

03088

2
2eje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**DIVERSIDAD DE EPITOPES DE NEUTRALIZACIÓN DE LA
PROTEÍNA VP4 DE ROTAVIRUS DE HUMANO**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

Presenta: M. en C. Luis Padilla Noriega

Cuernavaca, Morelos

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**Resumen de la tesis para obtener el grado de Doctor en
Biotecnología**

**"Diversidad de epítopes de neutralización de la proteína VP4 de
rotavirus de humano"**

**Facultad o Escuela: Unidad Académica de los Ciclos Profesional y
de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades**

Alumno: M. en C. Luis Padilla Noriega

No. de cuenta: 7119686-4

No. de expediente: 26287

Asesor de tesis: Dr. Carlos F. Arias Ortiz

**Trabajo llevado a cabo en el Departamento de Genética y
Fisiología Celular del Instituto de Biotecnología, UNAM**

RESUMEN

Diversidad de epítopes de neutralización de la proteína VP4 de rotavirus de humano

Los rotavirus de humano (RVHs) presentan dos proteínas en su capa proteica externa, VP7 y VP4, las cuales son capaces de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes, por lo que su especificidad serotípica es dual. Así se han descrito cuatro serotipos principales en VP7 (G1 a G4) y dos serotipos y un subtipo en VP4 (P1A, P1B, y P2). La proteína VP4 requiere ser cortada por tripsina en los polipéptidos VP5* y VP8* para activar la infectividad viral. El presente trabajo versa sobre el estudio de la estructura y diversidad antigénica de VP4 de RVHs. Se estudió la estructura antigénica de esta proteína usando un panel de anticuerpos monoclonales neutralizantes (AMcN) anti-VP4 derivados de los RVHs Wa (serotipo P1A) y ST3 (serotipo P2) y variantes virales que escapan a la neutralización por AMcNs. En estas variantes se secuenció el gene que codifica a VP4, con lo cual se identificaron, en la cepa Wa, dos sitios de neutralización homotípica y heterotípica en los aminoácidos 458 y 392, respectivamente, mientras que en la cepa ST3 se identificaron tres sitios de neutralización homotípica o asociada con reactividad cruzada limitada en los aminoácidos 72, 217, y 385. Se elaboró también un mapa operacional de epítopes de neutralización en VP4 de RVHs, através del análisis de los patrones de neutralización cruzada de AMcNs sobre diversas variantes virales. Se encontró que VP4 de Wa tiene al menos un dominio de neutralización complejo en VP5*, el cual consiste de varios epítopes relacionados operacionalmente. Por su parte, VP4 de ST3 tiene al menos dos dominios de neutralización, uno se localiza en VP5* y está relacionado

operacionalmente al dominio de neutralización complejo en VP5* de los RVHs Wa y KU, y el otro es un dominio de neutralización independiente en VP8*, el cuál no había sido descrito previamente en RVHs. Para estudiar la diversidad de epítopes de neutralización en VP4 de RVHs, se examinó la reactividad de 71 especímenes virales presentes en heces de infantes con gastroenteritis causada por rotavirus através de un ensayo inmunoenzimático con AMcN específicos de dos serotipos de VP4 (P1A y P2) y de los cuatro principales serotipos de VP7 (G1 a G4). Debido a que los AMcN anti-VP4 no han sido ampliamente validados como reactivos específicos de serotipo, los resultados de este método se consideraron preeliminares y se marcaron con un asterisco. De los 71 especímenes analizados, 35 (49.3%) fueron serotipo P1A*, ninguno fué serotipo P2*, y 36 (50.7%) no pudieron ser asignados a alguno de estos dos serotipos. Con respecto a la serotipificación de VP7, 16 (22.5%) presentaron serotipo G1, 23 (32.4%) serotipo G2, 17 (23.9%) serotipo G3, 2 (2.8%) serotipo G4, y 13 (18.3%) no pudieron ser serotipificados. Siete de los 23 especímenes de serotipo G2 presentaron sorprendentemente el serotipo P1A*, en contraste con la observación de otros autores de que el serotipo G2 de VP7 solo se asocia con el serotipo P1B. Por otro lado, la ausencia de especímenes del serotipo P2* entre infantes sintomáticos concuerda con la hipótesis de que este serotipo infecta principal o únicamente a neonatos asintomáticos.

Vo. Bo. del tutor principal:

Carlos F. Arias O.

