarrea causada por rotavirus. Esto se refleja en la gran cantidad de información acerca de la estructura primaria de VP7 obtenida de rotavirus pertenecientes a diferentes serotipos, y en los esfuerzos que han llevado a su síntesis con diferentes sistemas de expresión como E. coli, BV40 y el virus vaccinia (2,6). El gene que codifica para VP7, está compuesto de 1062 nucleótidos, con 2 posibles sitios en fase para el inicio de

traducción, localizados en los nucleótidos 49-51 y 136-138 respectivamente y un codon de terminación en los nucleótidos 1027-1029 (4,26). Recientemente, se ha demostrado que en el rotavirus de simio SA11 los dos sitios de iniciación son funcionales esto se ha hecho por estudios con sistemas de traducción in vitro utilizando mRNA del gene 9, los productos de traducción a partir de ambos sitios de iniciación fueron determinados por ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos para VP7 (12,18). Considerando el primer sitio de iniciación, el gene codifica para una glicoproteína de 326 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 37Kd, mientras que la proteína sintetizada utilizando el segundo sitio de iniciación poseería un peso molecular aproximado de 35.3 Kd (12). Cada uno de los potenciales sitios de iniciación es seguido por una secuencia que codifica para una región de aminoácidos hidrofóbicos, que probablemente participan en el transporte de VP7 a través del retículo endoplásmico y finalmente se ensamble en la superficie del virus (57).

VP7, además de ser el mayor antígeno de neutralización, es responsable de dar la especificidad de serotipo a los rotavirus. Por ensayos de neutralización in vitro, los rotavirus se han clasificado en siete diferentes serotipos (9,34). Los serotipos 1 y 2 están representados exclusivamente por rotavirus humanos; los serotipos 3 y 4 involucran tanto rotavirus humanos como de animales; finalmente los serotipos 5, 6 y 7 agrupan exclusivamente rotavirus de especies animales. Recientemente, se han descrito tres diferentes cepas de rotavirus, denominadas

69M y WI61 (humanos) y B223 (bovino) (1,14,43) las cuales poseen características serológicas distintas a las que presentan los serotipos del 1 al 7 por lo que se han propuesto como posibles serotipos 8, 9 y 10 respectivamente (ver cuadro 2).

Hace aproximadamente 3 años, en nuestro laboratorio se aisló una cepa de rotavirus a partir del contenido intestinal de un lechón con diarrea. Este virus, designado YM, fue adaptado a crecer en una línea celular (MA104) derivada de células epiteliales de riñon de mono en presencia de pancreatina, de tal manera, que puede obtenerse en cantidades suficientes para hacer estudios moleculares y bioquímicos del virus. Experimentos preliminares han demostrado que el virus cultivado mantiene su patogenicidad en cerdos recién nacidos. El poder cultivar este virus con facilidad in vitro, y el hecho de que conserve su patogenicidad in vivo, lo hacen un candidato atractivo como modelo de estudio ya que nos ofrece la posibilidad de contar con un modelo animal apropiado para hacer experimentos de protección in vivo con los posibles inmunogenos que se desarrollen en el laboratorio. Por ello nos hemos encaminado al estudio bioquímico y molecular de este virus, con la finalidad a largo plazo de poder sintetizar las proteínas de superficie VP3 y VP7 en sistemas eucariotes y/o procariotes, por medio de técnicas de ingeniería genética, y así probar su capacidad para inducir protección contra la diarrea causada por rotavirus.

Cuadro 2. Serotipos de rotavirus determinados por ensayos de neutralización *in vitro*.

| Serotipo | Rotavirus humanos (copas prototipos) | Rotavirus animales (copas prototipo) |
|----------|---|--|
| 1 | Ma, KB, D, BB | ---- |
| 2 | B6-1, S2, KMM, 390 | ---- |
| 3 | P, H, Maik 57/14, No, Ito, asamoto, YD, McR2 | SA11, MM10006 (sinico), CU-1 (canino), Taka (felino), H-2 (equino) |
| 4 | BT3, BT4, Homokawa Nachi | SB-2, Gottfried (porcinos) |
| 5 | ---- | NI (equino), DSU (porcino) |
| 6 | ---- | NDV, UK (bovinos) |
| 7 | ---- | Ch 2 y Ty 1 (aves) |
| 8 | 69H, B37 | ---- |
| 9 | NI-61, F45 | ---- |
| 10 | ---- | B223 (bovino) |

NOTA: Los serotipos 8, 9, y 10 fueron propuestos recientemente en el VII Congreso Internacional de Virología, Agosto de 1987, Edmonton, Canada.

Hasta ahora se ha logrado clonar una copia de cDNA del genoma de YM, con lo cual se obtuvo una biblioteca de aproximadamente 10,000 clonas. Esto facilita entonces el poder aislar plasmidos recombinantes que contengan insertos de DNA complementario a los genes que codifican por las proteínas VP3 y VP7 y así, a través de la secuenciación de estas clonas, poder obtener la estructura primaria de cada proteína. Esto a su vez, permitiría la construcción de copias de cDNA completas de cada gene para su posterior expresión en bacterias o en células eucariotes.

Como parte de la caracterización de este virus, para ser utilizado como modelo de estudio en el laboratorio, es importante determinar el serotipo y el subgrupo a que pertenece. Hasta ahora, en la literatura se han descrito dos tipos de rotavirus aislados de porcinos, representados por el rotavirus OSU (serotipo 5, subgrupo I) y el rotavirus Gottfried (serotipo 4, subgrupo II).

OBJETIVOS:

1. Determinar el serotipo y subgrupo del rotavirus de cerdo YM.
2. Determinar la secuencia nucleotídica del gene 9 de este virus, el cual codifica por la glicoproteína de cápside externa VP7.
3. Analizar la secuencia de aminoácidos de VP7 del rotavirus YM, deducida a partir de la secuencia de cDNA, comparandola con las secuencias de VP7s derivadas de rotavirus pertenecientes a diferentes serotipos.

MATERIALES Y METODOS

Línea celular.- Se utilizaron monocapas confluentes de células de riñon de mono rhesus adheridas a frascos de plástico de 75 cm² y 150 cm², tubos de vidrio neutro de 30 cm o cajas de 96 pozos marca (Costar). Esta línea celular, denominada MA104, es cultivada con medio esencial mínimo (MEM) con sales de Eagle, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% e incubadas a 37°C con atmosfera húmeda al 5% de CO₂.

Cepas virales.- Se utilizaron 6 cepas de rotavirus cultivables provenientes de diferentes especies animales y pertenecientes a diferentes serotipos. Cepas de humano: Wa (serotipo 1), S2 (serotipo 2) y ST3 (serotipo 4); de simio: SA11 (serotipo 3); de cerdo: OSU (serotipo 5) y de bovino: NCDV (serotipo 6). Los virus Wa, S2 y ST3 se obtuvieron de Y. Hoshino (National Institutes of Health, Bethesda, Md), el virus SA11 de H. Malherbe (Gull Laboratories, Salt Lake City), el virus OSU de L. Saif (Ohio State University, Wooster, Ohio) y el virus NCDV de R.S. Spendlove (Utah State University, Salt Lake City, Utah).

Propagación de las cepas virales.- Los diferentes virus fueron tratados con tripsina (1:250 DIFCO) a una concentración de 10 ug/ml durante 1 hora a 37°C. Posteriormente los virus se inocularon en monocapas confluentes de células MA104 en tubos de vidrio y se incubaron en cultivo rotatorio durante 1 hora.

Después de este período de adsorción, se agregaron 5 ml de MEM sin SFB y los tubos se mantuvieron a 37° C hasta que presentaron efecto citopático.

Sueros anti-rotavirus.- Los sueros anti-rotavirus contra serotipos 1, 2, 3, 4 y 6 (producidos en conejo) fueron obtenidos de L. Padilla (IMSS). Los sueros anti-OSU (serotipo 5) y anti-YM se produjeron en nuestro laboratorio, utilizando virus purificado por gradientes de CsCl: Ratones Balb/c de 2-3 semanas de edad cuyo suero presentaba un título anti-rotavirus YM menor de 1:50 en un ensayo de neutralización, fueron inmunizados por vía subcutánea con 3 inoculaciones de 50 µg de virus a intervalos de 14 y 21 días. La primera inoculación se hizo mezclando el virus con adyuvante completo de Freund's y las dos restantes con adyuvante incompleto. Una semana después de la tercera inoculación los ratones fueron sangrados en blanco y los sueros fueron titulados por ensayos de neutralización in vitro con el virus homólogo.

Cuantificación de partículas virales infecciosas por un ensayo de inmunoperoxidasa.-

1. Los virus a titular se incubaron con tripsina 10 µg/ml durante 1 hr a 37°C.
2. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas 1:2 del virus en MEM sin SFB, en microplacas estériles de 96 pozos.

3. Las diferentes diluciones del virus se utilizaron para infectar por duplicado monocapas de células MA104 en una caja de microtitulación de 96 pozos, la cual había sido previamente lavada dos veces con PBS estéril. Posteriormente esta, fue incubada a 37°C durante 1 hr.
4. El inóculo se retiró y la caja se lavó dos veces con PBS estéril.
5. Se agregó a cada pozo 200 µl de MEM sin SFB y se incubó a 37 °C durante 12 hrs.
6. El medio se retiró y nuevamente se lavó con PBS.
7. Las células se fijaron, añadiendo a cada pozo 75 µl de acetona al 80% en H₂O e incubando a 37°C durante 20 min.
8. La caja se lavó dos veces con PBS y se dejó secar.
9. Utilizando un suero anti-SA11 (producido en conejo) con un título de 1:6400 por ensayo de neutralización, se preparó un volumen apropiado de una dilución 1:1800 en PBS para agregar 50 µl a cada pozo. La caja se incubó a 37 °C durante 1 hr y posteriormente se lavó dos veces con PBS.
10. Posteriormente, a cada pozo se le agregó 50 µl de proteína A marcada con peroxidasa (Amersham), diluida 1:2500 en PBS. Se incubó a 37 °C durante 2 hrs. Posteriormente la caja fue lavada dos veces con PBS.
11. A continuación se agregaron 50 µl de una mezcla, hecha con 4 ml de buffer de acetatos 0.05 M pH 5.0; 1.5 ml de 9-amino etil carbazole (4 mg/ml de dimetilformamida) y 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30% y se incubó a 37°C durante 5-10 min.
12. La caja se lavó 4X con H₂O destilada.

13. Las células teñidas se contaron en un microscopio invertido de contraste de fases, barriendo cada pozo en forma vertical con el campo que abarca el objetivo 25X, lo cual representó aproximadamente 1/5.5 del área total del pozo.

14. Para determinar el título de infectividad viral se utilizaron los siguientes factores:

N° de células teñidas \times dilución correspondiente \times 5.5 \times 20
= N° de unidades formadoras de focos/ml (μ ff/ml).

Ensayo de neutralización in vitro de rotavirus a través de la reducción del número de unidades formadoras de focos de infección.-

1. Utilizando cajas de microtitulación se hicieron diluciones por duplicado en MEM, sin SFB de los sueros anti-rotavirus, manteniendo un volumen de 50 μ l por pozo.

2. A cada pozo se le agregó 50 μ l de una dilución de un lisado de rotavirus (homólogo o heterólogo según el caso) que había sido previamente cuantificado y conteniendo aproximadamente 550 ffu. Los virus se incubaron con los sueros a 37°C durante 1 hr.

3. A partir de este momento, se continuó con el punto 3 del protocolo de cuantificación de la infectividad viral.

4. En este ensayo se consideró como título del suero, la dilución del mismo que neutralizó al menos el 60% de los virus infecciosos (μ ff).

Criterios para serotipificar a un rotavirus.-

Para asignar un rotavirus nuevo como perteneciente a un determinado serotipo, es necesario realizar ensayos de neutralización in vitro (9,34). Se sugiere realizar neutralizaciones recíprocas, es decir, entre el rotavirus candidato contra antisueros de diferente serotipo y rotavirus de diferente serotipo contra antisuero del rotavirus candidato. Estos ensayos deben hacerse utilizando anticuerpos policlonales hiperinmunes. Durante los ensayos es necesario incluir la neutralización entre virus y antisuero homólogo ya que con este dato podrán establecerse las proporciones entre título homólogo y títulos heterólogos.

Dos virus son considerados como pertenecientes al mismo serotipo cuando la proporción título homólogo/título heterólogo, en el ensayo recíproco, es menor a un factor de 20 (34).

Características del banco de cDNA del genoma del rotavirus YM.-

DNA complementario al genoma total del rotavirus YM fue clonado en el plasmido pMT21 (I. Lopez, resultados no publicados). Este plasmido, construido por H.Huang (Washington U.), es de 1895 pares de bases y posee un gene que le confiere resistencia a ampicilina. Cuenta también con un polilinker con los siguientes sitios únicos para enzimas de restricción: Sac II, Eco RI, Ava I, Sma I, Bam HI, Sal I, Pst I, Bgl II, Xba I y Hind III (4).

Los fragmentos sintetizados de ácido desoxiribonucleico complementario de doble cadena (cDNA dc) correspondientes al genoma de rotavirus YM, se insertaron en el sitio de Eco RI

del plasmido, a través de la utilización de eslabones de Eco RI. Esto implica, que en el plasmido recombinante los dos sitios para Eco RI se conservan.

Los plasmidos recombinantes se transformaron en bacterias *E. coli* MC1061. Las células bacterianas transformadas se seleccionaron por su resistencia a ampicilina. Se obtuvieron aproximadamente 10,000 colonias, y actualmente están disponibles para los ensayos que se requieran (I. Lopez, tesis de Maestría).

Marcaje radiactivo del cDNA_{dc} por el método de "Nick Translation".-

1. Primeramente se realizó la siguiente mezcla en un tubo de plástico eppendorf de 1.5 ml.

- 0.5 μ l muestra (~100ng de cDNA_{dc})
- 1.0 μ l buffer NT 10X (0.5M Tris, 0.1M MgCl₂, 10mM Ditiotreititol y 0.1% de gelatina bacteriologica)
- 1.0 μ l 0.2 mM (dGTP, dCTP, dTTP)
- 0.25 μ l DNasa I (1 mg/ml) 1:50000 en NT buffer.
- 5 uCi de [α -³²P] dATP (Amersham)
- 1.0 μ l Polimerasa de E.coli I (5 μ / μ l)
- 4.75 μ l de agua desionizada estéril

2. La mezcla se incubó a 14°C durante 3 horas.

3. La reacción se paró con 10 μ l de solución de paro 2X (0.02M EDTA, 0.2% SDS y DNA de timo de ternera 2 mg/ml).

4. Se añadió al tubo 1 volumen de NH₄ Ac 4M y 4 volúmenes de etanol absoluto.

5. Se congeló a -70°C durante 15 minutos y se centrifugó igual tiempo en una centrifuga eppendorf (Epp) a 10,000 xg

6. El boton de DNA marcado, en el fondo del tubo se suspendió con 20 μ l de H_2O , y se repitieron los pasos 4 y 5.
7. El boton final fue ahora resuspendido con 50 μ l de una solución 10 mM Tris pH 7.5 ,0.1 mM EDTA.
8. Antes de realizar la hibridación, el cDNA dc marcado (sonda radiactiva) se desnaturalizo calentando a ebullición durante 2 minutos y despues se paso a hielo inmediatamente.

