

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

ESTUDIO DE LA RELACION ANTIGENICA  
ENTRE LOS ROTAVIRUS DE HUMANOS  
Y LOS ROTAVIRUS DE ANIMALES

TESIS

Para obtener el título de :

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

Luis Padilla Noriega

Con la asesoría de:

Dr. Romilio Espejo Torres

Trabajo llevade a cabo en  
el Instituto de Investigaciones Biomédicas

México D. F., 1979

14'  
2



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## I N D I C E

INTRODUCCION	pag.
1.- Descubrimiento y clasificación de los rotavirus	1
2.- Morfología	1
3.- Composición de polipéptidos	2
4.- Composición del genoma	2
5.- Crecimiento de rotavirus en cultivo de células	3
6.- Diferencias serológicas entre los distintos rotavirus	3
MATERIAL Y METODOS	
1.- Cultivo de Células	6
2.- Virus	6
3.- Purificación de virus	7
4.- Sueros	8
5.- Microscopía electrónica	8
6.- Contrainmunolectroforesis	9
7.- Inmunolectroforesis	10
8.- Neutralización de SA-11 y NCDV	10
9.- Amortiguadores y soluciones	12
RESULTADOS	
Comparación de los rotavirus de mono (SA-11) y de ternero (NCDV)	
1.- Neutralización	13
2.- Contrainmunolectroforesis	15
Comparación de distintas cepas del rotavirus de humano con rotavirus de animales	
1.- Neutralización	19
2.- Contrainmunolectroforesis	20
DISCUSION	25
BIBLIOGRAFIA	28

## I N T R O D U C C I O N

### 1.- Descubrimiento y clasificación de los rotavirus

En 1973 Bishop et al. (1) en Melbourne, Australia encontraron partículas similares a los reovirus y orbivirus en biopsias de células epiteliales de la mucosa duodenal de niños en la fase sintomática de gastroenteritis y los clasificaron tentativamente como orbivirus.

A partir de entonces se ha descrito en muchas partes del mundo, la presencia de partículas idénticas a las observadas por Bishop et al. en heces de un alto porcentaje de niños con gastroenteritis (2-10) y en heces de terneros (11), ratones (12), lechones (13), caballos (14), corderos (15) y conejos (16) con gastroenteritis. Previamente se habían aislado virus morfológicamente idénticos de un lavado rectal de mono (virus SA-11) y de lavados intestinales de bovino y ovino (agente "O"), pero no habían sido relacionados con diarrea en estos animales.

Estos virus para quienes ha sido propuesto por Flewett et al. (17) el nombre de rotavirus (del Latín rota = rueda) por la semejanza que presentan con una rueda de carreta al ser vistos al microscopio electrónico, son distintos morfológicamente y serológicamente de los reovirus y orbivirus, por lo que se justifica su inclusión en un género separado dentro de la familia Reoviridae.

### 2.- Morfología

Los rotavirus consisten de un "core" de aproximadamente 40 nm de diámetro, en forma de un icosaedro que contiene a los ácidos nucleicos del virus en asociación con proteínas; este "core" está rodeado por una cápside interna que presenta una línea basal de la que radian proyecciones hacia la periferia que semejan los rayos de una rueda y dan a las

partículas un diámetro de 65 nm (18). Sobre estos capsómeros internos se encuentra una segunda cápside semejante a un anillo finamente definido, liso (sin proyecciones) y con un ancho de 4-5 nm, por lo que las partículas completas tienen un diámetro de 75 nm (18).

La cápside o capa externa se pierde frecuentemente de tal manera que los rotavirus aislados de heces contienen mezclas de partículas con y sin la capa externa, o muchas veces solo partículas sin la capa externa. Los dos tipos de partículas son separables por sus densidades boyantes al centrifugar a equilibrio en un gradiente de cloruro de cesio (19). Las partículas sin capa externa ("pesadas",  $\rho = 1.38 - 1.39 \text{ gr/cm}^3$ ) son mas densas que las partículas completas ("livianas",  $\rho = 1.36 \text{ gr/cm}^3$ ); sin embargo, la separación no es siempre completa y se pueden encontrar partículas que perdieron solo una parte de la capa externa, junto a las partículas pesadas.

### 3.- Composición de polipéptidos

El rotavirus de humano esta compuesto al menos de 8 polipéptidos con pesos moleculares entre 21 000 y 127 000 (20), tres de los cuales corresponden a la capa externa. Los rotavirus de bovino y de mono (SA-11) presentan 9 polipéptidos con pesos moleculares entre 14 500 y 131 000 para el primero y entre 14 000 y 133 000 para SA-11 (20), y en ambos casos 4 polipéptidos corresponden a la capa externa. Estos tres rotavirus difieren entre sí en el peso molecular de varios de sus polipéptidos.

### 4.- Composición del genoma

Los genomas de los rotavirus de humano, bovino y SA-11 consisten de 11 segmentos de ácido ribonucleico de cadena doble (21), separables por

electroforesis en gel de acrilamida. Los patrones electroforéticos que resultan son distintos y permiten diferenciar a los rotavirus de distintas especies. Se han encontrado también variaciones en los genomas de rotavirus aislados de una sola especie (10, 22, 23) y estas variaciones permiten clasificar a los diferentes aislados como pertenecientes a distintos "tipos".

Se han descrito dos tipos del rotavirus de humano que difieren principalmente en el peso molecular del segmento número 2 (10), por lo que han sido llamados tipo 2L (L de large = grande) y tipo 2S (S de small = pequeño). Estas variaciones en el genoma de rotavirus que infectan a una sola especie dan lugar a diferencias en la movilidad electroforética de las proteínas estructurales del virus (Espejo, P., comunicación personal), pero aún no se ha demostrado que den lugar a una diferencia antigénica.

#### 5.- Crecimiento de rotavirus en cultivo de células

Los rotavirus de ternero (NCDV) y SA-11 han sido adaptados a crecer en cultivo de células (24, 25), sin embargo esto no ha sido posible con el rotavirus de humano (RVH).

En ensayos de infectividad de rotavirus de ternero sobre células en cultivo, se observó que la razón de infectividad por partícula es 1000 veces mayor para partículas completas que para aquellas sin capa externa (19).

#### 6.- Diferencias serológicas entre los distintos rotavirus

Los rotavirus que infectan a diversas especies se han estudiado a través de varias pruebas serológicas (fijación de complemento (FC), contraelectroforesis (CIEF), inhibición de la hemaglutinación

(IHA), neutralización (NT), inmunoensayo acoplado a una reacción enzimática (ELISA) e inmuno-microscopía electrónica (IME). Con algunas de ellas (FC, CIEF, ELISA) se ha trabajado con un antígeno no caracterizado con respecto a su composición de virus livianos y pesados.

La diferencia antigénica parece deberse principalmente a la capa externa, pero las observaciones no son muy claras; los antígenos de la cápside interna son muy similares y no ha sido posible distinguir por IME (26) entre los antígenos internos de los rotavirus provenientes de distintas especies, sin embargo, en nuestro laboratorio se han observado diferencias entre los rotavirus SA-11 y NCDV en la migración electroforética de dos polipéptidos de la cápside interna (datos no publicados) que podrían dar lugar a diferencias serológicas. Zissis et al. ha encontrado dos serotipos de rotavirus por FC (27), y observa que puede distinguir estos utilizando virus sin capa externa (comunicación personal), por lo que la diferencia podría también radicar en los antígenos internos.