Dr. Carlos F. Arias Ortiz

Alumno:

Luis Padilla Noriega

M. en C. Luis Padilla Noriega

**Resumen en inglés de la tesis para obtener el grado de Doctor en
Biotecnología**

**"Diversidad de epítopes de neutralización de la proteína VP4 de
rotavirus de humano"**

**Facultad o Escuela: Unidad Académica de los Ciclos Profesional y
de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades**

Alumno: M. en C. Luis Padilla Noriega

No. de cuenta: 7119686-4

No. de expediente: 26287

Asesor de tesis: Dr. Carlos F. Arias Ortiz

**Trabajo llevado a cabo en el Departamento de Genética y
Fisiología Celular del Instituto de Biotecnología, UNAM**

ABSTRACT

Diversity of neutralization epitopes in the VP4 protein of human rotaviruses

The two outer capsid proteins of human rotaviruses (HRVs), VP7 and VP4, are able to elicit the production of neutralizing antibodies, hence the serotypic specificity of HRVs is dual. The VP7 from HRVs has been classified into four major serotypes, G1 to G4, while the VP4 has been classified into two serotypes and one subtype, P1A, P1B, and P2. The antigenic structure of the VP4 protein of HRV strains Wa and ST3 was studied by using a panel of Wa- and ST3-derived VP4-specific neutralizing monoclonal antibodies (NMABs) and NMAB-resistant variants. The VP4-coding genes from three Wa and three ST3 variants were sequenced. For Wa VP4, one homotypic and one heterotypic neutralization site, at amino acids 458 and 392, respectively, were identified. For ST3 VP4, three neutralization sites were found at amino acids 72, 217, and 385 that are either homotypic or associated with limited cross-reactivity. Cross-neutralization assays using several pairs of NMABs and resistant variants showed that Wa VP4 has at least one large neutralization domain on its larger trypsin cleavage product, VP5*, consisting of several operationally related epitopes. VP4 of ST3 has at least two neutralization domains, one located on VP5* that is operationally related to the large neutralization domains on VP5* from HRVs Wa and KU, as well as an independent neutralization domain on VP8*, the smaller trypsin cleavage product of VP4. To learn about the serotypic diversity of HRV VP4 we examined 71 stool specimens from infants with rotavirus gastroenteritis by an enzyme immunoassay, using NMABs specific to two VP4 serotypes (P1A and P2)

and all four major HRV VP7 serotypes (G1 to G4). The VP4-serotype assignments were considered as preliminary, and were accordingly labelled with an asterisk, since the corresponding NMABs have not been widely validated as serotyping tools. Of the 71 specimens analyzed, 35 (49.3%) were serotype P1A*, none was serotype P2*, and 36 (50.7%) could not be assigned to either serotype. By VP7 serotyping, 16 (22.5%) were serotype G1, 23 (32.4%) serotype G2, 17 (23.9%) serotype G3, 2 (2.8%) serotype G4, and 13 (18.3%) could not be serotyped. The observed lack of serotype P2 strains among symptomatic infants is in agreement with the hypothesis that this serotype primarily or solely infects asymptomatic neonates. On the other hand, 7 of 23 serotype G2 specimens were unexpectedly found to be serotype P1A*, even though this serotype had been associated so far only with serotype P1B, suggesting the existence of VP4-VP7 combinations not previously described.

Vo. Bo. del tutor principal:

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

Alumno:

Luis Padilla Noriega
M. en C. Luis Padilla Noriega

El presente trabajo se realizó principalmente en el laboratorio del Dr. Carlos F. Arias Ortiz, del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Parte del trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Harry Greenberg en el Veterans Affairs Medical Center, en Palo Alto, California.

Este trabajo fué asesorado por el siguiente Comité Tutorial:

Dr. Carlos F. Arias Ortiz, Tutor Principal

Dr. Paul M. Lizardi López, Cotutor

Dra. Yolanda López Vidal, Cotutora



Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Insurgentes Sur y Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, México, D.F., Código Postal: 04510

UNAM-CCH

PROYECTO ACADÉMICO DE ESPECIALIZACIÓN, MAESTRIA Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

IBT

OF. ALMC/120/94

Mtro. Pablo Ruiz Nápoles
Director de la UACPyP del CCH.
P r e s e n t e .