Hibridación en colonia.-

1. Bacterias recombinantes, obtenidas a partir del banco de cDNA del genoma de YM, se sembraron sobre filtros de nitrocelulosa por duplicado (Schleicher & Schuell), en cajas petri conteniendo medio luria (LB) (peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%) con agar al 2% (bactoagar). A las cajas se les añadió ampicilina (100µg/ml).
2. Las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche.
3. Las colonias bacterianas obtenidas fueron lisadas depositando uno de los filtros de nitrocelulosa (de cada duplicado) sobre papel filtro humedecido en una solución de 0.5M NaOH, 1.5M NaCl, durante 5 min.
4. Posteriormente, los filtros de nitrocelulosa se neutralizaron depositandolos sobre papel filtro humedecido con una solución 0.5M Tris pH 7.5, 1.5M NaCl por 5 min. Este paso se repetido 2 veces.
5. Despues de secar los filtros a temperatura ambiente se hornearon a 80 °C durante 2 horas para fijar el DNA de plasmido desnaturalizado a la nitrocelulosa.
6. Los filtros se lavaron con SSPE 2X (SSPE 20X: 20 mM Na EDTA, 0.11M NaOH, 0.2M NaH PO4 y 3.6M NaCl) y posteriormente con SSPE 5X para quitar los restos de bacterias lisadas.
7. Los filtros se prehibridaron a 42 °C durante 3 hr con 5 ml de la siguiente mezcla:
 - 2.5 ml SSPE 20X
 - 5.0 ml Formamida

- 0.1 ml Denhardt's 100X (2% Polivinil pirrolidona, 2% ficoll, 2% albúmina serica bovina y 0.04 % azida de sodio)
- 0.15 ml Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20%
- 0.1 ml DNA de E. coli 10 mg/ml
- 0.14 ml DNA de esperma de salmón 7 mg/ml
- 2.0 ml de H₂O

8. 4 ml de la mezcla de prehibridación fueron retirados y se agregó la sonda radiactiva desnaturalizada incubando nuevamente 42°C durante toda la noche.

9. Se retiró la solución conteniendo la sonda radiactiva, y los filtros se lavaron 2 veces con SSPE 2X a 42°C, a intervalos de 15 min.

10. Los filtros se lavaron 4 veces más con SSPE 0.2X a 42°C a intervalos de 5 minutos.

11. Los filtros se expusieron a una película fotografica Kodak X-Omat K durante 24-72 hr a -70 C.

12. Las colonias bacterianas con plasmidos con insertos que tienen secuencias complementarias a la sonda radiactiva se verán oscuras en la autorradiografía.

Purificación de plásmidos.-

1. Las bacterias con plásmido se inocularon en tubos eppendorf con 2 ml de LB con ampicilina (100µg/ml) y se incubaron a 37°C con agitación durante toda la noche.
2. Matraces con 50 ml de LB con ampicilina se inocularon con 0.5 ml de cada cultivo crecido durante la noche y se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 1 a 550nm.
3. En este momento se añadió a cada matraz 170 µg/ml de cloranfenicol (Sigma) continuando con la agitación por aproximadamente 12 horas.
4. Los cultivos se pasaron a tubos de plástico estériles de 50 ml y se incubaron en hielo durante 10 minutos.
5. Los tubos fueron centrifugados a 5,000 rpm durante 10 min en una centrifuga Beckman usando el rotor SS34.
6. Cada sedimento celular se resuspendió en 3 ml de una solución de 50 mM tris, 10% Sucrosa pH 8.5 ,80 mM EDTA.
7. A cada suspensión se agregó 4 mg de Lisozima (Sigma) y los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min.
8. Los tubos se congelaron en hielo seco y posteriormente se descongelaron a 37°C. Este procedimiento se repitió 2 veces con lo que se obtuvo un líquido viscoso y translúcido.
9. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 40,000 rpm durante 20 min a 4°C en una ultracentrifuga Beckman usando el rotor SW55.
10. El sobrenadante de cada tubo se mezcló con 1.5 ml de LiCl al 20%, 4.5 ml de isopropanol y se congeló en hielo seco.

11. El DNA de plasmido precipitado, se colectó por centrifugación a 12,000 rpm durante 20 min a 4°C en una centrifuga Beckman, usando el rotor SS34, los botones se lavaron con etanol al 70%.
12. Los botones se resuspendieron en 0.5 ml de una solución 10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA y se añadió 30 µl de RNasa A (1mg/ml hervida durante 30 minutos para inactivar DNAsas) y se incubaron los tubos a 37°C por 1 hr.
13. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de fenol bidistilado se agitaron en vortex durante 2 min y se centrifugaron en la Eppendorf durante 5 min. Se guardó la fase acuosa.
14. A la fase acuosa obtenida en el procedimiento anterior se extrajo ahora con un volumen igual de una mezcla fenol-cloroformo 1:1.
15. El procedimiento anterior fue repetido utilizando ahora un volumen igual de cloroformo.
16. A la fase acuosa recuperada se le agregó 1/10 del volumen de NaAc 2M y 2.5 volúmenes de etanol y se congelaron a -70°C durante 15 min.
17. Después de centrifugar en la Eppendorf durante 10 min los botones fueron resuspendidos con 50 µl de 10 mM Tris pH 7.5, 0.1 mM EDTA.
18. Para determinar la concentración del plasmido se midió la densidad óptica de la solución a 260nm.

Electroforesis en geles de agarosa.-

Para analizar los plasmidos obtenidos así como digestiones de los mismos con enzimas de restricción, se utilizó la electroforesis en geles de agarosa (Sea Kem, FMC). Los geles se prepararon al 0.8% o al 2% en buffer E 1X (0.04M NaAc, 0.002M EDTA, 0.04M Tris, pH 7.4 ajustado con Ac. Acético glacial). Los geles se elaboraron sobre vidrios de 7.5 cm de largo por 5 cm de ancho. Un volumen de muestra se mezcló con un volumen de buffer de cargada (10% glicerina en buffer E 1X, 0.01% de azul de bromofenol, 0.01% de Naranja G) y la electroforesis se llevó a cabo en buffer E 1X a 100 volts hasta que el colorante naranja G migró hasta el borde opuesto del gel.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 ug/ml) por 10 min y se observaron sobre un transiluminador con luz ultravioleta.

Cuando se realizó electroforesis de muestras radioactivas el gel fue expuesto a una película fotografica como se mencionó anteriormente.

Marcaje de los extremos del cADN dc con γ -³²P dATP, utilizando el fragmento klenow de la DNA polimerasa I de E. coli.-

Como los fragmentos de cDNA dc de los plasmidos recombinantes quedaron insertados en el sitio de restricción para la enzima EcoRI del plasmido pMT21 (ver características del banco de cDNA del genoma del rotavirus YM), quedaron flanqueados por un lado con un sitio de restricción de la enzima Sac II y por el otro con sitios para las enzimas AvaI, SmaI, BamHI, SalI, BolII, PstI, XbaI y HindIII. Para las digestiones de los plasmidos, las enzimas EcoRI y HindIII fueron preferencialmente utilizadas, ya

que al cortar, generan terminales 5' sobresalientes en las cuales existen timinas que pueden ser complementadas con α -³²P]dATP, al rellenar el extremo sobresaliente, polimerizando con klenow. La reacción de polimerización se llevó a cabo en un tubo eppendorf de 1.5 ml, mezclando:

- 2.0 μ l de plasmido (~1 ug)
- 1.0 μ l buffer alta sal 10X (1X: 100mM NaCl, 50mM Tris.Cl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1mM ditiotreitol).
- 0.25 μ l EcoRI (20U/ μ l) o Hind III (20U/ μ l)
- 6.75 μ l H₂O

Incubar a 37°C durante 2 horas y adicionar

- 1 μ l buffer baja sal 10X (1X: 10mM Tris.Cl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 1mM ditiotreitol).
- 0.5 μ l de 2mM (dGTP, dCTP, dTTP)
- 0.5 μ l α -³²P]dATP (5uCi) 3000Ci/mmol
- 0.2 μ l klenow (~1U)
- 7.8 μ l H₂O

Dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos y adicionar

- 1 μ l de dATP 2mM

Dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos e inactivar el fragmento klenow incubando a 70°C durante 10 minutos.

Ya que durante la clonación del genoma de YM los fragmentos de cDNA fueron insertados en el sitio de EcoRI del plasmido pMT21, en las digestiones con EcoRI se esperaba obtener 2 fragmentos marcados ambos por los dos extremos; como el pMT21 es de 1895 pb y el gene 9 de YM de 1062 pb siempre el de menor tamaño correspondería al inserto, como este inserto quedaba marcado por

los dos extremos, era necesario digerirlo nuevamente con una enzima que tuviera sitio de restricción en la secuencia del inserto, esto con el fin de generar fragmentos con un solo extremo marcado para poder secuenciarlos por el método de Maxam y Gilbert (ver adelante).

Para el caso de digestiones con HindIII el plasmido recombinante se linearizaba y quedaba marcado por los dos extremos, uno de estos extremos contenía el inserto. Como el sitio de la enzima SacII flaqueaba el otro extremo del inserto, una digestión con esta enzima separaría el inserto del plasmido.

1. A las mezclas radiactivas anteriores se les agrego; 80 μ l de H_2O , 5 μ l de NH_4Ac 4M y 250 μ l de etanol.
2. Posteriormente se congelaron a $-70^\circ C$ durante 15 minutos y se centrifugaron en la Epp por igual tiempo.
3. Los botones fueron lavados con etanol al 70% y despues de secarlos en un evaporador Savant fueron resuspendidos en 17 μ l de H_2O .
4. Al boton proveniente de la digestión con Eco RI se le agrego 2 μ l de buffer correspondiente a la enzima a utilizar, un volumen de enzima adecuado a su actividad fue tambien agregado.
5. Al pellet proveniente de la digestion con Hind III se le agrego 2 μ l de buffer L.S.10X y 1 μ l de enzima Sac II (20U/ μ l).
6. Ambas reacciones se incubaron a $37^\circ C$ durante 2 horas y se sometieron a electrofresis en un gel de agarosa bajo punto de fusion al 2% (ver electroforesis en geles de agarosa).

7. Una vez revelada la película fotografica y localizadas las bandas correspondientes a los insertos radiactivos, se hizo coincidir la película con el gel y se cortaron con una navaja los fragmentos de agarosa que contenían los insertos radiactivos.
8. A los fragmentos de agarosa obtenidos se les agregó 1 μ l de tRNA (10 μ g/ μ l) y se fundieron a 65°C durante 5 minutos .
9. A cada tubo se le agregó un volumen igual de fenol bidestilado, saturado con una solución 10mM Tris pH 7.5, 0.1mM EDTA pH 8.1. y se agitaron 2 minutos en vortex. Las fases se separaron por centrifugación en la Eppendorf durante 5 min. La fase acuosa obtenida en cada tubo fue tratada de la misma manera una vez más.
10. El punto 9 fue repetido substituyendo el fenol por una mezcla fenol-cloroformo (1:1).
11. El punto 10 fue repetido substituyendo la mezcla fenol-cloroformo(1:1) por cloroformo.
12. Considerando los volúmenes de cada sobrenadante obtenido, se agregó 0.1 volumen de NaAc 2M y 2.5 volúmenes de etanol.
13. Los tubos se congelaron a -70° C durante 15 minutos y se centrifugaron igual tiempo en una Epp.
14. Cada boton fue lavado con etanol al 70% y resuspendido en 100 μ l de NH₄Ac 0.1 M. Posteriormente se agregaron 250 μ l de etanol y el paso 13 fue repetido.
15. Los botones se lavaron con etanol al 70% y finalmente se resuspendieron en 110 μ l de H₂O.

Secuenciación por el método de Maxam y Gilbert.-

Este método permite secuenciar DNA's de cadena doble o sencilla de cualquier longitud marcado radiactivamente en un extremo con ^{32}P . El método está basado en tres reacciones químicas: Primeramente, se provoca una modificación específica para cada base. En una segunda reacción, la base modificada es removida de su azúcar y finalmente, una reacción sobre el azúcar elimina ambos fosfatos para romper la cadena de DNA. Como las dos primeras reacciones son parciales se genera un grupo de fragmentos de diferentes tamaños. Al someter estos fragmentos a electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior exposición frente a una película fotografica, el patrón de bandas puede ser leído para conocer la secuencia de nucleotidos del DNA (46).

A partir de los 110 μl de cada fragmento de DNA radiactivo se estableció el siguiente esquema de secuenciación para cada inserto.

110 μ l de DNA marcado radiactivamente por un extremo

| Tubo C | Tubo C+T | Tubo G | Tubo G+A |
|------------|------------|------------|------------|
| 25 μ l | 35 μ l | 25 μ l | 25 μ l |

L I O F I L I Z A R

Agregar a cada tubo 6 μ l de DNA de timo de ternera 0.5 μ g/ml

Adicionar

| | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 15 μ l NaCl 5M | 15 μ l H ₂ O | 200 μ l DMSbuffer | 15 μ l H ₂ O |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|

A G I T A R

Adicionar

| | | |
|------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 30 μ l Hidrazina (Kodak) | 0.5 μ l DMS | 20 μ l Ac.Fórmico |
| mezclar suavemente | (Aldrich) | (92% Baker) |
| | Agitar | Agitar |

Incubar

| | | |
|------------|-----------|-----------|
| 12 minutos | 8 minutos | 5 minutos |
|------------|-----------|-----------|

Adicionar

| | | |
|---------------------|----------------|---------------------|
| 200 μ l Hz stop | 50 μ l DMS | 180 μ l Hz stop |
| | stop más | |
| | 1 μ l TRNA | |

A G I T A R

El DMS buffer, DMS stop y Hz stop utilizados en la secuenciación son: 50mM Cacodilato de Sodio, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA pH 8; 1.5mM NaAc, 1M b-mercaptoetanol, 200µg/ml TRNA de levadura pH 7; y 0.3M NaAc, 0.1 mM EDTA, 50ug/ml de TRNA de levadura.

A partir del último paso, todos los tubos se tratan de la misma manera, como se describe a continuación:

1. A cada tubo agregar 750 µl de etanol, agitar, congelar a -70 °C durante 15 minutos y centrifugar el mismo tiempo en la Epp.
2. Los sobrenadantes de los tubos C, CT y GA son desechados en FeCl₃, el sobrenadante del tubo G es desechado en NaOH 3M.
3. Los botones son resuspendidos en 250µl NaAc 0.3M conteniendo 1µl de tRNA 10µg/µl.
4. Los pasos 1 y 2 son repetidos. Los botones son lavados con etanol al 70% y secados en el evaporador Savant.
5. Los botones son resuspendidos en 50µl de piperidina (Fisher Scientific Company) 10% e incubados a 90°C durante 30 minutos.
6. Posteriormente los tubos son congelados y secados en el evaporador Savant.
7. Los botones son resuspendidos con 20µl de H₂O y el paso 6 es repetido.
8. Finalmente los botones son resuspendidos con 10µl de buffer de secuencia (80% formamida desionizada, 50mM Tris-borato pH 8.3, 1mM EDTA, 0.1% xilene cyanol).

Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida.-

Este concepto de síntesis lo introdujo inicialmente Merrifield en 1969 para la obtención de péptidos sintéticos, y posteriormente fue adaptado para la obtención de oligonucleótidos.

El método se basa en utilizar una resina de poliestireno unida covalentemente a una base (r-A, r-C, r-G, o r-T), la cual tiene libre el fosfato en posición 5', y que servirá como soporte para ir agregando cada nucleótido o bloque de nucleótidos (di o trinucleótidos) de acuerdo a la secuencia deseada (debe mencionarse que la síntesis se lleva a cabo en dirección 3' a 5'). El exceso de reactivos y subproductos pueden ser removidos con un simple lavado. Al final de la síntesis, la unión covalente entre la resina y la primera base debe romperse para dejar libre el oligonucleótido el cual será posteriormente purificado por cromatografía líquida de alta presión.

Conociendo entonces la secuencia y el tamaño del oligonucleótido que se desea sintetizar se procede a utilizar los siguientes métodos:

Destritilación del nucleótido que está unido covalentemente a la resina.

1. La resina apropiada (r-A, r-C, r-G, o r-T) de acuerdo a la primera base en 3' del oligonucleótido por sintetizar, fue lavada con cloroformo-metanol 7:3 v/v y se dejó hinchar con piridina durante 30 minutos.
2. Después de otro lavado con cloroformo metanol, se agregó ácido benzensulfónico al 2% (ABS) disuelto en cloroformo-metanol 7:3 para quitar el grupo protector dimetoxitritilo en el OH 5'.

3. Nuevamente la resina fue lavada con tetrahidrofurano (THF) y posteriormente se seco al vacio durante 10 minutos.

Tratamiento del bloque de nucleotidos.

1. Se tomo de 5 a 10 equivalentes del bloque adecuado (monomero, dímero o trímero), segun la secuencia deseada y se colocó en un tubo cónico graduado con la siguiente mezcla:

- 1.5 ml piridina
- 0.5 ml H₂O
- 0.5 ml trietilamina

2. La reacción se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos y posteriormente se evaporó la mezcla de disolventes.

3. El bloque fue lavado con piridina y secado por evaporacion durante tres veces. Con este tratamiento el OH del extremo 3' del bloque quedo libre de tal manera que ahora, puede unirse al extremo 5' del nucleotido destritilado como se describe en el método anterior.

4. En cada acoplamiento es necesario agregar dos equivalentes de Nitrotriazolido de mesitilensulfonilo el cual cataliza la reacción.

Acoplamiento resina-bloque.

La mezcla anterior se hizo reaccionar con la resina destritilada dejandose reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó 2 veces con piridina. Este ciclo es repetido las veces necesarias hasta completar el tamaño del oligonucleotido deseado.

Protección del bloque.

Una acetilación al bloque ya acoplado, evita que el nucleotido o bloque próximo a acoplar se una a sitios no deseados formando ramificaciones sobre la cadena que se esta generando. Por ello despues del acoplamiento se agregó de 2-3 ml de una mezcla THF, piridina y anhídrido acético (7:2:1 v/v) y un poco de dimetil-aminopiridina para posteriormente dejarlo a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Separación oligonucleotido-resina.

Para quitar todos los grupos protectores de la cadena sintetizada se pusieron 50 mg de oligonucleotido-resina y se mezcló con 60 μ l de una solución de $N^1 N^1 N^2$ -tetrametilguanidina-p-nitrobencenaldoximato en dioxano-agua (1:1 v/v) a temperatura ambiente y se dejó durante toda la noche. Con la finalidad de romper el enlace covalente entre el oligonucleotido y la resina se adicionó 2-3 ml de $NH_4 OH$ concentrado y 0.5 ml de piridina, y se incubó a 50° C durante 5 horas. Posteriormente la mezcla fue filtrada a través de fibra de vidrio en una pipeta pasteur y el filtrado fue evaporado a sequedad. Finalmente fue resuspendido con solución 20 mM bicarbonato de trietilamonio pH 8.

Purificación del oligonucleótido.

Esto fue realizado en la Unidad de síntesis de macromoléculas del Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM utilizando Cromatografía líquida de alta presión.

Tanto la síntesis, como la purificación de los oligonucleótidos, fue realizada con la ayuda del Q.F.B. Mario A. Cuevas de la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del CEINGEBI/UNAM.

Obtención de rotavirus con una sola capsida .-

1. Alrededor de 2,400 cm² de células MA104 infectadas con rotavirus YM, en un volumen de 200 ml, fueron mezcladas con un volumen igual de triclorotrifluoroetano (Union Carbide). Esta mezcla fue agitada vigorosamente durante 10 min.

2. La fase acuosa se centrifugó posteriormente en botellas de 250 ml a 7,000 rpm durante 30 min en una centrifuga Beckman, usando el rotor JS-7.5.

3. El volumen de la fase acuosa fue medido y se le agregó polietilenglicol 6000 al 50% a razón de 0.19 ml/ml de fase acuosa.

4. Esta mezcla se incubó a 4° C durante toda la noche para precipitar el virus y posteriormente se centrifugó como se indica en el paso 2. El botón se resuspendió en 200µl de TM (0.02M tris, 0.001M MgCl pH 8.2).

5. El virus en los 200µl de TM se depositó sobre un gradiente discontinuo de cloruro de cesio con densidades de 1.3 y 1.4 g/cm y se centrifugó a 40,000 rpm durante 3 hr en una ultracentrifuga Beckman usando el rotor SW50.1.

6. La banda opalescente conteniendo el virus se colectó con una jeringa hipodérmica perforando el tubo de nitrocelulosa y se resuspendió en TM.

7. El virus se centrifugó a 40,000 rpm durante 2 hr usando la misma centrifuga y el mismo rotor que en el paso 5.

8. El botón se resuspendió en 250 μ l de 20mM Tris pH 8.5, 15 mM EDTA y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para desprender la capsida externa.

9. Posteriormente el virus tratado con EDTA se depositó en una solución de cloruro de cesio con densidad de 1.36 gr/cm³ y se centrifugó durante 18 hr con las mismas condiciones del paso 5.

10. La banda opalescente conteniendo el virus se colectó como en el paso 6 y se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones del paso 7. El botón se resuspendió en 50 μ l de 20mM Tris pH 8.5.

Transcripción in vitro.

Utilizando los virus purificados con una sola capsida se realizó la siguiente mezcla:

- 50 μ l de virus
- 40 μ l bentonita al 4% en tris 0.01M pH 7.0.
- 200 μ l buffer de transcripción (0.2M Na₂CO₃, 0.04M Mg₂CO₃, 0.14M Tris pH 8 con adición de 8mM rATP, 2.5mM rGTP, 2.5mM rCTP, 2.5mM rUTP, 0.5mM S-adenosil metionina)

1. Esta mezcla se incubó a 42° C durante 6 horas (agitando esporádicamente).

2. Posteriormente, se centrifugó durante 2 min en la Eppendorf para separar la bentonita y el sobrenadante fue pasado a un tubo eppendorf de 0.5 ml para ser extraído con fenol y cloroformo como

se describe en la sección "Marcaje de los extremos del cDNA de con [α -³²P]dATP, utilizando el fragmento klenow de la DNA polimerasa I de E. coli.

3. El volumen del sobrenadante fué medido y se mezcló con un volumen igual de LiCl 4M para precipitar el RNA mensajero (mRNA) sintetizado. Esta mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche.

4. La mezcla se centrifugó durante 15 min y el botón de mRNA obtenido se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 20 μ l de H₂O.

5. Para determinar la integridad y concentración del mRNA, 2 μ l de la solución se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, en buffer E 1X. El gel se corrió a 100 volts, hasta que el colorante naranja G migró al borde (ver electroforesis en geles de agarosa).

Secuenciación de DNA por el método de Sanger.

Este método está basado en la síntesis de DNA a partir de un primer unido a un templado que puede ser DNA o RNA. A partir de este primer la polimerasa comienza a sintetizar la cadena complementaria al templado, incorporando los diferentes deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), uno de los cuales deberá estar radiactivo. La adición de un dideoxinucleótido (ddATP, ddCTP, ddGTP, o ddTTP) durante la síntesis de la cadena complementaria, en tubos separados para cada base, permiten detener la síntesis de la cadena en cada base complementaria al dideoxinucleótido agregado. Esto es debido a que el dideoxinucleótido carece del grupo OH en el carbono 3 de su azúcar por lo que la unión fosfodiéster no se lleva a cabo. Esta síntesis fraccionada genera fragmentos de DNA con diferentes

tamaños los cuales podran separase en un gel de poliacrilamida el cual será expuesto a una película fotográfica para posteriormente interpretar el patrón de bandas. Para la realización de este método se prepararon las siguientes mezclas en tubos eppendorf de 0.5 ml.

1. Preparación de las mezclas DDA, DDC, DDG y DDT.

| | DAA | DDC | DDG | DDT |
|------------|------|------|------|------|
| AMV 5X* | 80ul | 80ul | 80ul | 80ul |
| 10mMdCTP | 2ul | - | 2ul | 2ul |
| 10mMdGTP | 2ul | 2ul | - | 2ul |
| 10mMdTTP | 2ul | 2ul | 2ul | - |
| 1mMdCTP | - | 4ul | - | - |
| 1mMdGTP | - | - | 4ul | - |
| 1mMTTP | - | - | - | 4ul |
| 215mM DTT^ | 4ul | 4ul | 4ul | 4ul |

* buffer para la enzima transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar 5X (250mM Tris, 250mM KCl, 40mM MgCl)

^ Ditiotreitol (Bio-Rad)

2. Para la extensión con primero, se realizó una mezcla para cada base (A,C,G y T) de la siguiente manera:

M E Z C L A S

| | A | C | G | T |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| DAA | 5 μ l | - | - | - |
| DAC | - | 5 μ l | - | - |
| DAG | - | - | 5 μ l | - |
| DAT | - | - | - | 5 μ l |
| 50 μ MddATP | 0.1 μ l | - | - | - |
| 50 μ MddCTP | - | 1 μ l | - | - |
| 50 μ MddGTP | - | - | 1 μ l | - |
| 50 μ MddTTP | - | - | - | 1.2 μ l |
| [γ - ³² P]dATP | 5 μ Ci | 3 μ Ci | 3 μ Ci | 4 μ Ci |
| 20 μ MdATP | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l | 1 μ l |
| H ₂ O | 5.1 μ l | 4.5 μ l | 4.5 μ l | 4.2 μ l |

3. Cada mezcla A C G y T fue dividida en 4 alícuotas de 3 μ l cada una, para 4 ensayos.

4. Por otro lado, se preparo una mezcla: 3 μ l de mRNA o RNA doble cadena de rotavirus YM (~500 ng), 2 ng de oligonucleotido respectivo (primero) segun el sentido y terminal que se desea secuenciar y 3 μ l de H₂O.

5. Esta mezcla fue calentada hasta ebullición durante 2 minutos y pasada a hielo inmediatamente..

6. 5 U de transcriptasa inversa AMV (Life Sciences) fue agregada a la mezcla anterior.

7. Una vez reralizados los pasos 5 y 6, la mezcla obtenida fue repartida en alícuotas de 2 μ l a cada mezcla A C G y T del paso 3, sobre la pared del tubo.

8. Una centrifugación de 3 segundos en la Epp. es suficiente para iniciar la reacción de extensión, incubando inmediatamente a 42°C durante 20 minutos.

9. Finalmente las reacciones en cada mezcla son detenidas con 10µl de buffer de secuencia (ver Secuenciación de DNA por el método de Maxam y Gilbert).

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

1. Se utilizaron geles de poliacrilamida de diferentes concentraciones realizados como se indica:

| | Concentración del gel | | |
|----------------------------|-----------------------|---------|---------|
| | 20% | 8% | 6% |
| Urea ultrapura | 37.5 gr | 37.5 gr | 100 gr |
| Buffer TBE 10X* | 7.5 ml | 7.5 ml | 20 ml |
| Acrilamida-Bis (19:1) 40% | 37.5 ml | 15 ml | 30 ml |
| H ₂ O destilada | 1.5 ml | 24 ml | 74 ml |
| Persulfato de amonio 10% | 525 µl | 525 µl | 1.5 ml |
| TEMED (Bio-Rad) | 21 µl | 21 µl | 53.3 µl |

* Buffer TBE 10X (1 M Tris, 0.02 M EDTA.2H O pH 8.3 ajustado con Acido Bórico)

2. En la elaboración de cada gel se utilizó un peine que generaba al rededor de 50 pozos, donde se depositaron las muestras con el siguiente orden: A C G T para el método de Sanger y C C T G G A para el método de Maxam y Gilbert.

3. Los geles fueron corridos en buffer TBE 1X a 55 watts durante el tiempo que fuera necesario.

4. Al finalizar la electroforesis, los geles eran expuestos frente a películas fotográficas Kodak X-OmatK y posteriormente reveladas.

5. Las autorradiografías eran leídas de acuerdo al orden de cada muestra y a la posición de cada base (ver el paso 2).

Caracterización del electroferotipo del rotavirus de cerdo YM.

La identidad de las seis cepas de rotavirus, pertenecientes a diferentes serotipos, que se usaron para caracterizar antigenicamente al rotavirus YM, se confirmó por el análisis de los electroferotipos, característicos para cada cepa. En la figura 1 se puede observar que el patrón electroforetico de YM es distinto de todos los virus con que se comparó, especialmente; con respecto a OSU, que es un rotavirus aislado también de cerdo. Ambos patrones electroforeticos difieren en la movilidad electroforetica de los segmentos 4, 5, 9 y 10.

Determinación del serotipo del rotavirus YM.

La identidad de las cepas empleadas también se confirmó por ensayos de neutralización empleando sueros homólogos y heterólogos. Una vez confirmada su identidad, se determinó el título de infectividad de cada cepa viral utilizando el método de formación de focos de peroxidasa, con el fin de encontrar la dilución óptima con la cual se obtuvieran un promedio de 500 focos por cada pozo, necesarios para realizar posteriormente los ensayos de neutralización de la formación de focos de peroxidasa.

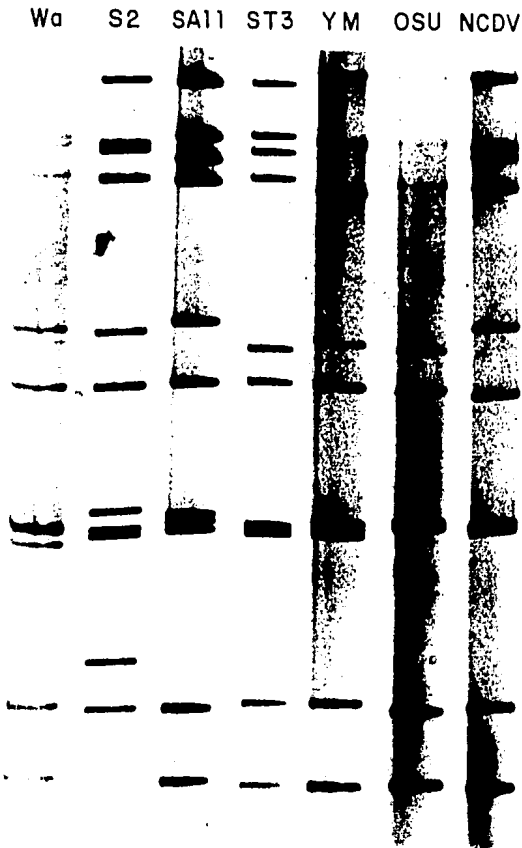


Fig. 1. Patrones electroforeticos de RNAdc correspondientes a los virus utilizados durante el estudio. Rotavirus de humano, cepa Wa (serotipo 1), rotavirus humano, cepa S2 (serotipo 2), rotavirus de simio, cepa SA11 (serotipo 3), rotavirus de humano, cepa ST3 (serotipo 4), rotavirus porcino, cepa YM (posible nuevo serotipo), rotavirus porcino, cepa OSU (serotipo 5) rotavirus bovino, cepa NCDV (serotipo 6).