Debido a estos hallazgos, en el presente trabajo se hizo una comparación serológica por CIEF, de los antígenos internos de dos rotavirus de animales y varios aislados de rotavirus de humano.

Yolken et al. (28) ha diferenciado a los rotavirus que infectan a distintas especies por la distinta capacidad de los sueros (de animales convalecientes de infección con distintos rotavirus) para bloquear la reacción anticuerpo-antígeno (rotavirus) medida por ELISA; sin embargo, se usa un antígeno crudo (filtrado o suspensión de heces) del cual no se sabe su composición con respecto a virus con y sin la capa externa, por lo que no es posible concluir através de sus experimentos, en que parte del virus radica la diferencia.

Los antígenos de la capa externa muestran reacción cruzada por IME entre los rotavirus que infectan a distintas especies, aunque se han observado algunas excepciones (26, 29).

Los antígenos de neutralización (30) y hemaglutinación (31), ubicados posiblemente en la capa externa, son específicos entre los rotavirus que infectan a diversas especies, pero con algunas excepciones, pues se ha encontrado que algunos sueros anti-rotavirus de humano cruzan con NCDV por NT (32) y por IHA (33).

Para decidir si estos casos (32, 33) son en realidad excepciones, se hizo en el presente trabajo una comparación de los antígenos de la capa externa entre varios aislados del rotavirus de humano y dos rotavirus de animales (SA-11 y NCDV) por las técnicas de CIEF y NT.

Se han encontrado dos cepas de rotavirus de humano por FC (27), 4 por NT (34) y dos por ELISA (35), pero no se sabe si las cepas encontradas por alguna de estas técnicas correlaciona con alguno de los tipos distinguidos por el patrón de ácidos nucleicos.

En el presente trabajo se utilizaron dos aislados de rotavirus de humano de distinto tipo (2L y 2S) para saber si esta característica correlaciona con alguna de las propiedades antigénicas que se midieron.



## M A T E R I A L   Y   M E T O D O S

### 1.- Cultivo de células

Se utilizó la línea MA-104 de células de riñón de mono, obtenida del Dr. H. H. Malherbe de la Universidad de San Antonio, Texas.

Las células fueron crecidas a 37°C y bajo 5% de CO<sub>2</sub>, en Medio Mínimo Escencial de Eagle (MEM) con 250 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycinina y 10% de suero fetal de bovino (SFB).

Para los ensayos de neutralización se sembraron sobre placas de microtitulación (Lux de 96 pozos de fondo plano) aproximadamente  $2 \times 10^4$  células en 0.2 ml. de medio por pozo, se incubaron hasta confluencia, se lavó dos veces con amortiguador fosfatos-salina (AFS) y se puso MEM sin suero. En estas condiciones las células están listas para ser infectadas.

Para la producción de virus SA-11 se utilizó MEM sin suero y para la producción de virus NCDV se utilizó MEM sin suero conteniendo 1 µg de tripsina por ml.

### 2.- Virus

El rotavirus SA-11 (Simian Agent 11) aislado en Sudáfrica de un lavado rectal de mono y adaptado a cultivo de células, fué obtenido del Dr. H. H. Malherbe de la Universidad de San Antonio Texas. El rotavirus NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus) aislado en Nebraska U. S. A. de heces de una ternera con diarrea y adaptado a cultivo de células, fué obtenido del Dr. R. Spenlove, Utah State University.

Se produjeron ambos virus infectando células MA-104 con 150 DICT (dosis infecciosas en cultivo de tejidos) por cm<sup>2</sup> de células confluentes. Cuando las células mostraban aproximadamente 75% de efecto citopático, es decir, cuando se estimaba al observar al microscopio que el

75% de las células se habían desprendido, se terminaba el proceso desprendiendo mecánicamente las células que aún estaban adheridas y con la suspensión de virus así obtenidos se hicieron los ensayos de neutralización.

### 3.- Purificación de virus

La suspensión de virus obtenida de cultivo de células o la suspensión de heces al 10% en amortiguador TSM fué tratada con triclorotrifluoroetano (Freón) vol/vol, agitada durante 10 minutos y centrifugada durante 30 minutos a 10 000 x g; al sobrenadante obtenido se le añadió polietilenglicol al 50% para obtener una concentración final de 8% y se incubó a 4°C durante la noche, posteriormente se centrifugó a 4 000 x g durante 30 minutos y el depósito se resuspendió en 3.5 ml de amortiguador TSM. Esta suspensión se centrifugó a 100 000 x g durante 1 hora en tubos de 5 ml con un colchón intermedio de 1 ml de sacarosa al 45% (peso/volumen) sobre 0.5 ml de CsCl ( $\rho = 1.40$ ). La suspensión de virus concentrada en la interfase sacarosa-CsCl fué cuidadosamente retirada y luego mezclada con una solución de CsCl ( $\rho = 1.37$ ), la densidad se reajustó añadiendo granos de CsCl o solución amortiguadora (TSM) hasta el índice de refracción correspondiente a un  $\rho$  de 1.37. Se centrifugó a 180 000 x g durante 18 horas y al finalizar se recogieron de 25 a 30 fracciones y aquellas conteniendo los virus se dializaron contra TSM.

Del virus SA-11 se obtuvieron dos bandas con densidades de 1.36 y 1.39, que vistas al microscopio electrónico corresponden a virus con y sin la capa externa, respectivamente. Del virus NCDV se obtuvo solo una banda con una densidad de 1.39, compuesta por partículas sin capa externa.

Los rotavirus de humano (RVH) fueron aislados de heces de niños con diarrea internados en el Hospital de Pediatría del IMSS en la Ciudad de México. A los distintos aislados se les asignó el número del expediente que tenían los niños hospitalizados. Se utilizaron 3 aislados del RVH, en uno (RVH-770) se encontraron solo partículas virales sin capa externa y en los otros se encontraron partículas de ambos tipos (RVH-1383 y RVH-3222).

#### 4.- Sueros

Los sueros hiperinmunes contra SA-11 y RVH-770 se obtuvieron en conejos. Se inoculó intradérmicamente una mezcla de virus con adjuvante de Freund (Miles) por tres veces consecutivas a intervalos de cuatro semanas para SA-11 y de una semana para RVH-770. Para la primera inoculación se utilizó adjuvante completo y para las dos subsiguientes adjuvante incompleto. Una semana después de la última inmunización se sangró a los animales.

Los sueros hiperinmunes contra RVH-1383 y RVH-3222 se obtuvieron también en conejos, inoculando virus purificado (densidad = 1.375) compuesto de partículas completas al microscopio electrónico. El protocolo de inmunización fué igual al del suero anti SA-11 excepto que se dió un solo refuerzo.

El suero hiperinmune contra NCDV producido en conejo nos fué proporcionado por el Dr. R. Spenlove, Utah State University.

El suero contra inmunoglobulina G humana producido en cabra, fué obtenido de Miles Co.

#### 5.- Microscopía Electrónica

La microscopía electrónica fué hecha sobre rejillas cubiertas de

carbón sobre una capa de parlodión. Inmediatamente antes de utilizar las rejillas se eliminó el parlodión poniendo estas sobre un papel filtro humedecido con acetato de amilo, para dejar solo la capa de carbón. Posteriormente las rejillas se ionizaron por medio de descargas eléctricas y se les puso una gota de la suspensión de virus, un minuto después se retiró el exceso y se tiñó durante un minuto con una gota de ácido fosfotúngstico al 1%, pH 7.