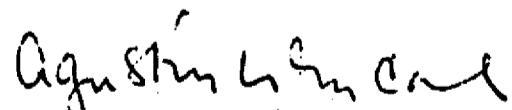
Por este conducto me permito informar a usted que en la reunión de Comisión Académica, que se llevó a cabo el 28 de octubre de 1994, se acordó poner a su consideración el siguiente Jurado para el examen de Doctorado en Biotecnología del M. en C. LUIS PADILLA NORIEGA con número de cuenta 7119686-4 y de expediente 26287, con la tesis titulada "Diversidad de epítopes de neutralización de la proteína VP4 de rotavirus de humano", dirigida por el Dr. Carlos F. Arias Ortiz.

PRESIDENTE:	Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero
VOCAL:	Dr. Alejandro García Carrancá
VOCAL:	Dra. Yolanda López Vidal
VOCAL:	Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay
SECRETARIO:	Dr. Carlos Federico Arias Ortiz
SUPLENTE:	Dr. Alejandro Alacón Cano
SUPLENTE:	Dr. José Luis Fuente García

Sin otro particular aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor.. 11 de noviembre de 1994.


Dr. Agustín López-Munquía Canales
Coordinador del Proyecto

Mtro. Pablo Ruiz Nápoles

c.c.p. Dr. Francisco G. Bolívar Zapata, Director del IBT.
c.c.p. Biólogo Francisco Javier Incera Ugalde, Secretario de
Asuntos Escolares de la UACPyP del CCH.

La contribución al conocimiento científico es cada vez más un proceso colectivo, donde la contribución particular de un individuo es sólo un componente. Sirva esta reflexión como reconocimiento de la naturaleza fragmentaria y no acabada del presente trabajo, y como un agradecimiento a las muchas personas que através de su esfuerzo han contribuído a dar las condiciones para que este trabajo fuese concebido y realizado.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIACIONES	5
INTRODUCCION	7
OBJETIVOS	14
ARTICULO	15
MATERIAL Y METODOS ADICIONALES	22
Virus	22
Muestras de campo de rotavirus	22
Muestras de heces de neonatos asintomáticos	22
Anticuerpos monoclonales	22
ELISA con AMcNs específicos de los serotipos P1A* y P2* de VP4 y G1 a G4 de VP7	22
Purificación de virus	23
Transcripción dirigida por la polimerasa viral	24
Transcripción reversa	24
Producción de sondas marcadas con ³² p	24
Preparación y cuantificación del RNA genómico	25
Ensayo de hibridización	26
RESULTADOS ADICIONALES	27
Serotipificación de VP4 y VP7 por ELISA con AMcN	27
Relación entre serotipos de VP4 y VP7	27
Diagnóstico de la presencia de rotavirus en heces de neonatos asintomáticos	28
Tipificación del gene 4 por hibridización Northern en punto	29
DISCUSION ADICIONAL	30

Alcance y limitaciones del estudio	30
Prevalencia de los serotipos P1A* y P2* en los infantes sintomáticos estudiados	31
Consideraciones sobre la necesidad de determinar la prevalencia de distintos serotipos de VP4 en neonatos asintomáticos	31
Consideraciones sobre los factores genéticos de los rotavirus que determinan la virulencia	32
Relación entre los serotipos de VP4 y VP7, y entre estos serotipos con el tipo genómico de VP4	33
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	35

RESUMEN

Los rotavirus de humano (RVHs) presentan dos proteínas en su capa proteica externa, VP7 y VP4, las cuales son capaces de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes, por lo que su especificidad serotípica es dual. Así se han descrito cuatro serotipos principales en VP7 (G1 a G4) y dos serotipos y un subtipo en VP4 (P1A, P1B, y P2). La proteína VP4 requiere ser cortada por tripsina en los polipéptidos VP5* y VP8* para activar la infectividad viral.