Los resultados obtenidos en los ensayos de neutralización realizados se muestran en la tabla 1. En esta tabla se observa que el suero anti-YM presentó un título de neutralización 1:8000 cuando se probó con su virus homólogo, mientras que con los virus de diferente serotipo los títulos obtenidos fueron <1:25 para Wa y ST3; 1:25 para SA11; 1:100 para S2 y NCDV; y solo en el caso de OSU el título fue de 1:200. Estos resultados indican que el suero anti-YM reacciona en un alto título con su virus homólogo y cruza ligeramente con el rotavirus OSU (2.5%). En el ensayo de neutralización de YM con sueros anti-rotavirus de diferente serotipo, los títulos obtenidos fueron: 1:100 con los sueros anti-Wa, anti-SA11, anti-OSU y anti-NCDV, y 1:200 con anti-S2 y anti-ST3.

Para considerar dos cepas de rotavirus como pertenecientes al mismo serotipo, las relaciones entre título homólogo y título heterólogo en el ensayo recíproco deben ser menor a un factor de 20. La tabla 2 muestra las relaciones entre los títulos homólogos y títulos heterólogos para cada rotavirus. Se puede observar que ninguno de los virus analizados presenta una relación antigénica mayor al 5% (menor de 20 veces), lo que sugiere que el rotavirus YM pertenece a un serotipo diferente a los seis analizados. Los resultados de los ensayos recíprocos entre OSU y YM fueron los más cercanos al valor límite.

Tabla 1. Caracterización antigénica del rotavirus YH por ensayos de neutralización in vitro.

| Rotavirus | Recíproco del título de anticuerpos que neutralizan el 50% de focos para los virus indicados (serotipo) | | | | | | |
|-----------|---|--------|----------|-------|---------|---------|----------|
| | Wa (1) | S2 (2) | SA11 (3) | YH | ST3 (4) | OSU (5) | MCDV (6) |
| Wa | 8,000 | --- | --- | < 25 | --- | --- | --- |
| S2 | --- | 16,000 | --- | 100 | --- | --- | --- |
| SA11 | --- | --- | 4,000 | 25 | --- | --- | --- |
| YH | 100 | 200 | 100 | 8,000 | 200 | 100 | 100 |
| ST3 | --- | --- | --- | < 25 | 8,000 | --- | --- |
| OSU | --- | --- | --- | 200 | --- | 4,000 | --- |
| MCDV | --- | --- | --- | 100 | --- | --- | 2,000 |

Los títulos homólogos se muestran con números más intensos. ---, no probado

Tabla 2. Caracterización antigenica del rotavirus YM por ensayos de neutralización in vitro.

| Rotavirus | Relación entre título homologo/heterologo para los diferentes virus indicados (serotipos) | | | | | | |
|-----------|---|--------|----------|-------|---------|---------|----------|
| | Wa (1) | S2 (2) | SA11 (3) | YM | ST3 (4) | OSU (5) | WCDV (6) |
| Wa | 1 | --- | --- | > 320 | --- | --- | --- |
| S2 | --- | 1 | --- | 80 | --- | --- | --- |
| SA11 | --- | --- | 1 | 320 | --- | --- | --- |
| YM | 80 | 80 | 40 | 1 | 40 | 40 | 20 |
| ST3 | --- | --- | --- | > 320 | 1 | --- | --- |
| OSU | --- | --- | --- | 40 | --- | 1 | --- |
| WCDV | --- | --- | --- | 80 | --- | --- | 1 |

Las proporciones homologas se muestran con numeros más intensos. ---, no probado

Para confirmar la individualidad antigenica de YM, se realizaron ensayos de neutralización utilizando anticuerpos monoclonales específicos de serotipo, dirigidos contra VP7 (donados amablemente por el Dr. Harry B. Greenberg de la Universidad de Stanford). Las relaciones de los títulos de neutralización homólogo (contra el virus de donde fue aislado el monoclonal) y heterólogo (contra el virus YM) de los anticuerpos monoclonales, anti-serotipos 1, 2, 3 y 5, fueron 1:160 , 1:640 , 1:1600 y 1:1600 veces, respectivamente. Estos resultados apoyan la observación previa de que YM es diferente de los virus que pertenecen a los serotipos 1, 2, 3 y 5.

Determinación del subgrupo del rotavirus YM.

Con la prueba de ELISA y utilizando anticuerpos monoclonales específicos para los subgrupos I y II (29) se encontro que YM pertenece al subgrupo I. En cuanto a esta característica, YM es igual al rotavirus porcino OSU y difiere del rotavirus Gottfried, también aislado de cerdo, el cual pertenece al subgrupo II.

Búsqueda de clonas con insertos correspondientes al gene 9 del rotavirus YM.

La disponibilidad del banco de cDNA del genoma del rotavirus YM permitió obtener clonas con insertos de cDNA del gene 9. Inicialmente, la selección de clonas se hizo por el método de hibridación en colonia utilizando como sonda radiactiva el plasmido pSR9-65, el cual tiene una copia completa de cDNA del gene 9 del rotavirus de simio SA11, el cual codifica en este virus para VP7.

En un primer ensayo, 2 de 400 clonas probadas fueron consideradas como positivas. Posteriormente los insertos de estas 2 clonas (pYM91 y pYM92), con un tamaño aproximado de 708 y 955 nucleotidos, respectivamente, fueron usados como sondas radiactivas para buscar en el banco de genes. Así, se seleccionaron finalmente 12 clonas mas, de un total de 400 clonas analizadas.

Con el fin de conocer los tamaños de los insertos contenidos en cada clona, se realizaron digestiones con la enzima EcoRI y los insertos se compararon, por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%, con los fragmentos de tamaño conocido del fago X174 digerido con Hae III. La nomenclatura de las clonas y los tamaños de los insertos se enlistan en la tabla 3. La estrategia de secuenciación de cinco de las clonas aisladas se muestran en la figura 2.

Tabla 3. Clonas conteniendo insertos de cDNA correspondientes al gene 9 del rotavirus YM.

| clonas | tamaños aproximados de los insertos (pb). |
|--------|--|
| pYM91 | 708 |
| pYM92 | 955 |
| pYM93 | 89 |
| pYM94 | 141 |
| pYM95 | 147 |
| pYM96 | 234 |
| pYM97 | 295 |
| pYM98 | 89 |
| pYM99 | 812 |
| pYM910 | -- |
| pYM911 | 501,331 |
| pYM912 | 148 |
| pYM913 | -- |
| pYM914 | 135 |

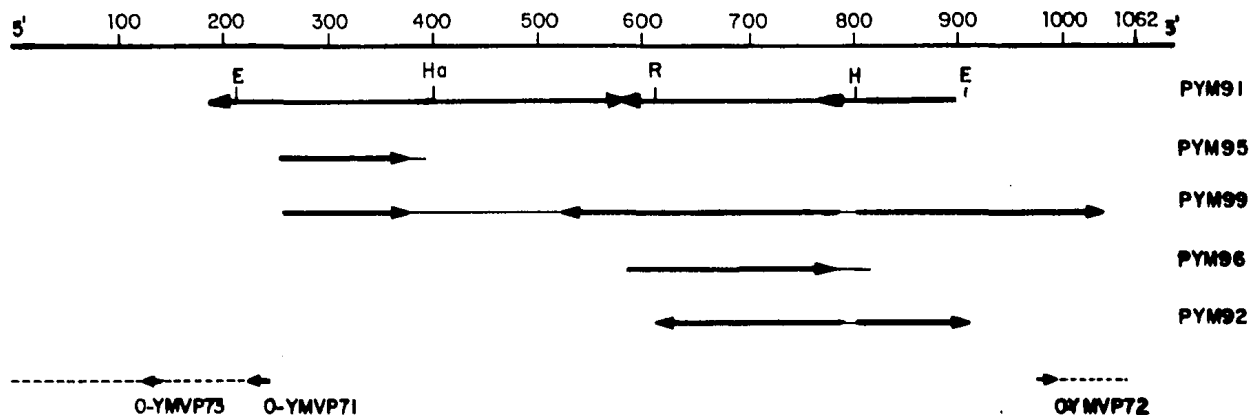


Fig. 2. Insertos de cDNA correspondientes al gene 9 del rotavirus de cerdo YM contenidos en las diferentes clonas usadas para obtener la secuencia parcial de este gene. La barra con escala representa la cadena positiva numerada del extremo 5' al 3'. Las posiciones secuenciadas y su dirección de lectura en cada clona, están indicadas por líneas gruesas y las flechas, respectivamente. O-YMVP71, O-YMVP72 y O-YMVP73 Oligonucleotidos sintéticos utilizados para obtener las secuencias de los extremos 5' y 3' del gene (líneas punteadas) donde la secuencia del O-YMVP73 fue deducida a partir de la secuencia obtenida con el O-YMVP71. Enzimas de restricción; E: Eco RI, Ha: Hae III, R: Rsa I y H: Hind III.

En este esquema es claro que las clonas pYM91 y pYM99 aportaron mayor información. Sin embargo, para conocer la secuencia entre los nucleótidos 400 al 520 y 799 al 804 fue necesario subclonar 2 fragmentos de pYM91 (fragmento 1: cortes en EcoRI de la posición 208 y EcoRI de la terminal 3' del inserto dentro de la secuencia del vector. fragmento 2: corte en HaeIII en posición 402 y HindIII en posición 801 en el vector pMT21. Con estas subclonaciones pudo iniciarse ahora la secuenciación a partir del sitio de HaeIII hacia el extremo 3' y a partir de los sitios de HindIII y EcoRI del pMT21 hacia el extremo 5', cubriendo ahora el total de la clona. Durante la secuenciación de la clona pYM92 se observó que el inserto de esta clona estaba formado por dos fragmentos de cDNA que contenían secuencias nucleotídicas para la misma región del gene, probablemente generado como un artefacto de la clonación, por lo que no se muestra en la figura 2.

Secuenciación parcial del gene 9 de YM a partir de copias de cDNA, por el método de Maxam y Gilbert.

Las secuencias de los insertos en los plásmidos pYM91, pYM95, pYM96, pYM92 y pYM99 se obtuvieron de acuerdo al esquema en la figura 2, donde se muestra la dirección y extensión de la secuencia obtenida de cada clona, así como las posiciones de las clonas a lo largo del gene. La secuencia nucleotídica obtenida de estas clonas, comparandola con las secuencias reportadas para genes equivalentes de otros rotavirus sugerian que comprendia del nucleotido 199 al 1039 de los 1062 nucleotidos totales de los genes de VP7 reportados, representando por lo tanto el 79% de la secuencia total del gene. Como estas clonas no contenían regiones correspondientes a los extremos del gene, se hizo una búsqueda, en 800 clonas del banco de cDNA de clonas que tuvieran secuencias correspondientes a la región 5'. Esto se hizo por hibridación en colonia y utilizando como sonda radiactiva el inserto del plásmido pYM95. Sin embargo, no se logró encontrar una con las características deseadas.

Secuenciación de los extremos 5' y 3' del gene 9 de YM con la utilización de oligonucleotidos sintéticos.

La secuencia de los extremos 5' y 3' del gene 9 se determinó por el método de Sanger, utilizando como primeros oligonucleotidos con secuencias que hibridáran con regiones cercanas a los extremos.

Basados en la secuencia determinada por el método de Maxam y Gilbert, se sintetizaron los oligonucleotidos O-YMVP71 y O-YMVP72; un tercer oligonucleotido O-YMVP73 fue sintetizado a partir de la secuencia obtenida con el O-YMVP71 (ver figura 2). La secuencia de los oligonucleotidos empleados se muestran en la figura 3.

Figura 3. Secuencia de los oligonucleotidos empleados para determinar la secuencia de los extremos del gene 9 de YM.

| | | | | |
|----------|--------------------|----|------|------|
| O-YMVP71 | 5'GTGTGTCCATAGAGCC | 3' | (229 | 245) |
| O-YMVP72 | 5'GTCCAACGATCACGC | 3' | (978 | 993) |
| O-YMVP73 | 5'GTCCATTGTCCTTG | 3' | (128 | 141) |

Los números en parentesis indican la ubicación del oligonucleotido considerando la cadena positiva del gene. Los oligonucleotidos O-YMVP71 y O-YMVP73 tienen secuencia complementaria a la hebra positiva, mientras que O-YMVP2 tiene la misma secuencia que la hebra positiva.

De esta manera se pudo obtener la secuencia de los extremos del gene. La secuencia nucleotidica completa se muestra en la Figura 4. También se muestra en esta figura la secuencia de aminoácidos deducida para VP7 a partir de la secuencia del cDNA.

Analisis de las secuencias nucleotidica y de aminoácidos del gene secuenciado.

Como se aprecia en la figura 4, el gene 9 del rotavirus YM está formado por 1062 nucleotidos y tiene en los extremos 5' y 3', la secuencia nucleotidica, de 11 y 8 nucleotidos respectivamente, que se ha mostrado esta conservada no solamente entre los genes de cada rotavirus sino también entre todos los genes de diferentes cepas, independientemente de la especie donde provengan o del serotipo al que pertenezcan. El número de nucleotidos de la secuencia completa en este gene coincide con los anteriormente reportados.