La observación se realizó en un microscopio JEOL 100-B.

#### 6.- Contraimmunoelectroforesis (CIEF)

La CIEF fué realizada en geles de agarosa hechos sobre placas de vidrio de 12 x 7 cm. Se pusieron 20 ml de agarosa al 1% en amortiguador barbital 0.033 M, pH 8.6 en cada placa, y después que esto solidificó, se perforaron 14 pares de agujeros ("pozos") de 5 mm de diámetro. La distancia entre los centros de cada par de pozos fué de 14 mm.

El suero se colocó en el ánodo y el virus en el cátodo y se corrió a 7 mA por gel durante 15 horas. El amortiguador de corrida fué el mismo que el de los geles. Una vez terminada la electroforesis los geles fueron lavados con salina al 1% y posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio 1 µg/ml durante 1 hora y se observaron las bandas bajo la luz ultravioleta de onda corta (220 nm). Enseguida los geles se secaron y se tiñeron con azul brillante de Coomassie 1 mg/ml en ácido acético al 25% durante 5 minutos (36), se lavaron en ácido acético al 25% y se observaron las bandas.

Para determinar identidad antigénica por CIEF entre dos rotavirus se estandarizó el ensayo de la siguiente manera:

1) Se eligieron las diluciones máximas, tanto de antisuero como del virus homólogo correspondiente, que produjeran una banda claramente de-

finida.

2) Se determinó la cantidad de virus necesaria para secuestrar por completo los anticuerpos del suero homólogo, para luego utilizar un exceso (el doble) de esta cantidad. El procedimiento consistió en difundir el virus durante 1 hora en el pozo del antisuero para formar un halo que adsorbe los anticuerpos si se hace enseguida la CIEF en la forma usual.

Una vez estandarizadas las cantidades, se adsorbieron los sueros con virus heterólogo y se ensayó su capacidad para reaccionar con el virus homólogo.

Para fotografiar la tinción con bromuro de etidio se utilizó película Kodak ASA 400 y película Kodak ASA 32 para fotografiar la tinción de azul de Coomassie.

#### 7.- Inmunolectroforesis (IEF)

Se hizo sobre geles hechos en placas de vidrio de 14 x 7 cm con 25 ml de agarosa al 1% en amortiguador barbital, perforados con 6 agujeros de 3 mm de diámetro y con canales para antisuero a ambos lados.

La electroforesis se corrió a 12 mA por gel durante 5 horas. El lavado y la tinción se hizo igual que para la CIEF.

#### 8.- Neutralización de SA-11 y NCDV

El suero utilizado para la neutralización fué previamente tratado a 56°C durante 30 minutos. Se hicieron diluciones seriadas 1:2 (100 µl + 100 µl) del suero en MEM sin SFB sobre placas de microtitulación (Lux, 96 pozos), y 50 µl de cada dilución fueron mezclados con un volumen igual de una suspensión de virus conteniendo  $8 \times 10^3$  DICT (dosis infecciosas en cultivo de tejidos). Se incluyeron como controles mezclas de

virus y MEM y mezclas de virus con diluciones de SFB inactivado en MEM. Después de incubar el suero + virus durante 1 hora a 37°C, se hicieron diluciones seriadas 1:4 (50 µl + 150 µl) de las mezclas sobre placas de microtitulación con células confluentes. El medio para hacer las diluciones fué siempre MEM sin SFB.

Las placas se incubaron a 37°C durante 4 días y se observaron en un microscopio invertido para determinar cuales pozos presentaban efecto citopático.

Las células infectadas con rotavirus presentan cambios progresivos en su apariencia al microscopio: se vuelven refringentes, redondeadas y finalmente se desprenden, siendo esto último indicativo de muerte celular. De entre estos cambios se eligió el desprendimiento celular como la variable de respuesta que llamamos efecto citopático, por ser de fácil diagnóstico y porque inequívocamente es efecto de la infección viral. Se consideraron positivos los pozos en que las células comenzaban a desprenderse.

Para hacer una observación macroscópica (solo con fines de ilustración, Figura 1) se hizo tinción con cristal violeta (37) durante 20 minutos, se quitó el exceso de colorante con agua corriente y se fotografió la placa.

9.- Amortiguadores y soluciones

Amortiguador fosfatos-salina (AFS)

NaCl	8	gr.
KCl	0.2	"
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	"
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	"
CaCl <sub>2</sub>	0.1	"
MgCl <sub>2</sub>	0.1	"
H <sub>2</sub> O bidestilada	1	lt.

Se esterilizan en autoclave (el CaCl<sub>2</sub> y el MgCl<sub>2</sub> en soluciones separadas) y una vez fríos se mezclan.

Amortiguador Tris-salina-magnesio (TSM)

Trizma base	0.05	M
NaCl	0.15	"
MgCl <sub>2</sub>	0.01	%

Se ajusta a pH 7.4 con HCl

Amortiguador barbital 0.033 M, pH 8.6

Colorante cristal violeta

Cristal violeta (Eastman)	1.46	gr.
Etanol 95%	50	ml.
Formaldehido 37% (peso/peso) (Fisher)	300	"
H <sub>2</sub> O bidestilada	650	"
Amortiguador AFS	1000	"

Amortiguador AFS 0.01 M, pH 7.2

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.096	gr.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.315	"
NaCl	8.5	"
H <sub>2</sub> O destilada	1	lt.

## R E S U L T A D O S

Esta sección esta dividida en dos partes, primero se presenta una comparación de dos cepas de rotavirus de distintas especies animales, que permite valorar la bondad de las técnicas empleadas y posteriormente se aplican estas técnicas a la comparación de distintos aislados del rotavirus de humano consigo mismos y con los dos rotavirus de animales.

### COMPARACION DE LOS ROTAVIRUS DE MONO (SA-11) Y DE TERNERO (NCDV)

#### Neutralización

La neutralización de virus es la disminución del título infeccioso de una suspensión de viriones cuando esta es expuesta a anticuerpos.

Los anticuerpos neutralizantes pueden bloquear varios pasos del ciclo vital de los virus como son adsorción (38, 39), desnudamiento (40, 41) o entrada (42) del virus a la célula huésped.

El ensayo de neutralización se hizo incubando una suspensión de virus con diluciones seriadas del suero y midiendo posteriormente el efecto citopático que los virus no neutralizados producen a células en cultivo. La Figura 1 muestra el resultado de un ensayo de neutralización donde es muy clara la disminución del efecto citopático al aumentar la concentración del suero.

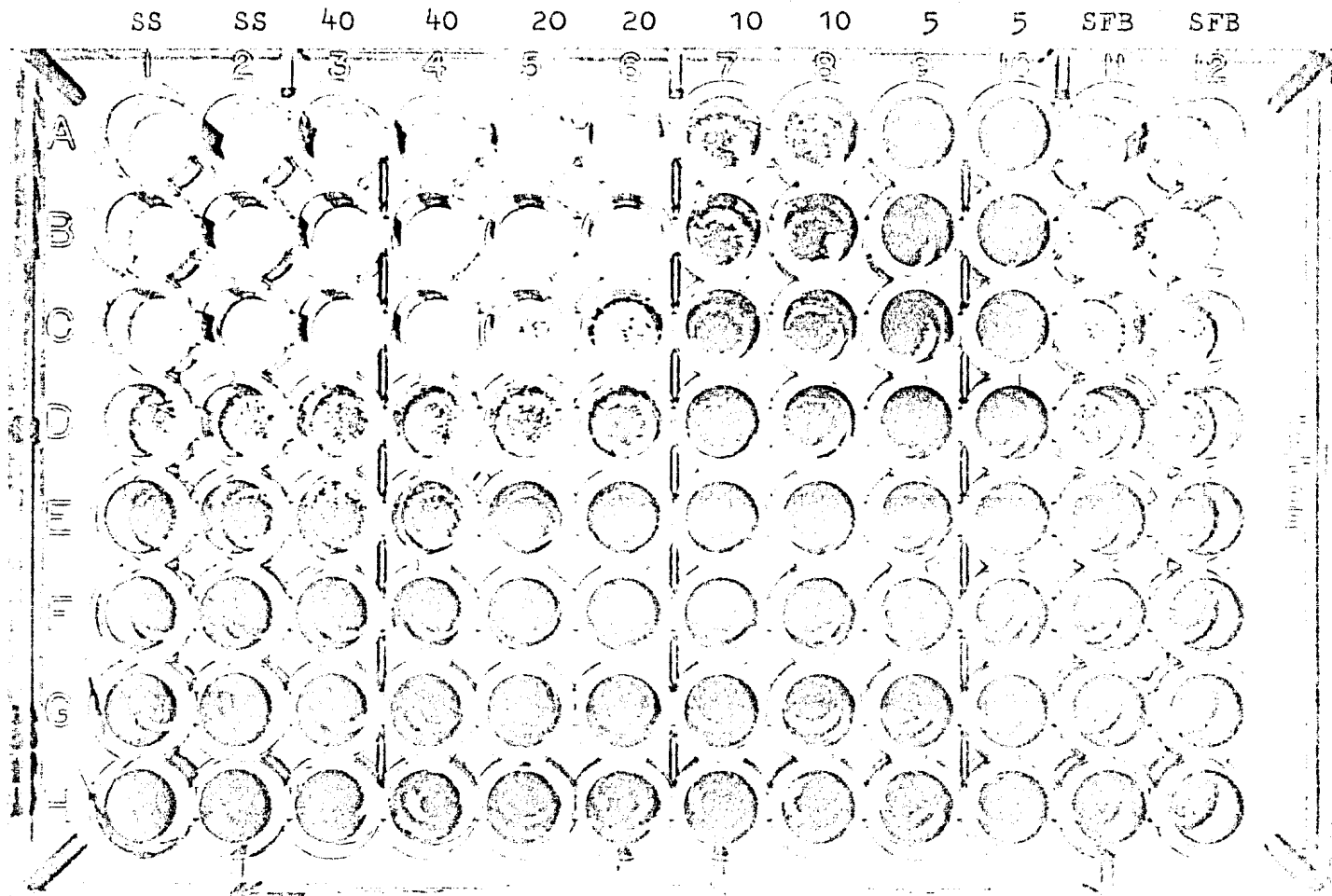
El título del suero es la mayor dilución del mismo capaz de reducir significativamente la infectividad de la preparación. El Cuadro 1 muestra los títulos obtenidos en sistemas homólogos y heterólogos.

La alta especificidad encontrada indica que los antígenos de neutralización de SA-11 y NCDV son diferentes y que esta técnica permite distinguir claramente al menos estas dos cepas.



Figura 1

Disminución del efecto citopático de NCDV al ser neutralizado por anti-NCDV



Los números indican el recíproco  $\times 10^{-2}$  de la dilución del suero. SFB es un control de virus incubado con suero fetal de bovino 1:16. SS es un control sin suero.

1000 DICT (dosis infecciosas en cultivo de tejidos) de NCDV en 50  $\mu$ l fueron incubadas con 50  $\mu$ l de distintas diluciones del suero durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se hicieron 8 diluciones seriadas 1:4 de las mezclas y se aplicaron 200  $\mu$ l por duplicado a las columnas verticales de una placa de microensayo conteniendo una monocapa de células MA-104 confluentes en cada pozo. Después de 4 días de incubación se tiñeron las células. La ausencia de tinción indica que hubo desprendimiento celular causado por la infección viral.

Cuadro 1  
Neutralización cruzada entre SA-11 y NCDV

suero	virus	
	SA-11	NCDV
anti SA-11	8192	4
anti NCDV	8	1024

Los números son los valores recíprocos del título neutralizante.

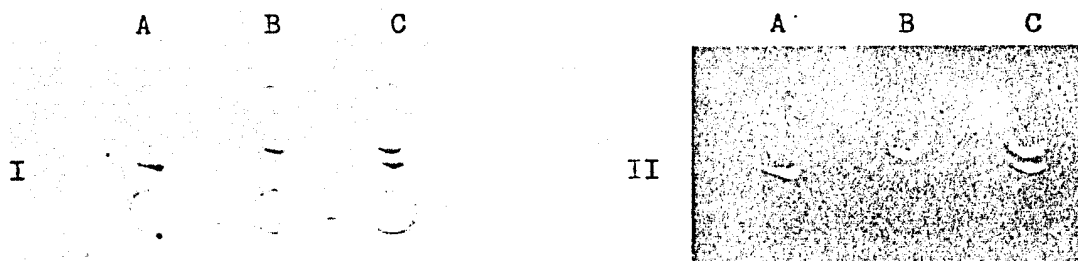
#### Contrainmunolectroforesis (CIEF)

La CIEF consiste en colocar el antígeno y los anticuerpos en dos pozos opuestos sobre una capa de gel de agarosa y aplicar una diferencia de potencial entre ambos puntos, en condiciones en que antígeno y anticuerpo migren en direcciones opuestas y al encontrarse formen una banda de precipitación. Como ambos componentes migran únicamente en direcciones opuestas, por esta técnica se obtiene una mayor sensibilidad que por la técnica de inmunodifusión, en la que ambos componentes migran en todas las direcciones del plano.

La CIEF permite además distinguir la reacción con los virus pesados y livianos sin necesidad de hacer una separación previa. La Figura 2 muestra la diferencia observada al ensayar virus SA-11 con y sin capa externa, previamente separados en un gradiente de cloruro de cesio, y una mezcla de ambos. La doble banda obtenida con la mezcla corresponde a virus en los dos estados mencionados y no a virus y algún precipitado proteico, ya que ambas se tiñen con bromuro de etidio (Figura 2, II). El bromuro de etidio se intercala entre pares de bases del ARN, y en este estado flurece bajo la luz ultravioleta de 20 a 100 veces mas que en su forma libre (43). Este tipo de tinción para inmunoprecipitados vira-

les es por lo menos tan sensible como la tinción con azul de Coomassie, con la ventaja de ser mas rápida y específica.