El analisis de la secuencia de nucleotidos del gene indican que contiene solo un marco de lectura abierta, el cual inicia con el AUG ubicado en los nucleotidos 49 al 51 y terminan con el codon de terminación TAG localizado en los nucleotidos 1027 al 1029. Un potencial segundo sitio para inicio de traducción se encuentra en fase con el primero y está localizado en los nucleotidos 136 al 138. Considerando el primer sitio de iniciación, el marco abierto de lectura es de 978 nucleotidos, quedando regiones no traducidas

| | | |
|---|--|------|
| 66CTTTAAAGAGAGAAATTTCCGACTG6CTM6CBATAGCTCCTTTTA | ATG TAT 66T ATT 6AA TAT ACC ACA ATT CTA ACT NNT CTG ATA | 90 |
| | M Y G I E Y T T I L T ? L I | 14 |
| TCA CTT ATA TTC ATT ACC TAT ATA CTG AAA TCA ATA ACA AG6 ACA | ATG GAC TTC ATC ATA TAT AG6 TTT CTG TTT GTT ATA | 171 |
| S L I F I T Y I L K S I T R T | M D F I I Y R F L F V I | 41 |
| 6TT 6TA CTA 6CA CCA TTC 6TC AAA AC6 CA6 AAT TAT 66A ATA AAT TTA C66 ATA ACT 66C TCT AT6 GAC ACA CCA TAT AT6 | | 252 |
| V V L A P F V K T Q N Y G I N L P I T G S H D T P Y M | | 68 |
| AAT TC6 ACA AT6 AGT 6AG ACA TTC CTA ACT TCT ACT TTA T6T TTA TAT TAT CCA CAC 6AA 6CA 6CA ACT CA6 ATT 6CT 6AT | | 333 |
| N S T M S E T F L T S T L C L Y Y P H E A A T D I A D | | 95 |
| * A A A T66 AAA 6AT ACT CTC TCA CA6 CTA TTT CTC ACT AAA 66A T66 TCA ACA 66A TCA 6TT TAC TTT AAA 6AA TAT ACA | | 414 |
| D K N K D T L S Q L F L T K G M S T G S V Y F K E Y T | | 122 |
| 6AT ATT 6CA TCA TTT TCC 6TA 6AT CCA CAA CTA TAT T6T 6AT TAT AAT ATC 6TG T66 AT6 AAA TAC 6AT 66A AAT TCA CAA | | 495 |
| D I A S F S V D P Q L Y C D Y N I V L N K Y D G N S Q | | 149 |
| CTA 6AT AT6 TCT 6AA T66 6CT 6AT CTA ATA TTA AAT 6AA T66 T66 T6C AAT CCA AT6 6AT ATA ACT CTT TAC TAT TAT CAA | | 576 |
| L D M S E L A D L I L N E M L C N P N D I T L Y Y Y Q | | 176 |
| CAA ACA 6AT 6AA 66A AAC AAA T66 ATA TCA AT6 66T AAC TCA T6T AC6 ATT AAA 6TA T6T CCA CTC AAT ACA CA6 ACC CTT | | 657 |
| Q T D E A N K M I S M G N S C T I K V C P L N Y Q T L | | 203 |
| 66A ATA 66A T6C T66 ACT ACT 6AT CCA ACA ACC TTT 6AG 6AA 6TA 6CT TCA 6CA 6AG AAA T66 6TG ATA ACA 6AT 6TC 6TA | | 738 |
| G I G C L T T D P T T F E E V A S A E K L V I T D V V | | 230 |
| 6AT 66A 6TT AAT CAC AAA CTA 6AT 6TG ACA ACC 6CT ACA T6C ACA ATA 66A AAC T6T AAA AAG CTT 66A CCA 66A 6AA AAT | | 819 |
| D G V N H K L D V T T A T C T I R N C K K L G P R E N | | 257 |
| 6TT 6CA 6TA ATT CAA 6TA 66A 66T TC6 AAC ATA CTT 6AT ATT ACA 666 6AC C66 ACT ACA 6CT CCA CAA ACT 6AA 66A AT6 | | 900 |
| V A V I Q V G G S N I L D I T A D P T T A P Q T E R M | | 284 |
| AT6 6CT ATA AAT T66 AAA AAA T66 T66 CAA 6TA TTT TAT ACT ATA 6TT 6AT TAT 6TT AAT CAA ATT 6TA CAA 6TG AT6 TCC | | 981 |
| N R I N M K K M M Q V F Y T I V D Y V N Q I V Q V M S | | 311 |
| AAA 66A TCA 66C TCT TTA AAT TCC 6CT 6CT TTC TAT TAT 66A ATT TAG ATATATCTTAAGATTAGAAATGTAT6AT6T6ACC | | 1062 |
| K R S R S L N S A A F Y Y R I I | | 326 |

Fig. 4. Secuencia nucleotídica de DNA correspondiente al mRNA del gene 9 y deducción de la secuencia de aminoácidos para la glicoproteína VP7 del rotavirus de cerdo YN. Los nucleótidos están numerados de la terminal 5' a la 3' y los residuos de aminoácidos inician con la primera metionina. Dos posibles sitios de iniciación son enmarcados y una X denota la terminación. El asterisco señala un posible sitio de glicosilación.

de 48 y 36 nucleótidos en los extremos 5' y 3', respectivamente. Considerando los dos posibles sitios de inicio de traducción en fase para este gene, los polipeptidos resultantes pueden ser de 326 y 297 aminoácidos, con un peso molecular deducido de 36,038 y 32,927, respectivamente.

El análisis de la composición de bases para este gene mostró un 18% G, 17% C, 30% T y 35% A.

La secuencia de aminoácidos muestra la existencia de un posible sitio aceptor de carbohidratos unido a asparagina (N-S-T) ubicado en la asparagina de la posición 69.

Comparación de la secuencia nucleotídica del gene 9 del rotavirus YM con los genes equivalentes derivados de rotavirus pertenecientes a diferentes serotipos.

La secuencia nucleotídica del gene que codifica por la glicoproteína de superficie ha sido determinada con anterioridad para siete diferentes rotavirus. La figura 5 muestra los porcentajes de homología entre todas las diferentes secuencias reportadas, incluyendo la de YM. En esta figura se puede observar que el gene más homólogo al de YM es el del rotavirus OSU (82%), también aislado de cerdo, mientras que el que menos homología presenta con YM (72%) es el del rotavirus NCDV, proveniente de terneros. Es interesante notar que la homología entre rotavirus de la misma especie y con el mismo serotipo, es mayor que la de YM con OSU o con cualquiera de las otras cepas. Así, la homología

Fig. 5. Homología de nucleótidos entre los genes que codifican por VP7 en distintos rotavirus.

| | YM | Wa | HU5 | SA11 | RRV | OSU | UK | NCDV |
|----------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|
| YM (7) | 100 | | | | | | | |
| Wa (1) | 73 | 100 | | | | | | |
| HU5 (2) | 75 | 75 | 100 | | | | | |
| SA11 (3) | 77 | 77 | 74 | 100 | | | | |
| RRV (3) | 79 | 77 | 74 | 85 | 100 | | | |
| OSU (5) | 82 | 77 | 74 | 76 | 77 | 100 | | |
| UK (6) | 73 | 73 | 75 | 77 | 75 | 76 | 100 | |
| NCDV (6) | 72 | 74 | 74 | 78 | 76 | 77 | 96 | 100 |

Las secuencias nucleotídicas para los virus Wa, HU5, SA11, RRV, OSU, UK y NCDV fueron tomadas de las referencias (51,15,11,42,26,17,24) respectivamente. Porcentaje de homología (identidad). El número en el paréntesis indica el serotipo.

entre los rotavirus bovinos UK y NCDV, ambos serotipo 6 es del 96%, mientras que para los de simio SA11 y RRV ambos serotipo 3, es de 85%.

Comparación de la secuencia de aminoácidos de VP7 entre diferentes rotavirus.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína VP7 de YM con las secuencias de VP7's derivadas de rotavirus pertenecientes a diferentes serotipos (Figura 6) se observó que la VP7 de YM tiene una homología del 77-78% con rotavirus del serotipo 1; 77-78% con cepas del serotipo 2; 86-89% con virus del serotipo 3; 76% con virus del serotipo 4; 87% con OSU que pertenece al serotipo 5; y 81-82% con rotavirus del serotipo 6. De acuerdo a esto, la VP7 de YM parece estar más relacionada con la VP7 de rotavirus de serotipo 3 (2 cepas aisladas de simio: SA11 y RRV, y una cepa aislada de humano: P) y con la VP7 de OSU, un aislado de cerdo. Sin embargo, también se puede observar en la figura que las VP7's de virus del serotipo 3 fueron los que más homología tuvieron con todas las otras VP7's analizadas, derivadas de virus con diferentes serotipos.

Es importante notar que la homología entre secuencias de VP7 derivada de virus pertenecientes al mismo serotipo fue siempre superior al 90%, mientras que la homología de la VP7 de YM con las otras VP7's estuvo siempre por debajo de este valor, lo que apoya la posible individualidad antigenica de la VP7 de YM, sugerida por los ensayos de neutralización.

Fig. 6. Homología de aminoácidos entre VP7's de distintos rotavirus.

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|----|-----|----|-------|-------|-----|----|----|-----|------|-----|------|-----|-------|--|
| YM | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 78 | D | | | | | | | | | | | | | | | |
| 78 | 100 | Mo | | | | | | | | | | | | | | |
| 77 | 95 | 95 | M37 | | | | | | | | | | | | | |
| 78 | 99 | 99 | 95 | Wa | | | | | | | | | | | | |
| 77 | 75 | 75 | 74 | 75 | DS1 | | | | | | | | | | | |
| 77 | 75 | 75 | 74 | 75 | 99 | HN126 | | | | | | | | | | |
| 77 | 75 | 75 | 74 | 75 | 99 | 99 | HU5 | | | | | | | | | |
| 78 | 75 | 75 | 74 | 75 | 96 | 96 | 96 | S2 | | | | | | | | |
| 86 | 83 | 83 | 83 | 83 | 75 | 75 | 75 | 75 | P | | | | | | | |
| 89 | 81 | 81 | 81 | 81 | 75 | 75 | 75 | 75 | 93 | RRV | | | | | | |
| 88 | 82 | 82 | 81 | 82 | 75 | 76 | 75 | 75 | 91 | 96 | SA11 | | | | | |
| 76 | 77 | 77 | 78 | 77 | 72 | 72 | 71 | 73 | 76 | 78 | 78 | ST3 | | | | |
| 76 | 78 | 78 | 79 | 78 | 71 | 71 | 71 | 71 | 76 | 78 | 79 | 94 | VA70 | | | |
| 87 | 78 | 78 | 79 | 78 | 74 | 74 | 74 | 74 | 85 | 85 | 85 | 77 | 76 | OSU | | |
| 82 | 81 | 81 | 81 | 81 | 75 | 75 | 76 | 75 | 83 | 85 | 85 | 77 | 76 | 81 | NCDV | |
| 81 | 82 | 82 | 82 | 82 | 76 | 76 | 76 | 76 | 84 | 86 | 86 | 79 | 77 | 82 | 97 UK | |
| | | | | | ----- | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | 5 | | 6 | | |

El número bajo la línea discontinua indica el serotipo al que pertenece cada grupo. Porcentaje de homología (identidad). Tomado de Green et al (27), con la adición de YM.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de VP7s de diversos rotavirus ha mostrado la existencia de regiones que difieren considerablemente entre cepas de diferente serotipo pero que son muy conservadas entre las pertenecientes a un mismo serotipo. Coincidentemente, en estas 3 regiones, designadas A, B y C por Dyall-Smith et al, (15,16), se han localizado los sitios de interacción de anticuerpos monoclonales neutralizantes a través de la secuenciación del gene de VP7 de virus variantes, resistentes a la neutralización por dichos anticuerpos. La variabilidad de estas tres regiones en virus pertenecientes al mismo serotipo no va mas alla de dos aminoácidos cambiados en cada región, y se ha mostrado que la comparación de la secuencia de aminoácidos de estas tres zonas de un rotavirus de serotipo desconocido con los de virus de serotipo conocido, tiene valor predictivo para asignarle serotipo (27,28,42). Tomando esto en consideración, comparamos las regiones A, B y C del rotavirus YM con las regiones equivalentes de rotavirus pertenecientes a 6 diferentes serotipos (Figura 7). En esta figura se puede apreciar que en la región A, de 15 aminoácidos, YM presentó seis cambios con respecto a los virus de serotipo 1; ocho con los de serotipo 2; cinco con los de serotipo 3, 4 y 5; y seis con los de serotipo 6. Entre rotavirus del mismo serotipo la secuencia fue exactamente la misma, a excepción del rotavirus HN126 (entre el grupo de serotipo 2) donde la Alanina 87 estuvo substituida por una Treonina, y en el M37 (entre el grupo de serotipo 1) donde la Serina 94 se sustituyó por Asparagina y el Aspartico 97 estuvo

| | | A | B | C |
|---|-------|-----------------|------------|----------------|
| | | 87 | 143 | 208 |
| | | HEAATQIADDKWKDT | KYDGNSQLDM | LTTDPTTFEEVASA |
| | | 101 | 152 | 221 |
| | YM | HEAATQIADDKWKDT | KYDGNSQLDM | LTTDPTTFEEVASA |
| 1 | D | T--S---N-GD---S | ---QSLE--- | Q--NVDS--MI-EN |
| | Mo | T--S---N-GD---S | ---QSLE--- | Q--NVDS--MI-EN |
| | M37 | T--S---S-GE---S | ---Q-LE--- | R--NVDS--M--EN |
| | Wa | T--S---N-GD---S | ---QSLE--- | Q--NVDS--MI-EN |
| 2 | DS1 | A--KNE-S--E-EN- | R--NT-E--A | K---VN---I---S |
| | HN126 | T--KNE-S--E-EN- | R--NT-E--A | K---VN---I---S |
| | HU5 | A--KNE-S--E-EN- | R--NT-E--A | K---VN---I---S |
| | S2 | A--KNE-S--E-EN- | R--NT-E--V | KI--VD---I---S |
| 3 | P | T---E-N-NS---- | ---ATL---- | ---TN-----T- |
| | RRV | T---E-N-NS---- | ---ATL---- | ---TA-----T- |
| | SA11 | T---E-N-NS---- | ---ATL---- | ---A-----T- |
| 4 | ST3 | S--P---S-TE---- | RFVSGEE--I | Q--NTA---T--DS |
| | VA70 | S--P---S-NE---- | -FASGEE--I | Q--NVA---M--DS |
| 5 | OSU | N---E---T--TE- | -----L---- | S---INS--T--N- |
| 6 | NCDV | V--SNE---TE---- | ---STQE--- | -I-N-D---T--TM |
| | UK | V--SNE---TE---- | ---STQE--- | -I-N-D---T--TT |

Fig. 7. Comparación de aminoácidos entre las regiones A, B, y C de la glicoproteína VP7 de YM y regiones equivalentes en 16 cepas de rotavirus de diferente serotipo. Las secuencias de aminoácidos para los virus WA (51), HU5 (15), S2 (31), RRV (42), SA11 (11), OSU (26), UK (17), NCDV (24), y D, Mo, M37, DS1, HU126, P, ST3, y VA70 (27) fueron reportadas con anterioridad. El guión indica que el aminoácido es igual al de YM. *Sitios considerados por Dyall-Smith et al (16) como epitopes de neutralización específicos de serotipo. †Sitios considerados por Taniguchi et al (59) como epitopes de neutralización específicos de serotipo.

substituido por una Glutamina. En la región B, YM presento cuatro diferencias con los virus del serotipo 1, cinco con los de serotipo 2; tres con los de serotipo 3, de siete a ocho con los de serotipo 4; una sola diferencia con el serotipo 5; y cuatro con los de serotipo 6. Nuevamente la similitud entre rotavirus del mismo serotipo y la diferencia entre serotipos diferentes fue notable. Finalmente, en la región C YM tuvo entre ocho y nueve diferencias con los virus de serotipo 1; entre cinco y seis con los de serotipo 2, de dos a tres con los de serotipo 3; siete con los de serotipo 4; y seis con los de serotipo 5 y 6. Nuevamente, estos resultados apoyan los hallazgos inmunológicos que indican que el rotavirus YM pertenece a un serotipo diferente de los serotipos 1 al 6.