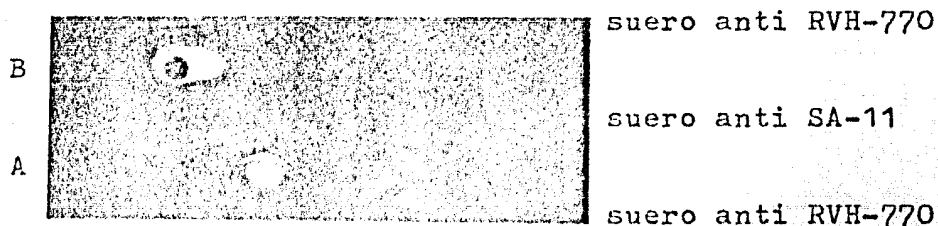
Figura 2



Contrainmuno-electroforesis de SA-11 sin capa externa (A), con capa externa (B) y de una mezcla de ambos (C) contra suero anti SA-11. Tinción con azul de Coomassie (I) y con bromuro de etidio (II).

La base para la distinción entre los dos tipos de partículas virales obtenida por CIEF pudo ser explorada por inmuno-electroforesis (IEF). La figura 3 muestra que el virus sin capa externa tiene una mayor movilidad electroforética que el virus con capa externa, e indica que las distintas posiciones para cada forma por CIEF se deben a distintas movilidades electroforéticas y no a una posible diferencia en la concentración de los anticuerpos que reaccionan con cada una de ellas.

Figura 3



Inmuno-electroforesis de SA-11 sin capa externa (A) y SA-11 con capa externa (B). Tinción con bromuro de etidio.

Las experiencias con SA-11 no pudieron repetirse en su totalidad con NCDV ya que hasta ahora solo se han obtenido en cultivo de células partículas de NCDV sin capa externa; por lo tanto solo se estudió la relación antigénica entre virus NCDV sin capa externa y virus SA-11 en los dos estados mencionados.

Como muestra el cuadro 2, los títulos de ambos antisueros hacia las partículas sin capa externa de SA-11 y NCDV fueron iguales, indicando que los antígenos presentes en esta parte de los virus son muy parecidos o idénticos. Tratando de distinguir entre estas dos posibilidades, se depletó el suero anti SA-11 de los anticuerpos contra NCDV, adsorbiendo con un exceso de este último y posteriormente se probó por CIEF su capacidad para reaccionar con SA-11. Si el exceso de virus heterólogo no es capaz de adsorber todos los anticuerpos, entonces se detecta una banda indicativa de que los virus no son idénticos. La Figura 4 muestra que no fué posible distinguir una reacción con el suero preadsorbido, indicando que existe hasta el nivel de sensibilidad de esta técnica, una relación antigénica de identidad en las proteínas expuestas por las partículas sin capa externa (resistentes a EDTA).

Cuadro 2

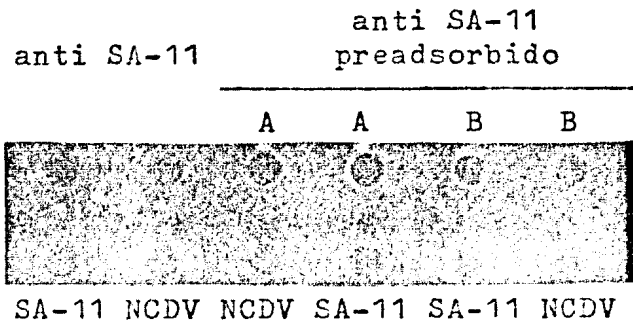
Reacción cruzada por CIEF entre virus SA-11 con y sin capa externa y virus NCDV sin capa externa

suero	virus		
	SA-11 sin capa externa	NCDV sin capa externa	SA-11 con capa externa
anti SA-11	512	512	512
anti NCDV	256	256	8

Los números son los valores recíprocos del título de los antisueros.

Sin embargo, se observa una diferencia notable al emplear virus con capa externa; el título del suero anti NCDV es mucho menor contra SA-11 con capa externa que el título del suero homólogo (Cuadro 2), indicando a diferencia de lo que ocurre en la parte interna de los virus, que hay una gran diferencia antigénica en la capa externa.

Figura 4



Reacción por CIEF de suero anti SA-11 preadsorbido  
con NCDV (A) o con SA-11 (B) contra virus SA-11 o NCDV

COMPARACION DE DISTINTAS CEPAS DEL ROTAVIRUS DE HUMANO CON ROTAVIRUS  
DE ANIMALES

Neutralización

Los ensayos de neutralización estuvieron limitados a determinar el efecto de los antisueros contra virus de humanos sobre SA-11 y NCDV, ya que aún no es posible medir la infectividad de los rotavirus de humano en cultivo de células en forma reproducible. Se utilizaron los sueros hiperinmunes producidos contra dos rotavirus de humano con capa externa y distintos en el patrón electroforético de sus ácidos nucleicos (RVH tipo 2L y RVH tipo 2S) y 5 sueros de niños convalecientes de gastroenteritis por rotavirus.

El Cuadro 3 muestra los títulos neutralizantes y los cocientes de estos títulos con respecto a los que se obtuvieron por CIEF contra el mismo virus sin capa externa, estos cocientes permiten ponderar por las diferencias en la calidad de los sueros. Aparentemente hay actividad neutralizante significativa de ambos suero contra NCDV. Considerando el modelo de neutralización através del bloqueo de los receptores que permiten la adsorción virus-célula, un grado de neutralización muy bajo como el que se indica contra el virus SA-11 (Cuadro 3) se considera nulo porque puede ser motivado por un mecanismo distinto (por ejemplo la unión de los anticuerpos a un sitio adyacente al "antígeno de neutralización" y bloqueo por impedimento estérico). Dos de los sueros de niños convalecientes fueron capaces de neutralizar a SA-11 reduciendo su infectividad en más de un 90% a una dilución de 1:64. Estos sueros mostraron un título de 1:8 contra rotavirus sin capa externa, por lo que el grado de neutralización sobre SA-11 se considera significativo.

Estos resultados sugieren que algunas cepas de rotavirus de humano

cruzan con SA-11 o NCDV en el antígeno de neutralización.

Cuadro 3

Neutralización de SA-11 y NCDV por suero hiperinmune contra dos tipos de rotavirus de humano

tipo de RVH	suero hiperinmune	virus			
		SA-11		NCDV	
2S	anti RVH-1383	4	(1/8)	32	(1/1)
2L	anti RVH-3222	8	(1/16)	256	(1/1)

Los números enteros son los valores recíprocos del título neutralizante y las fracciones (f) son el cociente de el recíproco del título neutralizante entre el recíproco del título por CIEF contra el mismo virus sin capa externa:

$$f = \frac{\text{recíproco del título neutralizante}}{\text{recíproco del título por CIEF}}$$

#### Contrainmunolectroforesis (CIEF)

La relación antigénica en las proteínas de la capa interna entre rotavirus de humano y de animales se estudió por CIEF utilizando virus desprovistos de su capa externa y distintos sueros hiperinmunes. El Cuadro 4 muestra que no hay diferencia significativa en los títulos de los diversos antisueros contra virus homólogos o heterólogos, e indica que los antígenos internos de los rotavirus tanto de humano como de animales, son muy parecidos entre si.

La comparación antigénica en la capa externa también se hizo por CIEF, utilizando el virus SA-11 completo ya descrito y dos aislados de rotavirus de humano tipos 2L y 2S, ambos con capa externa de acuerdo a sus densidades boyantes en CsCl y por su apariencia al microscopio electrónico. El Cuadro 5 muestra los resultados obtenidos.

Cuadro 4

Reacción cruzada por CIEF en los antígenos de la capa interna de un rotavirus de humano y dos rotavirus de animales

suero	virus (sin capa externa)		
	SA-11	NCDV	RVH-770
anti SA-11	512	512	256
anti NCDV	256	256	
anti RVH-1383	32	32	16
anti RVH-3222	128	256	

Los números son los valores recíprocos del título de los antisueros

Cuadro 5

Reacción cruzada por CIEF en los antígenos de la capa externa

origen del suero		virus (con capa externa)		
		SA-11	RVH-1383	RVH-3222
hiperinmune	anti SA-11	512	< 2	< 2
"	anti NCDV	8	< 2	< 2
"	anti RVH-1383	< 2	< 2	< 2
"	anti RVH-3222	< 2		< 2
"	anti RVH-770	< 2		
inf. natural	anti RVH-121359	16		
"	anti RVH-152017	4		

Los números son los valores recíprocos del título de los antisueros

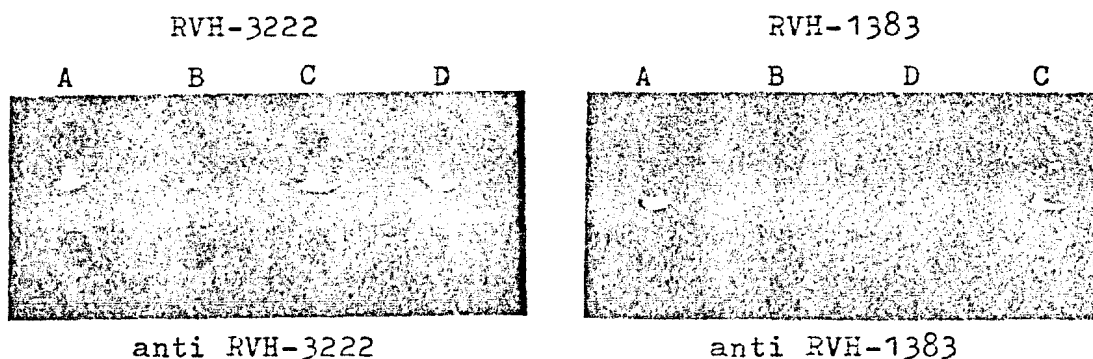
A diferencia de lo observado con los antígenos internos, el suero homólogo reacciona a alto título con SA-11 con capa externa, mientras que los sueros heterólogos reaccionan con un título mucho menor.

Los sueros hiperinmunes anti-rotavirus de humano no reaccionaron contra los propios rotavirus de humano con capa externa, sin embargo la situación en estos casos parece complicarse por otros factores, ya que



aunque se observó una banda con estos sueros contra los virus homólogos con capa externa (los mismos que se utilizaron como antígeno), la intensidad de esta no correspondía a la cantidad de virus utilizado y a diferencia de lo observado con SA-11, migró igual que la banda obtenida contra los mismos virus sin capa externa. La banda que producen estos virus contra el virus homólogo con capa externa parece deberse en realidad a la presencia de partículas sin capa externa en la preparación, ya que al tratar el virus completo con EDTA que elimina la capa externa, se aumenta la intensidad de la banda (Figura 5).

Figura 5



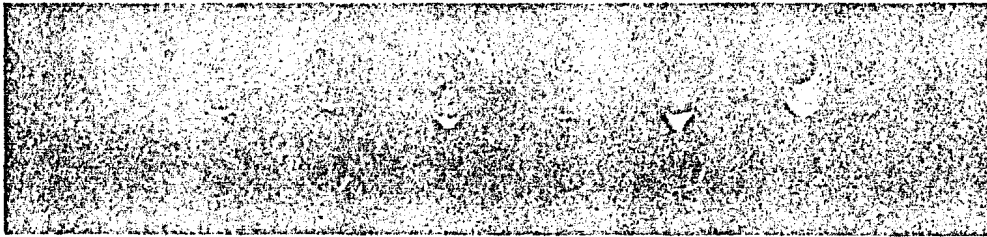
Contrainmunolectroforeis de RVH-1383 y RVH-3222 sin capa externa (A), con capa externa (B), una mezcla de ambos (C) y sin capa externa incubado con EDTA (D) contra los sueros homólogos respectivos. Tinción con bromuro de etidio.

La posibilidad de que la ausencia de reacción se debiera a la presencia de anticuerpos cubriendo al virus con capa externa, descrita por otros autores (44), se exploró por CIEF. Sin embargo, la anti IgG humana (Miles, producida en cabra) utilizada, además de reaccionar con los virus de humano reaccionó con SA-11 liviano y pesado (Figura 6) obtenido en cultivo de células y por lo tanto sin anticuerpos. Es probable que este suero contuviera anticuerpos contra rotavirus debido a una in-

fección natural previa.

Figura 6

RVH-3222	RVH-1383	SA-11
A    B	A    B	A    B



Contrainmunolectroforesis de rotavirus sin capa externa (A) y con capa externa (B) contra anti IgG humana producida en cabra.

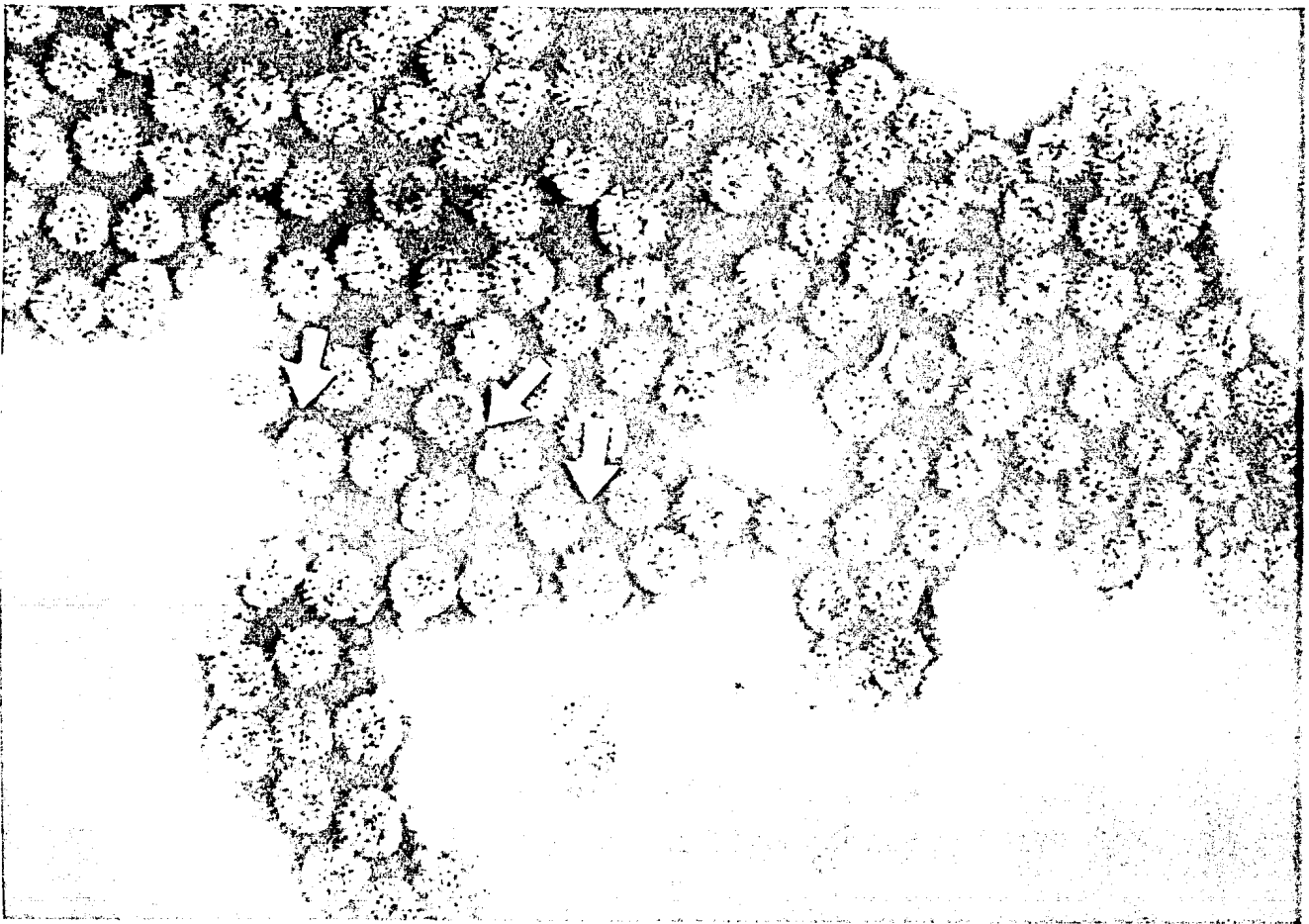
Como también es posible observar los anticuerpos cubriendo a los rotavirus por microscopía electrónica (44), se revisaron las preparaciones de virus en cuestión. Se observaron proyecciones o "puentes" entre los virus, que sugieren la presencia de anticuerpos (Figura 7).