AUTHOR:
SEE QUERY
PAGE 10, 124

JOURNAL OF VIROLOGY, Nov. 1988, p. 000-000
0022-538X/88/116X00-0\$02.00/0
Copyright © 1988, American Society for Microbiology

Vol. 62, No. 11

Molecular and Antigenic Characterization of Porcine Rotavirus YM, a Possible New Rotavirus Serotype

ALBERTO M. RUIZ,¹ IMELDA V. LÓPEZ,² SUSANA LÓPEZ,¹ ROMILIO T. ESPEJO,² AND CARLOS F. ARIAS^{1*}

Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 510-3, Col. Miraval, Cuernavaca, Morelos 62271,¹ and Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City,² México

Received 17 May 1988/Accepted 25 June 1988

In 1983, we isolated a porcine rotavirus (strain YM) that was prevalent in several regions of Mexico, as judged by the frequency of its characteristic electropherotype. By a focus reduction neutralization test, rotavirus YM was clearly distinguished from prototype rotavirus strains belonging to serotypes 1 (Wa), 2 (S2), 3 (SA11), 4 (ST3), 5 (OSU), and 6 (NCDV). Minor, one-way cross-neutralization (1 to 5%) was observed when antisera to the various rotavirus strains were incubated with rotavirus YM. In addition, the YM virus was not neutralized by neutralizing monoclonal antibodies with specificity to serotypes 1, 2, 3, and 5. The subgroup of the virus was determined to be I by enzyme-linked immunosorbent assay. To characterize the serotype-specific glycoprotein of the virus at the molecular level, we cloned and sequenced the gene coding for VP7. Comparison of the deduced amino acid sequence with reported homologous sequences from human and animal rotavirus strains belonging to six different serotypes further supported the distinct immunological identity of the YM VP7 protein.

Rotaviruses are the most common etiologic agents of acute gastroenteritis in children under 2 years of age (28, 31). They are also associated with diarrhea in the young of many animal species (19). These viruses were first reported in association with human infantile gastroenteritis in 1973 (6). Since then, knowledge of rotaviruses has accumulated very rapidly because of their great medical and veterinary importance.

The virions are composed of an RNA genome and a double-layered capsid (31). The genome is made up of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA), with sizes ranging from about 650 to 3,500 base pairs (8, 41). The capsid consists of at least five protein classes, three of which (VP1, VP2, and VP6) make up the inner layer, whereas the other two (VP3 and VP7) are in the surface layer of the virus (17, 18). Both VP3 and VP7 are able to elicit antibodies capable of neutralizing virus infectivity (1, 5, 26, 36, 39, 46). VP7, a 37,000-molecular-weight protein, is glycosylated and exposed on the outer capsid of the virion (4, 16). Studies with reassortant viruses have shown that the serotype-specific neutralizing phenotype segregated with the gene that encodes this protein (gene segment 7, 8, or 9, depending on the rotavirus strain) (21, 30, 47).

Serotypes of rotavirus are defined on the basis of the neutralization of viral infectivity, and, to date, four serotypes (serotypes 1 to 4) of rotavirus have been identified among strains recovered from humans (29). Recently, two candidates for new human rotavirus serotypes have been proposed (12, 35). In animals, at least five serotypes have been identified (serotypes 3 to 7), but, by neutralization assays, two of the animal serotypes (serotypes 3 and 4) have been shown to cross-react with the corresponding human rotavirus serotypes (29). All rotavirus strains isolated from pigs have been classified as either serotype 4 or 5, with the Gottfried and OSU strains representing the prototype virus, respectively (7, 29). Recently, a porcine rotavirus antigeni-

cally related to human rotavirus serotype 3 has been found in Australia (38).

In this article we report the characterization of a rotavirus which was isolated from a diarrheic piglet in Sonora, Mexico, and which, by immunological and molecular criteria, seems to belong to a different serotype from those previously reported.

MATERIALS AND METHODS

Virus isolation. The porcine rotavirus (strain YM) was isolated from a diarrheic piglet in Sonora, Mexico. The intestinal content was suspended (10%, vol/vol) in Eagle minimal essential medium containing 250 µg of trypsin (1:250; Difco Laboratories) per ml. The suspension was clarified by centrifugation at 2,000 × g for 30 min. The supernatant fluid (0.2 ml) was inoculated into thrice-washed tubes of confluent MA104 cells. After an adsorption period of 1 h at 37°C, cultures were fed with Eagle minimal essential medium and incubated in a roller apparatus at 37°C. Serial passages were performed with suspensions of the whole culture treated with 10 µg of trypsin per ml for 1 h at 37°C. In passage 5, a complete cytopathic effect was observed at 16 h postinfection.

Virus and cells. Rotaviruses Wa, S2, and ST3 were obtained from Y. Hoshino, National Institutes of Health, Bethesda, Md.; NCDV was obtained from R. S. Spindlove, Utah State University, Salt Lake City, Utah; SA11 was obtained from H. H. Malherbe, Gull Laboratories, Salt Lake City, Utah; and OSU was obtained from L. Saif, Ohio State University, Wooster, Ohio. All rotavirus strains were grown in MA104 cells and purified as previously described (17).

Immune sera. Hyperimmune sera against rotaviruses YM and OSU were prepared in mice essentially as described by Arias et al. (2), except that the animals received only three injections (50 µg each) of the corresponding purified virus. Hyperimmune sera to Wa, S2, ST3, SA11, and NCDV were prepared in rabbits as described (4). The neutralizing monoclonal antibodies SE8 (serotype 1), 1C10 (serotype 2), 4F8

* Corresponding author.

AUTHOR:
 SEE QUERY
 PAGE 513

b RUIZ ET AL.

J. VIROL.

(serotype 3), and 5B8 (serotype 5) and the subgroup-specific monoclonal antibodies 255/60 (subgroup I) and 631 (subgroup II) were kindly provided by H. B. Greenberg, Stanford University, Stanford, Calif. (25, 42, 43).

Subgroup and serotype characterization of YM. The subgroup of rotavirus YM was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies (25). The neutralization antigen serotype of rotavirus YM was determined by an immunoperoxidase focus reduction neutralization assay as described by Arias et al. (2).

Molecular cloning and nucleic acid sequencing. The 11 dsRNA segments derived from rotavirus YM were cloned as described by López et al. (manuscript in preparation). The recombinant clones containing hybrid plasmids with cDNA inserts corresponding to YM RNA segment 9 were selected by hybridization of random recombinant plasmids, labeled by nick translation, to YM RNA segment 9 isolated by gel electrophoresis (4). The inserts in the selected clones were sequenced by the procedure of Maxam and Gilbert (37). To obtain the sequence of the 5' and 3' ends of the gene, which were not present in the selected clones, the isolated dsRNA segment 9 was hybridized with synthetic oligonucleotides complementary to regions 127 to 141 and 978 to 993 of the plus and minus strands of RNA segment 9, respectively, and the sequence was determined by the dideoxy-chain termination method with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase as described (33).

Nucleic acid hybridization. SA11 and YM viral RNAs were electrophoresed in a 5% acrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide ratio, 20:0.5) in Tris-borate buffer (0.1 M Trizma base [Sigma Chemical Co.] and 0.002 M EDTA, adjusted to pH 8.3 with boric acid). Viral RNAs were transferred to nitrocellulose paper and hybridized to nick-translated plasmid pSR965, which contained a full-length cDNA copy of SA11 gene 9 (3), essentially as described by López et al. (32).

RESULTS

Isolation. For virus isolation, an intestinal-content suspension from a diarrhetic piglet was treated with trypsin and inoculated into roller-tube cultures of MA104 cells. After 4 days of incubation of passage 1, approximately 50% of the cells showed a cytopathic effect. By passage 5, when the virus was inoculated at high multiplicity of infection, a complete cytopathic effect was observed at 16 h postinfection.

After eight passages in MA104 cells, the virus was still able to cause profuse diarrhea in colostrum-deprived 1-day-old pigs.

dsRNA electrophoretic profile. The electrophoretic pattern of the YM rotavirus dsRNA could be readily distinguished from the corresponding patterns of the human rotavirus strains Wa, S2, and ST3, the simian rotavirus SA11, the porcine rotavirus OSU, and the bovine rotavirus NCDV (Fig. 1). The electropherotype of the cell culture-adapted YM strain was identical to that obtained from the original sample from which the virus was isolated (data not shown).

In 1983, the year rotavirus YM was isolated, its characteristic electropherotype was observed in 62 of 63 rotavirus-positive samples collected from five of the most important porciculture areas of Mexico, located in the states of Jalisco, Veracruz, Sonora, Michoacán, and Edo. de México (A. M. Ruiz and A. Morilla, unpublished results).

Subgroup determination. The subgroup of the YM rotavirus strain was determined to be I by the enzyme-linked immunosorbent assay with subgroup-specific monoclonal

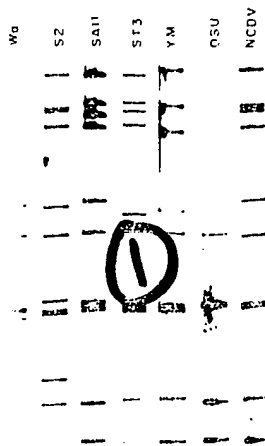


FIG. 1. dsRNA electrophoretic patterns of human rotavirus YM and rotavirus strains of different serotypes. Human rotavirus Wa (serotype 1), human rotavirus S2 (serotype 2), simian rotavirus SA11 (serotype 3), human rotavirus ST3 (serotype 4), porcine rotavirus YM (possible new serotype), porcine rotavirus OSU (serotype 5), and bovine rotavirus NCDV (serotype 6) are shown.

antibodies (25). This subgroup specificity is the same as that reported for the OSU strain but different from Gottfried, the other reference porcine rotavirus strain, which has been shown to belong to subgroup II (29).

Serotype determination. The YM rotavirus strain was determined, by the focus reduction neutralization test (2), to be antigenically distinct from rotaviruses belonging to serotypes 1 to 6, on the basis of >20-fold differences between titers of homologous and heterologous reciprocal neutralizing antibodies. Hyperimmune mouse antisera to rotavirus YM did not significantly neutralize prototype rotavirus strains of serotypes 1 (Wa), 2 (S2), 3 (SA11), 4 (ST3), 5 (OSU), and 6 (NCDV) (Table 1). Rotavirus YM could also be assigned to a different serotype when antisera to these various rotavirus strains were tested against it. However,

TABLE 1. Antigenic characterization of porcine rotavirus strain YM by the focus reduction neutralization test

| Rotavirus (serotype) | Reciprocal of 50% FRN antibody titer of hyperimmune antiserum to indicated rotavirus (serotype) ^a | | | | | | |
|----------------------|--|--------|----------|-------|---------|---------|----------|
| | Wa (1) | S2 (2) | SA11 (3) | YM | ST3 (4) | OSU (5) | NCDV (6) |
| Wa (1) | 8,000 ^b | <2 | - | <25 | - | - | - |
| S2 (2) | - | 16,000 | - | 100 | - | - | - |
| SA11 (3) | - | - | 4,000 | 25 | - | - | - |
| YM | 100 | 200 | 100 | 8,000 | 200 | 100 | 100 |
| ST3 (4) | - | - | - | <25 | 8,000 | - | - |
| OSU (5) | - | - | - | 200 | - | 4,000 | - |
| NCDV (6) | - | - | - | 100 | - | - | 2,000 |

^a Homologous values are in boldface type. FRN, Focus reduction neutralization.

^b -, Not tested.

AUTHOR:
 SEE QUERY
 PAGE! 112

d RUIZ ET AL.

J. VIROL.

| | A | B | C |
|------------|---------------------------|----------------------|---------------------------------|
| YM | 111 | 147 | 152 |
| (13) D | T---N---N---G---D---S | ---G---L---E--- | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (11) MD | T---N---N---G---D---E | ---G---L---E--- | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (11) M37 | T---N---N---G---D---E | ---G---L---E--- | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (11) M6 | T---N---N---G---D---E | ---G---L---E--- | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (22) DS1 | A---N---E---S---E---E---N | E---N---T---E---A | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (22) M157B | T---N---N---G---D---E | A---N---T---E---A | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (22) HUS | A---N---E---S---E---E---N | E---N---T---E---A | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (22) S2 | A---N---E---S---E---E---N | E---N---T---E---A | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (22) F | T---N---N---G---D---E | ---G---L---E--- | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (22) RRV | T---N---N---G---D---E | ---G---L---E--- | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (22) SA11 | T---N---N---G---D---E | ---G---L---E--- | ---G---N---G---S---P---L---E--- |
| (42) ST3 | S---H---S---E---T---E--- | E---F---G---E---E--- | D---N---T---A---T---D---S |
| (42) VA70 | S---H---S---E---T---E--- | E---F---G---E---E--- | D---N---T---A---T---D---S |
| (52) OSU | N---T---E---T---T---E--- | ---G---L---E--- | E---N---G---S---P---L---E--- |
| (62) NCDV | V---S---N---E---T---E--- | ---G---L---E--- | E---N---G---S---P---L---E--- |
| (62) UP | V---S---N---E---T---E--- | ---G---L---E--- | E---N---G---S---P---L---E--- |

FIG. 3. Comparison of the YM amino acid sequence of VP7 regions A, B, and C with the corresponding region of rotavirus strains belonging to six different serotypes. The amino acid sequences from Wa (40), HUS (13), S2 (27), RRV (23) (Mackow et al., in press), SA11 (3, 9), OSU (23), NCDV (20), LK (15), and D, Mo, M37, DS1, HN126, P, ST3, and VA70 (23) were compared with the amino acid sequence of YM. Dashes indicate identical amino acids. The serotype of each rotavirus strain is shown in parentheses.

86, 88, and 89% with strains P, SA11, and RRV, respectively, all of which belong to serotype 3.

The nucleotide sequence of rotavirus variants selected for their resistance to neutralization by VP7-directed, serotype-specific monoclonal antibodies has allowed the mapping of the sites involved in VP7-specific neutralization to three discrete regions in the protein (14, 32, 45). These three regions, defined as A, B, and C by Dyalal-Smith et al. (14), have a high degree of divergence among different rotavirus strains but are highly conserved among rotaviruses belonging to the same serotype (23). The comparison of the amino acid sequence of these selected regions of VP7 between YM and other rotaviruses (Fig. 3) showed that the YM VP7 sequence does not match any of the sequences derived from viruses belonging to six different serotypes, suggesting a novel VP7 specific neutralization identity of the porcine rotavirus YM.

DISCUSSION

A unified system for serotypic classification of human and other mammalian and avian strains of rotavirus has been proposed by Hoshino et al. (29). In their report, seven different serotypes were identified among the strains studied. Serotypes 1 and 2 were found only in human rotaviruses, serotypes 3 and 4 were found in rotavirus strains isolated from humans as well as from animal species, and serotypes 5 to 7 were exclusive to animal rotaviruses. Two recently reported rotavirus serotypes isolated from humans, which do not cross-react with the seven known serotypes (12, 35), have not been classified yet. In the work described in this report we have established the serotypic individuality of a porcine rotavirus isolate by cross-neutralization studies with prototype rotavirus strains belonging to serotypes 1 to 6. Since serotype 7 rotavirus strains have been isolated only from avian species (29), it is suggested that porcine rotavirus YM could represent a new rotavirus serotype.