La presencia de anticuerpos cubriendo las partículas virales completas podría ser responsable de que se produjeran muy pocos anticuerpos contra la capa externa en los sueros hiperinmunes, o de que los virus completos no reaccionen con los anticuerpos por tener cubiertos los sitios de interacción. Cualquiera de los dos casos hace que no se observe la reacción por CIEF de estas partículas con los sueros homólogos o heterólogos.

En cambio, dos sueros de niños convalecientes de gastroenteritis causada por rotavirus, seleccionados porque tenían un alto título contra rotavirus sin capa externa, si reaccionaron con SA-11 con capa externa, indicando de este modo que SA-11 y algún rotavirus de humano cruzan en los antígenos de la capa externa.

Resumiendo, la reacción que los diversos sueros presentan contra SA-11 parece indicar que este virus está relacionado antigénicamente en la capa externa con el rotavirus de humano y NCDV, aunque el título de la reacción es muy inferior al que se da en la capa interna.

Figura 7



Electro-micrografia de RVH-3222 con capa externa. Las flechas señalan proyecciones o "puentes" que pueden ser anticuerpos.

## D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos indican que existe un alto grado de reacción cruzada entre los antígenos de la capa interna y una escasa similaridad antigénica en la capa externa de los rotavirus.

La alta reacción cruzada encontrada entre los antígenos internos de los distintos rotavirus usados, esta de acuerdo con las observaciones obtenidas por IME (26). Utilizando la misma técnica con sueros de niños o animales convalecientes se ha encontrado reacción cruzada entre los antígenos de la capa externa de rotavirus de distintas especies, sin embargo en algunos casos esta se detecta en un solo sentido (es decir, de un par de virus de distinto origen y sus antisueros respectivos, solo uno de los antisueros reacciona con el virus heterólogo), y en un caso con rotavirus de ratón (26) no se detectó reacción cruzada. Con sueros hiperinmunes no se ha demostrado reacción cruzada entre los antígenos de la capa externa en ningún caso (29), sugiriendo que hay una diferencia cualitativa entre los sueros hiperinmunes y de convalecientes. Esta incapacidad para detectar reacción cruzada con sueros hiperinmunes puede deberse a que se usan rotavirus aislados de heces que han perdido su capa externa, como encontramos en nuestros aislados del rotavirus de humano.

La diferencia que se encuentra al usar los dos tipos de sueros, también podría deberse a una diferencia cualitativa en las respuestas inmunes de animales infectados o inmunizados por vía parenteral. Por los resultados de Yolken et al. (28) que es capaz de distinguir por ELISA entre rotavirus que infectan a distintos animales através de sueros de convalecientes, pero no através de sueros hiperinmunes, parece ser que en estos últimos se producen preferencialmente anticuerpos contra determinantes comunes de los distintos rotavirus.

La capacidad neutralizante que mostraron algunos sueros anti-rotavirus de humanos convalecientes sobre SA-11 o NCDV, sugiere que hay reacción cruzada en el "antígeno de neutralización". Esta es una observación importante que indica la posible existencia de protección cruzada con rotavirus de distintas especies y permite considerar el uso de virus heterólogos en la estrategia para el desarrollo de una vacuna. La explicación de las diferencias observadas entre sueros hiperinmunes y de convalecientes en su capacidad neutralizante sobre SA-11 y NCDV (este trabajo) y en la capacidad para inhibir la hemaglutinación con virus NCDV (33), es importante para definir inequívocamente la relación antigénica entre rotavirus de distintas especies.

La separación de rotavirus con y sin capa externa que se logra por IEF y CIEF, acoplada a una tinción con bromuro de etidio que permite distinguir a precipitados de virus de aquellos de naturaleza proteica, resulta conveniente para distinguir la reacción de antígenos internos y externos sin necesidad de hacer una separación previa de estos dos tipos. Esta técnica parece adecuada para la serotipificación de rotavirus en base a la especificidad que se observa en los antígenos externos. Con esta metodología se observó que algunos antisueros solo reaccionan con SA-11 sin capa externa, lo que indica que en las partículas virales completas los antígenos internos no están disponibles para reaccionar con anticuerpos. Esta propiedad ha sido observada para otros rotavirus (32) através de IME.

Los dos aislados de rotavirus de humano que se utilizaron, con distinto patrón electroforético de los ácidos nucleicos, no pudieron ser distinguidos por las propiedades antigénicas que se estudiaron. Sin embargo con estos virus no se pudo estudiar la reacción contra antígenos

de la capa externa, porque no se observó en la CIEF precipitación del virus con capa externa al probarlo contra el antisuero inducido por estos mismos virus. Esto podría deberse a que los dos aislados de rotavirus livianos de humano, obtenidos de heces, no provocaron una respuesta inmune detectable contra los antígenos de la capa externa, o los virus no reaccionaron "in vitro" con los anticuerpos producidos. La ausencia de reacción "in vitro" podría deberse a la presencia de anticuerpos en la capa externa de estos rotavirus, sugerida por la observación al microscopio electrónico.