The cross-neutralization studies clearly showed that hyperimmune mouse antisera to rotavirus YM did not neutralize rotavirus strains of serotypes 1 to 6, whereas minor

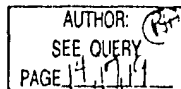
cross-neutralization of YM by reference antisera to heterotypic rotaviruses was observed. This minor, one-way neutralizing cross-reactivity was <5%, the accepted limit for defining a distinct serotype (29).

It has been shown that neutralization in vitro and in vivo can be mediated by the two rotavirus surface polypeptides VP3 and VP7 (5, 26, 36, 39, 46). Comparison of the amino acid sequence of immunologically relevant regions of YM VP7 with the corresponding VP7 sequences of heterotypic rotavirus strains indicates that YM VP7 is unique, suggesting that VP3 might be responsible for the minor cross-neutralization observed. This observation is supported by the fact that VP7-specific neutralizing monoclonal antibodies to rotavirus of serotypes 1, 2, 3, and 5 did not significantly neutralize rotavirus YM. In this regard, it is interesting that the one-way cross-neutralization of human rotavirus W161 by antisera to rotavirus strains of serotypes 1 to 4 was localized to VP3 by immunological analysis of reassortant viruses (12).

Rotavirus YM was assigned to subgroup I. This was not unexpected, since most animal rotavirus strains have this subgroup specificity (29). This observation clearly differentiates rotavirus YM from the porcine rotavirus Gottfried, which belongs to subgroup II, serotype 4 (29), and which was not available for this study.

In the last few years, the nucleotide sequence of the VP7-encoding genes from 17 human and animal rotavirus strains belonging to six different serotypes has been determined (3, 9, 11, 13, 15, 20, 22, 23, 27, 34, 40; Mackow et al., in press). Comparison of the deduced VP7 amino acid sequences of all these strains showed a high (91 to 100%) overall homology among strains of the same serotype, whereas the highest homology between two strains of different serotypes was 86% (23). When the rotavirus YM VP7 amino acid sequence was compared with those reported, it was found to be more closely related to serotype 3 strains (86 to 89% homology). However, this observation was not surprising, since pairwise comparisons between different serotypes showed that serotype 3 viruses shared the highest homology with the five other serotypes compared (23). YM VP7 had also a high identity (67%) with the VP7 of the porcine rotavirus OSU. This might reflect the common host origin of these two viruses.

Escape mutations to neutralization by VP7-specific neutralizing monoclonal antibodies have been mapped to three different regions in the VP7 protein (14, 45; Mackow et al., in press). These three regions have a high degree of divergence among different rotavirus strains but are highly conserved among rotaviruses belonging to the same serotype (Fig. 3). When the sequences from two rotaviruses of the same serotype are compared, only one or two amino acid changes are found (23, 24). The amino acid sequences in these three regions of YM VP7 showed a fair number of differences from the other VP7 sequences, supporting the idea of a separate serotypic identity for YM VP7. However, it is interesting that region C of YM and serotype 3 rotaviruses showed some conservation, with only two amino acid changes (residue positions 212 and 220) between the SA11 and YM sequences. Since these two changes are not in the positions where escape mutations have been mapped (14, 45; Mackow et al., in press), and since an amino acid change at position 212 is also observed between strains ST3 and VA70 (23), both of which belong to serotype 4, it would be interesting to see whether monoclonal antibodies directed to the C region of serotype 3 viruses have some neutralizing activity on the YM infectivity.



Vol. 62, 1988

NEW PORCINE ROTAVIRUS SEROTYPE

It has been reported that three other regions of VP7 (amino acids 39 to 50, 120 to 130, and 233 to 242) are highly divergent between different rotavirus strains and very conserved among rotaviruses of the same serotype (23), thus being potentially serotype specific. However, in the work described in this report, two of these regions (amino acids 120 to 130 and 233 to 242) have been found to be identical between rotaviruses YM and RRV, with the last region also being identical with that in SA11. In addition, there was only one amino acid change in amino acids 120 to 130 between the YM and the SA11 and P sequences, and there was one change in amino acids 233 to 243 between the YM and the OSU, NCDV, and UK sequences. These observations, together with the fact that escape mutations have not been mapped to these regions (14, 45; Maskow et al., in press), suggest that they do not have a role (at least a major one) in the induction of neutralizing antibodies.

Recently, Benfield et al. (D. A. Benfield, E. A. Nelson, and Y. Hoshino. Abstr. VII Int. Congr. Virol., R11.19, p. 111, 1988) obtained a monoclonal antibody (57-8) which efficiently neutralized viruses of serotypes 3, 4, and 6. Analysis of the amino acid sequences of the serotype-relevant regions of VP7 among different rotavirus strains (Maskow et al., in press) showed that amino acids 99 to 101, 214, and 218 were conserved among viruses of these three serotypes and were different among viruses of serotypes 1, 2, and 5, which were not neutralized by monoclonal antibody 57-8. Interestingly, rotavirus YM shares the amino acid specificity in these positions with the viruses of serotypes 3, 4, and 6, making it a good natural probe with which to analyze the specificity and amino acid sequence requirements of monoclonal antibody 57-8 for rotavirus neutralization.

On the basis of the RNA genome electrophoretic pattern, rotavirus YM was widespread in Mexico in 1983, the year it was isolated; its characteristic electropherotype was observed in all but one of the porcine rotavirus-positive samples detected. However, in subsequent years, a systematic screening for rotaviruses in swine was not continued, and therefore we do not know whether the high prevalence observed for this electropherotype in 1983 was maintained over the following years or whether it was replaced by a different electropherotype. A serological survey of porcine samples for antibodies against OSU, Gottfried, and YM would help to reveal the incidence of infection of Mexican swine by these three viruses.

It seems clear, from the appearance of new rotavirus serotypes and from the various and complex patterns of cross-reactivity that have been observed, that the immunological relationships among different rotavirus strains are not as simple as initially thought. Thus, before safe and effective animal and human rotavirus vaccines can be designed, further structural and immunological studies, together with the determination of the relative prevalence of the different rotavirus strains, are needed.

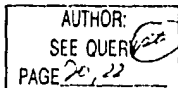
ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ernesto Méndez for excellent technical assistance.

This work was partially supported by grants PVT/AINAL/85/3027 and PCSACNA-050971 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

LITERATURE CITED

- Arias, C. F., T. Ballido, and M. Plebanik. 1986. Synthesis of the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in *Escherichia coli*. Gene 47:211-219.
- Arias, C. F., M. Lizaso, and S. López. 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. J. Gen. Virol. 68: 653-642.
- Arias, C. F., S. López, J. R. Bell, and J. H. Strauss. 1984. Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. J. Virol. 50:657-661.
- Arias, C. F., S. López, and R. T. Espejo. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. J. Virol. 41:42-50.
- Bastardo, J. W., J. L. McKinnon-Breschkin, S. Senza, L. D. Mercer, and I. H. Holmes. 1981. Preparation and characterization of antisera to electrophoretically purified SA11 virus polypeptides. Infect. Immun. 34:641-647.
- 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 viral gastroenteritis. Lancet ii:1281-1283.
- Bohl, E. H., K. W. Thell, and L. J. Saif. 1984. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. J. Clin. Microbiol. 19:105-111.
- Both, G. W., A. R. Bellamy, J. E. Street, and L. J. Stogman. 1982. A general strategy for cloning double-stranded RNA: nucleotide sequence of the simian-11 rotavirus gene B. Nucleic Acids Res. 10:7075-7088.
- Both, G. W., J. S. Mattick, and A. R. Bellamy. 1983. Serotype-specific glycoprotein of simian 11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3091-3095.
- Chan, W., M. E. Penaranda, S. E. Crawford, and M. K. Estes. 1986. Two glycoproteins are produced from the rotavirus neutralization gene. Virology 151:243-252.
- Charpilienne, A. F., F. Borrás, L. D'Auriol, F. Galibert, and J. Cohen. 1986. Sequence of the gene encoding the outer glycoprotein of the bovine rotavirus (RF strain) and comparison with homologous genes from four bovine, simian and human rotaviruses. Ann. Inst. Pasteur Virol. 137:71-77.
- 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.
- Dyall-Smith, M. L., and I. H. Holmes. 1984. Sequence homology between human and animal rotavirus serotype-specific glycoproteins. Nucleic Acids Res. 12:3973-3982.
- Dyall-Smith, M. L., I. Lazdins, G. W. Tregear, and I. H. Holmes. 1986. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3465-3468.
- Elleman, T. C., P. A. Hoyne, M. L. Dyall-Smith, I. H. Holmes, and A. A. Azad. 1983. Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein of UK bovine rotavirus. Nucleic Acids Res. 11:4589-4701.
- Ericson, B. L., D. Y. Grabam, 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.
- Espejo, R. T., S. López, and C. Arias. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and effect of trypsin. J. Virol. 37: 156-160.
- Estes, M. K., D. Y. Grabam, and B. B. Mason. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. J. Virol. 39:879-888.
- Flewett, T. H., and G. N. Woode. 1978. The rotaviruses. Arch. Virol. 57:1-23.
- Glass, R., J. Keith, O. Nakagomi, T. Nakagomi, J. Askas, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and J. Flores. 1985. Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus: comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotaviruses. Virology 141:292-298.
- Gombold, J. L., and R. F. Ramig. 1986. Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA11 and RRV. J. Virol. 57:110-116.
- Gorziglia, M., Y. Aguirre, Y. Hoshino, J. Esparza, I. Blumen-



- tab, J. Arskov, M. Thompson, R. I. Glass, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1986. VP7 serotype-specific glycoprotein of OSU porcine rotavirus: coding assignment and gene sequence. *J. Gen. Virol.* 67:2445-2454.
23. Green, K. Y., K. Midthum, M. Gorziglia, Y. Hoshino, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and J. Flores. 1987. Comparison of the amino acid sequences of the major neutralization protein of four human rotavirus serotypes. *Virology* 161:153-159.
24. Green, K. Y., J. F. Sears, K. Taniguchi, K. Midthum, Y. Hoshino, M. Gorziglia, K. Nishikawa, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and J. Flores. 1985. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. *J. Virol.* 62:1819-1823.
25. Greenberg, H. B., V. McAuliffe, J. Valdesuso, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalica, Y. Hoshino, and N. H. Singh. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39:91-99.
26. Greenberg, H. B., J. Valdesuso, K. Midthum, 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 surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47:267-275.
27. Gunn, P. R., F. Sato, K. F. H. Powell, A. R. Bellamy, J. R. Napier, D. R. K. Harding, W. S. Hancock, L. J. Litman, and G. W. Both. 1985. Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. *J. Virol.* 54:791-797.
28. Helmer, I. H. 1983. Rotavirus, p. 359-423. In W. K. Joklik (ed.), *The reoviridae*. Plenum Publishing Corp., New York.
29. 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.
30. 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.
31. Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock. 1985. Rotaviruses, p. 863-906. In B. N. Fields (ed.), *Virology*. Raven Press, New York.
32. López, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J. H. Strauss, and R. T. Espejo. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144:11-19.
33. López, S., C. F. Arias, E. Mendez, and R. T. Espejo. 1986. Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology* 154:224-227.
34. Mason, B. B., S. K. Dheer, C. Hsiao, G. Zandle, B. Korstek, E. I. Rosandoff, P. O. Hung, and A. R. Davis. 1985. Sequence of the serotype-specific glycoprotein of the human rotavirus Wa strain and comparison with other human rotavirus serotypes. *Virus Res.* 2:291-299.
35. Matsuno, S., A. Hasegawa, A. Mukeyama, and S. Inouye. 1985. A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.* 54: 623-624.
36. Matsuno, S., and S. Inouye. 1983. Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhea virus and preparation of its antisera. *Infect. Immun.* 39:155-158.
37. Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65:499-560.
38. Nagesha, H. S., and I. H. Holmes. 1988. New porcine rotavirus serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. *J. Clin. Microbiol.* 26:171-174.
39. Omit, P. A., R. D. Shaw, and H. B. Greenberg. 1986. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to VP3 and VP7. *J. Virol.* 58:700-703.
40. Richardson, M. A., A. Itanoto, N. Ikegami, A. Nomoto, and Y. Furusaki. 1984. Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific antigen of human (Wa) rotaviruses: comparison with the homologous genes from simian SA11 and UK bovine rotaviruses. *J. Virol.* 51:860-862.
41. Rodger, S. M., and I. H. Holmes. 1979. Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J. Virol.* 30:839-846.
42. Shaw, R. D., D. L. Stoner-Ma, M. K. Estes, and H. B. Greenberg. 1985. Specific enzyme-linked immunosorbent assay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J. Clin. Microbiol.* 22:286-291.
43. Shaw, R. D., P. T. Vo, P. A. Omit, B. S. Coulson, and H. B. Greenberg. 1986. Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology* 155:434-451.
44. Stürzker, S. C., P. L. Whitfield, D. L. Christie, A. R. Bellamy, and G. W. Both. 1987. Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 105:2897-2903.
45. Taniguchi, K., Y. Hoshino, K. Nishikawa, K. Y. Green, W. L. Maloy, Y. Morita, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and M. Gorziglia. 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.
46. Taniguchi, K., S. Urasawa, and T. Urasawa. 1985. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 66:1045-1053.
47. Ward, R. L., D. R. Knowlton, G. M. Schib, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg. 1988. Relative concentrations of serum neutralizing antibodies to VP3 and VP7 proteins in adults infected with a human rotavirus. *J. Virol.* 62:1543-1549.

DISCUSION

Actualmente, basados en ensayos de neutralización in vitro los rotavirus se clasifican en 7 diferentes serotipos. Esta clasificación considera a todos los rotavirus, independientemente de la especie animal de donde fueron aislados. Dentro de estos 7 serotipos, cuatro serotipos (1 al 4) pertenecen a rotavirus humanos y cinco serotipos (3 al 7) pertenecen a rotavirus de especies animales. Notablemente cepas de rotavirus con serotipos 3 y 4 se han aislado tanto de humanos como de animales. En el caso de rotavirus porcinos hasta ahora solo se han descrito dos serotipos distintos, clasificados por Hoshino et al, (34) como serotipos 4 y 5, representados por los virus Gottfried y OSU, respectivamente.

Los resultados de neutralización obtenidos en este estudio demuestran de manera consistente la exclusividad antigenica de YM respecto a los seis serotipos analizados. Aunque no estuvieron disponibles para nuestro estudio cepas de rotavirus pertenecientes al serotipo 7, el hecho de que virus con este serotipo hayan sido aislados solo de aves (pollos y pavos) sugiere que YM representa en realidad un nuevo serotipo de los siete clasificados.

En los resultados mostrados en la tabla 1 se observó que el suero anti-YM no neutralizó significativamente a la mayoría de virus de otros serotipos. Sin embargo, el rotavirus YM fue consistentemente neutralizado aunque a bajo título, por los diferentes sueros anti-rotavirus. Trabajos previos han demostrado que anticuerpos dirigidos contra VP3 pueden participar en la neutralización del virus. Es probable que en los diferentes sueros probados existan anticuerpos que posean afinidad para VP3 de YM y como consecuencia se observe cierta neutralización. La no relación antigenica por ensayos de neutralización de la VP7 de YM con las VP7's de rotavirus de serotipos 1, 2, 3, y 5, es apoyada por la resistencia del virus YM a ser neutralizado por anticuerpos monoclonales dirigidos contra la VP7 de rotavirus pertenecientes a los serotipos mencionados.

El ensayo de ELISA para determinar el subgrupo de los rotavirus, mostro que YM pertenece al subgrupo I, al igual que el rotavirus OSU, mientras que el rotavirus Gottfried pertenece al subgrupo II. Este resultado muestra una diferencia importante entre el rotavirus YM y el rotavirus Gottfried, el cual no estuvo disponible para este estudio.

Sabiendo que VP7 es la proteína que determina principalmente el serotipo de cada cepa de rotavirus, resultado atractivo el profundizar su estudio en el rotavirus YM, para así conocer su estructura primaria y su relación molecular con otros rotavirus ya estudiados. El gene que codifica para esta proteína puede ser el 8 o el 9 dependiendo de la cepa de rotavirus. Una hibridación heteróloga del genoma total de YM con la clona pSR9-65, que

contiene una copia de cDNA del gene 9 del rotavirus SA11, mostró que en YM, VP7 esta codificada también por el gene 9 (Lopez M.T. et al, manuscrito en preparación).

La secuenciación del gene 9 de YM a partir de clonas obtenidas de un banco de cDNA construido por Lopez et al. (manuscrito en preparación) mostró una secuencia nucleotidica con características similares a las reportadas para otros genes equivalentes. La comparación de la secuencia obtenida con las descritas con anterioridad mostró que el gene 9 de YM es más homólogo a los genes equivalentes de rotavirus aislados de animales que aquellos aislados de humanos. La mayor homología la tuvo con el rotavirus porcino OSU (82%), lo que probablemente refleje la especie animal común que infectan.

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a VP7's de distintas cepas de rotavirus han mostrado homologías de entre 91% y 100% para cepas de un mismo serotipo, mientras que cepas pertenecientes a distintos serotipos poseen una homología no mayor del 86%. Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de VP7 de YM con las equivalentes de otras cepas de rotavirus (Fig. 6), se observó que las secuencias más homologas a YM fueron las derivadas de rotavirus pertenecientes al serotipo 3 (86-89%). Sin embargo, el comportamiento de estas últimas fue similar con las cepas D, Mo, M37, Wa, (serotipo 1), OSU (serotipo 5) y NCDV y UK (serotipo 6), donde la homologia fue de 81%-86%. YM y OSU mostraron también una homología relativamente alta (87%). Estos

resultados implican que puede existir una homología de hasta el 89% entre dos cepas diferentes sin estar relacionadas serotípicamente.

Con la obtención y secuencia en SA11 de mutantes que escapan de la neutralización por anticuerpos monoclonales específicos contra VP7, se han mapeado 3 diferentes regiones de la proteína que parecen ser fundamentales en la neutralización del virus. Estas regiones altamente conservadas entre cepas de un mismo serotipo y diferentes entre cepas de distintos serotipos (Fig. 7) estuvieron localizados en los aminoácidos 87-101 (región A), 143-152 (región B), y 208-221 (región C).

Cuando Dyal1-Smith et al (16) compararon las secuencias de los mutantes de SA11 con las correspondientes en el virus nativo, identificaron cambios en los aminoácidos 94 (Asn x Ser) y 96 (Asn x Asp) de la región A; 147 (Thr x Ala) de la región B y 211 (Asp x Asn) de la región C. Por otro lado, Taniguchi et al demostraron cambios similares en los aminoácidos 94 (Asn x Ser) y 97 (Asp x Gly) de la región A y 211 (Asn x Asp) y 213 (Asp x Gly) de la región C, utilizando la cepa KU de rotavirus humano (serotipo 1). Basados en estas observaciones se ha determinado que estas regiones contienen epitopes de neutralización. Cuando se compararon las regiones A, B, y C entre 2 cepas con el mismo serotipo, solamente difirieron en uno o dos aminoácidos. Sin embargo, cuando se compararon las regiones correspondientes en YM con las descritas anteriormente, una amplia diferencia fue observada con todas las cepas analizadas.

Estas observaciones de tipo molecular, confirman que el rotavirus YM pertenece a un serotipo diferente a los siete clasificados, como habia sido mostrado por los ensayos de neutralización. Por otro lado, la existencia de cuando menos 3 regiones (A, B, y C) que contienen epitopes de neutralización implica que la especificidad de serotipo esta determinada por aminoacidos ubicados en distintas regiones que en conjunto determinan la especificidad serotipica para cada cepa de rotavirus. Finalmente los datos obtenidos en este estudio sugieren que dentro del genero rotavirus, YM es un buen candidato para ser considerado como un nuevo serotipo tanto para la especie porcina como para las diversas especies animales existentes, incluyendo la humana.

LITERATURA CITADA

1. Albert, M.J., L.E. Unicom, and R. Bishop. 1987. Cultivation and characterization of human rotavirus with "super short" RNA patterns. *J. Clin. Microbiol.* 25: 183-185.
2. Arias, C.F., T. Ballado, and M. Plebanski. 1986. Synthesis of the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in *Escherichia coli*. *Gene* 47: 211-219.
3. Arias, C.F., M. Lizano, and S. Lopez. 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* 68: 633-642.
4. Arias, C.F., S. Lopez, J.R. Bell, and J.H. Strauss. 1984. Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. *J. Virol.* 50: 657-661.
5. Andrew, M.E., D.B. Boyle, B.E.H. Coupar, P.L. Whiffeld, G.W. Both and R. Bellamy. 1987. Vaccine virus recombinants expressing the SA11 rotavirus VP7 glycoprotein gene induce serotype-specific neutralizing antibodies. *J. Virol.* 61: 1054-1060.
6. Arias, C.F., S. Lopez, and R.T. Espejo. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.* 41:42-50.

7. Bastardo, J.W., J.L. McKinn-Breackin, S. Bonza, L.D. Mercer, and I.H. Holmes. 1981. Preparation and characterization of antisera to electrophoretically purified SA11 virus polypeptides. *Infect. Immun.* 34: 641-647.
8. 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 viral gastroenteritis. *Lancet* ii: 1281-1283.
9. Bohl, E.H., K.W. Theil, and L.J. Saif. 1984. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 19: 105-111.
10. Both, G.W., A.R. Bellamy, J.E. Street, and L.J. Siegman. 1982. A general strategy for cloning double-stranded RNA: nucleotide sequence of the simian-11 rotavirus gene 8. *Nucleic Acids Res.* 10: 7075-7088.
11. Both, G.W., J.S. Mattick, and A.R. Bellamy. 1983. Serotype-specific glycoprotein of simian 11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3091-3095.
12. Chan, W., M.E. Penaranda, S.E. Crawford, and M.K. Estes. 1986. Two glycoproteins are produced from the rotavirus neutralization gene. *Virology* 151: 243-252.
13. Charpilienne, A.F., F. Borrás, L. D'Auriol, F. Galibert, and J. Cohen. 1986. Sequence of the gene encoding the outer glycoprotein of the bovine rotavirus (RF strain) and

- comparison with homologous genes from four bovine, simian and human rotaviruses. *Ann. Inst. Pasteur Virol.* 137: 71-77.
14. Clark, H.F., Y. Hoshino, L.M. Bell, J. Groff, G. Hess, P. Bachman, and P.A. Offit. 1987. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1757-1762.
 15. Dyall-Smith, M.L., and I.H. Holmes. 1984. Sequence homology between human and animal rotavirus serotype-specific glycoproteins. *Nucleic Acids Res.* 12: 3973-3982.
 16. Dyall-Smith, M.L., I. Lazdins, G.W. Tregear, and I.H. Holmes. 1986. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3465-3468.
 17. Elleman, T.C., P.A. Hoynes, M.L. Dyall-Smith, I.H. Holmes, and A.A. Azad. 1983. Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein of UK bovine rotavirus. *Nucleic Acids Res.* 11: 4689-4701.
 18. 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.
 19. Espejo R.T., S. Lopez, C. Arias. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and effect of trypsin. *J. Virol.* 37: 156-160.

20. Estes, M.K., D.V. Graham, and B.B. Mason. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39: 879-888.
21. Fernølius, A.L., A.E. Ritchie, L.G. Classick, J.O. Norman, and C.A. Mebus. 1972. Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhea from a field outbreak in Nebraska. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 37: 114
22. Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davies, H., Woode, G.N., Bridger, J.C., and Derrick, J.M. 1974. Relationship between virus from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet.* 2: 61-63.
23. Flewett, T.H., and G.N. Woode. 1978. The rotaviruses. *Arch. Virol.* 57: 1-23.
24. Glass, R., J. Keith, O. Nakagomi, T. Nakagomi, J. Askaa, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock, and J. Flores. 1985. Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus: comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotaviruses. *Virology* 141: 292-298.
25. Gombold, J.L., and R.F. Ramig. 1986. Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA11 and RRV. *J. Virol.* 57:110-116.

26. Gorziglia, M., Y. Aguirre, Y. Hoshino, J. Esparza, I. Blumentals, J. Askaa, M. Thompson, R.I. Glass, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock. 1986. VP7 serotype-specific glycoprotein of OSU porcine rotavirus: coding assignment and gene sequence. *J. Gen. Virol.* 67: 2445-2454.
27. Green, K.Y., K. Midthun, M. Gorziglia, Y. Hoshino, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock, and J. Flores. 1987. Comparison of the amino acid sequences of the mayor neutralization protein of four human rotavirus serotypes. *Virology* 161: 153-159.
28. Green, K.Y., J.F. Sears, K. Taniguchi, K. Midthun, Y. Hoshino, M. Gorziglia, K. Nishikawa, S. Urasawa, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock, and J. Flores. 1988. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. *J. Virol.* 62: 1819-1823.
29. Greenberg, H.B., V. McAuliffe, J. Valdesuso, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalica, Y. Hoshino, and N.H. Singh. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39: 91-99.
30. Greenberg, H.B., J. Valdesuso, K. Midthun, M. Walsh, V. McAuliffe, R.G. Wyatt, A.R. Kalica, J. Flores, and Y. Hoshino. 1983b. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47: 267-275.

31. Gunn, P.R., F. Sato, K.F.H. Powell, A.R. Bellamy, J.R. Neapier, D.R.K. Harding, W.S. Hancock, L.J. Liagan, and G.W. Both. 1985. Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. *J. Virol.* 54: 791-797.
32. Gorziglia, M., Y. Hoshino, K. Nishikawa, W. Leemaloy, R.W. Jones, A.Z. Kapikian and R.M. Chanock. 1988. Comparative sequence analysis of the genomic segment 6 of four rotavirus each with a different subgroup specificity. *J. Gen. Virol.* 69:1659-1669.
33. Holmes, I.H. 1983. Rotavirus, p. 359-423. In W.K. Joklik (ed.), *The Reoviridae*. Plenum, New York.
34. 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.
35. 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.
36. Kapikian, A.Z., and R.M. Chanock. 1985. Rotaviruses, p. 863-906. In B.N. Fields (ed.), *Virology*. Raven Press, New York.

37. Kitaoka, S., T. Nakagami, N. Fukuhara, Y. Hoshino, H. Suzuki, D. Nakagomi, A.Z. Kapikian, T. Ebina, T. Konno and N. Ishida. 1987. Serological characteristics of a human rotavirus isolate, AU-1, which has a "long" RNA pattern and subgroup I specificity. *J. Med. Virol.* 23: 351-357.
38. Lopez, S., C.F. Arias, J.R. Bell, J.H. Strauss, and R.T. Espejo. 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144: 11-19.
39. Lopez, S., C.F. Arias, E. Mendez, and R.T. Espejo. 1986. Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology* 154: 224-227.
40. Matthews, R.E.F. 1982. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in the Estrasburgo, France. *Intervirology* 17, No. 1-3
41. Malherbe, H.H., Harvin, R., and Ulrich, M. 1963. The cytopathic effect of vervet monkey viruses. *S. Afr. Med. J.* 37: 407-411.
42. Mackow, E.R., R.D. Shaw, S.M. Matsui, P.T. Vo, D. Benfield, and H.B. Greenberg. 1988. Characterization of homotypic and heterotypic VP7 neutralization sites of rhesus rotavirus. *Virology*. In Press.

43. Mason, B.B., S.K. Dheer, C. Hsiao, G. Zandle, B. Kostek, E.I. Rosanoff, P.O. Hung, and A.R. Davis. 1985. Sequence of the serotype-specific glycoprotein of the human rotavirus Wa strain and comparison with other human rotavirus serotypes. *Virus Res.* 2: 291-299.
44. Matsuno, S., and S. Inouye. 1983. Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhea virus and preparation of its antisera. *Infect. Immun.* 39: 155-158.
45. Matsuno, S., A. Hasegawa, A. Mukoyama, and S. Inouye. 1985. A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.* 54: 623-624.
46. Maxam, A.M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end labeled DNA with base specific chemical cleavage. *Methods Enzymol.* 65: 499-560.
47. Liu, M., Dffit, P.A., and Estes, M. 1988. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 163: 26-32.
48. Nagesha, H.S., and I. H. Holmes. 1988. New porcine rotavirus serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. *J. Clin. Microbiol.* 26: 171-174.
49. Dffit P.A., R.D. Shaw, and H. B. Greenberg. 1986. Passive protection against rotavirus induced diarrhea by monoclonal antibodies to VP3 and VP7. *J. Virol.* 58: 700-703.
50. Petric, M., M.T. Szymanski, and P.J. Middleton. 1975. Purification and preliminary characterization of infantile gastroenteritis virus (orbivirus group). *Intervirology* 5: 233

51. Richardson, M.A., A. Iwamoto, N. Ikegami, A. Nomoto, and Y. Furuichi. 1984. Nucleotide sequence of the gene encoding the serotype-specific antigen of human (Wa) rotaviruses: comparison with the homologous genes from simian SA11 and UK bovine rotaviruses. *J. Virol.* 51: 860-862.
52. Rodger, S.M., and I.H. Holmes. 1979. Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J. Virol.* 30: 839-846.
53. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
54. Snyder, J.D. and Merson, M.H. 1982. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal diseases: a review of active surveillance data. *Bull. WHO.* 60: 605-613.
55. Shaw, R.D., D.L. Stoner-Ma, M.K. Estes, and H.B. Greenberg. 1985. Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J. Clin. Microbiol.* 22: 286-291.
56. 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.
57. Stirzaker, S.C., P.L. Whitfeld, D.L. Christie, A.R. Bellamy, and G.W. Both. 1987. Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 105: 2897-2903.

58. Taniguchi, K., S. Urasawa, and T. Urasawa. 1985. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 66: 1045-1053.
59. Taniguchi, K., Y. Hoshino, K. Nishikawa, K.Y. Green, W.L. Maloy, Y. Morita, S. Urasawa, A.Z. Kapikian, R.M. Chanock, and M. Gorziglia. 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.
60. Thouless, M.E., R.F. Digiacomo, and D.S. Newman. 1986. Isolation of two lapine rotaviruses: Characterization of their subgroup, serotype and RNA electropherotypes. *Arch. Virol.* 89: 161-170.
61. Venkataram, B.V., G. Wang, J. Clerx, and W. Chiu. 1988. Tree-dimensional Structure of Rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199:269-275.
62. Ward, R.L., D.R. Knowlton, G.M. Schiff, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg. 1988. Relative concentrations of serum neutralizing antibodies to VP3 and VP7 proteins in adults infected with a human rotavirus. *J. Virol.* 62: 1543-1549.