La causa de la obtención de NCDV cultivado "in vitro" sin capa externa podría ser que se utilizó un huésped distinto al que han empleado otros autores.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. y Ruck, B. J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281-1283.
- 2.- Flewett, T. H., Bryden, A. S. y Davies, H. 1974. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2: 1497.
- 3.- Middleton, P. J., Szymansky, M. T., Abbott, G. D., Bortolussi, R. y Hamilton, J. P. 1974. Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *Lancet* 1: 1241-1244.
- 4.- Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Wyatt, R. G., Rodríguez, W. J., Ross, S., Cline, W. L., Parrot, R. H. y Chanock, R. M. 1974. Reovirus - like agent in stools: Association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* 185: 1049-1053.
- 5.- Conklin, R. H., DuFont, F. L., Goldschmidt, M. C. y Rodríguez, J. T. 1975. Occurrence of "viral particles" in diarrhea: Houston, Texas and Guatemala. *N. Engl. J. Med.* 292: 644-645.
- 6.- Lombardi, G. H., Roseto, A. M., Stambouljan, D. y Oro, J. G. B. 1974. Virus of infantile gastroenteritis in Argentina (letter). *Lancet* 2: 1311.
- 7.- Konno, T. Suzuki, H. e Ishida, N. 1974. Reovirus-like agent in Japanese infants with gastroenteritis. (letter). *Lancet* 1: 918-919.
- 8.- Kassel, H. 1974. Viruses in acute summer gastroenteritis in black infants (letter). *Lancet* 1: 1039-1094.
- 9.- Esparza, J., Viera de Torres, B., Piñero, A., Carmona, F. O. y Mazzali de Ilja, R. 1977. Rotaviruses in Venezuelan children with gastroenteritis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 148-151.

- 10.- Espejo, R. T., Calderón, E. y González, N. 1977. Distinct reovirus-like agents associated with acute gastroenteritis. *J. of Clin. Microbiology* 6: 502-506.
- 11.- Woode, G. N., Bridger, J. C., Hall, G. A. y Dennis, M. J. 1974. The isolation of a reovirus-like agent associated with diarrhoea in colostrum deprived calves in Great Britain. *Res. Vet. Sci.* 16: 102-105.
- 12.- Much, D. H. y Zajac, I. 1972. Purification and characterization of epizootic diarrhoea of infant mice virus. *Infect. Immun.* 6: 1019-1024.
- 13.- Woode, G. N., Bridger, J., Hall, G. A., Jones, J. M. y Jackson, G. 1976. The isolation of reovirus-like agents (rotaviruses) from acute gastroenteritis in piglets. *J. Med. Microbiol.* 9: 203-209.
- 14.- Flewett, T. H., Bryden, A. S. y Davies, H. 1975. Virus diarrhoea in foals and other animals. *Vet. Rec.* 96: 477.
- 15.- Snodgrass, D. R., Smith, W., Gray, E. W. y Herring, J. A. 1976. A rotavirus in lambs with diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* 20: 113- 114.
- 16.- Bryden, A. S., Thouless, M. E. y Flewett, T. H. 1976. A rabbit rotavirus. *Vet. Rec.* 99: 323.
- 17.- Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davies, H., Woode, G. N., Bridger, J. C. y Derrick, J. M. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* ii, 61-63.
- 18.- Esparza, J y Gil, F. A study on the ultrastructure of human rotavirus. *Virology* 91: 141-150.
- 19.- Bridger, J. C. y Woode, G. N. 1976. Characterization of two particle types of calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 31: 245-250.



- 20.- Rodger, S. M., Schnagl, R. D. y Holmes, I. H. 1977. Further biochemical characterization, including the detection of surface glycoproteins, of human, calf and simian rotaviruses. *J. of Virology* 24: 91-98.
- 21.- Rodger, S. M. y Holmes, I. H. 1979. Comparison of the genomes of simian (SA-11), calf and human rotaviruses by gel electrophoresis and the detection of genomic variation amongst calf isolates. Enviado para su publicación en *J. of Virol.*
- 22.- Schnagl, R. D. y Holmes, I. H. 1976. Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (rotavirus). *J. Virol.* 19: 267-270.
- 23.- Verly, E. y Cohen, J. 1977. Demonstration of size variation of RNA segments between different isolates of calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 35: 583-586.
- 24.- Mebus, C. A., Kono, M. Underdahl, N. E. y Twiehaus, M. J. 1971. Cell culture propagation of Neonatal Calf Diarrhoea (scours) Virus. *Can. Vet. J.* 12: 69-72.
- 25.- Malherbe, H., Harwin, R. y Ulrich, M. 1963. The cytophatic effects of vervet monkey viruses. *S. Afr. Med. J.* 37: 407.
- 26.- Woode, G. N., Bridger, J. C., Jones, J. M., Flewett, T. H., Bryden, A. S., Davies, H. A. y White, G. B. B. 1976. Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Inf. Imm.* 14: 804-810.
- 27.- Zissis, G. y Lambert, J. P. 1978. Different serotypes of human rotaviruses (letter). *Lancet* ii, 38-39.

- 28.- Yolken, R. H., Barbour, B., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Kapikian, A. Z. y Chanock, R. M. 1978. Enzyme linked immunosorbent assay for identification of rotaviruses from different animal species. Science 201: 259-262.
- 29.- Schoub, B. D., Lecastas, G. y Prozesky, O. W. 1976. Antigenic relationship between human and simian rotaviruses. J. Med. Microbiol. 10: 1-7.
- 30.- Thouless, M. E., Bryden, A. S., Flewett, T. H., Woode, G. N., Bridger, J. C., Snodgrass, D. R. y Herring, J. A. 1977. Serological relationships between rotaviruses from different species as studied by complement fixation and neutralization. Arch. Virol. 53: 287-294.
- 31.- Fauvel, M., Spence, L., Babiuk, L. A., Petro, R. y Bloch, S. 1978. Hemagglutination and hemagglutination-inhibition studies with a strain of Nebraska Calf Diarrhea Virus (bovine rotavirus). Intervirology 9: 95-105.
- 32.- Bridger, J. C. 1978. Location of type-specific antigens in calf rotaviruses. J. Clin. Microbiol. 8: 625-628.
- 33.- Spence, L., Fauvel, M., Petro, R. y Babiuk, L. A. 1978. Comparison of rotavirus strains by hemagglutination inhibition. Can. J. of Microbiology 24: 353-356.
- 34.- Flewett, T. H., Thouless, M. E., Pilfold, J. N., Bryden, A. S. y Candejas, J. A. N. 1978. More serotypes of human rotavirus (letter). Lancet ii, 632.
- 35.- Rodríguez, W. J., Wha Kim, H., Brandt, C. D., Yolken, R. H., Arribio, J. O., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. y Parrot, R. H. 1978.

- Sequential enteric illnesses associated with different rotavirus serotypes (letter). *Lancet* ii, 37.
- 36.- Hudson, L. y Hay, F. C. 1976. *Practical Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Inglaterra. p 110.
- 37.- Hierholtzer, J. C. y Bingham, P. G. 1978. Vero microcultures for adenovirus neutralization tests. *J. of Clin Microbiol.* 7 : 499-506.
- 38.- Keller, R. 1966. *J. Immunol.* 100: 1071.
- 39.- Mandel, B. 1962. *Cold Spring Harbor Symp. on Quant Biol.* 27: 123.
- 40.- Dales, S. y Kajiola, R. 1964. *Virology* 24 : 278.
- 41.- Kjellen, L. y Pereira, H. G. 1968. *J. Gen. Virol.* 2: 177.
- 42.- Dourmashkin, R. R. y Tyrrell, D. A. J. 1974. *J. Gen. Virol.* 24: 129.
- 43.- LePeck, J. B. y Paoletti, C. 1966. A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Ann. Biochem.* 17, 100-107.
- 44.- Watanabe, H. y Holmes, I. H. 1977. Filter paper solid-phase radioimmuncassay for human rotavirus surface immunoglobulins. *J. Clin. Microbiol.* 6: 319-324.