El presente trabajo versa sobre el estudio de la estructura y diversidad antigénica de VP4 de RVHs. Se estudió la estructura antigénica de esta proteína usando un panel de anticuerpos monoclonales neutralizantes (AMcN) anti-VP4 derivados de los RVHs Wa (serotipo P1A) y ST3 (serotipo P2) y variantes virales que escapan a la neutralización por AMcNs. En estas variantes se secuenció el gene que codifica a VP4, con lo cual se identificaron, en la cepa Wa, dos sitios de neutralización homotípica y heterotípica en los aminoácidos 458 y 392, respectivamente, mientras que en la cepa ST3 se identificaron tres sitios de neutralización homotípica o asociada con reactividad cruzada limitada en los aminoácidos 72, 217, y 385. Se elaboró también un mapa operacional de epítopes de neutralización en VP4 de RVHs, a través del análisis de los patrones de neutralización cruzada de AMcNs sobre diversas variantes virales. Se encontró que VP4 de Wa tiene al menos un dominio de neutralización complejo en VP5*, el cual consiste de varios epítopes relacionados operacionalmente. Por su parte, VP4 de ST3 tiene al menos dos dominios de neutralización, uno se localiza en VP5* y está relacionado operacionalmente al dominio de neutralización complejo en VP5* de los RVHs Wa y KU, y el otro es un dominio de neutralización independiente en VP8*, el cual no había sido descrito previamente en RVHs.

Para estudiar la diversidad de epítopes de neutralización en VP4 de RVHs, se examinó la reactividad de 71 especímenes virales presentes en heces de infantes con gastroenteritis causada por rotavirus a través de un ensayo inmunoenzimático con AMcN específicos de dos serotipos de VP4 (P1A y P2) y de los cuatro principales serotipos de VP7 (G1 a G4). Debido a que los AMcN anti-VP4 no han sido ampliamente validados como reactivos específicos de serotipo, los

resultados de este método se consideraron preliminares y se marcaron con un asterisco. De los 71 especímenes analizados, 35 (49.3%) fueron serotipo P1A*, ninguno fue serotipo P2*, y 36 (50.7%) no pudieron ser asignados a alguno de estos dos serotipos. Con respecto a la serotipificación de VP7, 16 (22.5%) presentaron serotipo G1, 23 (32.4%) serotipo G2, 17 (23.9%) serotipo G3, 2 (2.8%) serotipo G4, y 13 (18.3%) no pudieron ser serotipificados. La ausencia de especímenes del serotipo P2* entre infantes sintomáticos concuerda con la hipótesis de que este serotipo infecta principal o únicamente a neonatos asintomáticos. Por otro lado, siete de los 23 especímenes de serotipo G2 presentaron sorpresivamente el serotipo P1A*, en contraste con la observación de otros autores de que el serotipo G2 de VP7 solo se asocia con el serotipo P1B, sugiriendo la existencia de combinaciones entre serotipos de VP4 y VP7 que no habían sido previamente descritas.

ABSTRACT

The two outer capsid proteins of human rotaviruses (HRVs), VP7 and VP4, are able to elicit the production of neutralizing antibodies, hence the serotypic specificity of HRVs is dual. The VP7 from HRVs has been classified into four major serotypes, G1 to G4, while the VP4 has been classified into two serotypes and one subtype, P1A, P1B, and P2.

The antigenic structure of the VP4 protein of HRV strains Wa and ST3 was studied by using a panel of Wa- and ST3-derived VP4-specific neutralizing monoclonal antibodies (NMABs) and NMAb-resistant variants. The VP4-coding genes from three Wa and three ST3 variants were sequenced. For Wa VP4, one homotypic and one heterotypic neutralization site, at amino acids 458 and 392, respectively, were identified. For ST3 VP4, three neutralization sites were found at amino acids 72, 217, and 385 that are either homotypic or associated with limited cross-reactivity. Cross-neutralization assays using several pairs of NMABs and resistant variants showed that Wa VP4 has at least one large neutralization domain on its larger trypsin cleavage product, VP5*, consisting of several operationally related epitopes. VP4 of ST3 has at least two neutralization domains, one located on VP5* that is operationally related to the large neutralization domains on VP5* from HRVs Wa and KU, as well as an independent neutralization domain on VP8*, the smaller trypsin cleavage product of VP4.

To learn about the serotypic diversity of HRV VP4 we examined 71 stool specimens from infants with rotavirus gastroenteritis by an enzyme immunoassay, using NMABs specific to two VP4 serotypes (P1A and P2) and all four major HRV VP7 serotypes (G1 to G4). The VP4-serotype assignments were considered as preliminary, and were accordingly labelled with an asterisk, since the corresponding NMABs have not been widely validated as serotyping tools. Of the 71 specimens analyzed, 35 (49.3%) were serotype P1A*, none was serotype P2*, and 36 (50.7%) could not be assigned to either serotype. By VP7 serotyping, 16 (22.5%) were serotype G1, 23 (32.4%) serotype G2, 17 (23.9%) serotype G3, 2 (2.8%) serotype G4, and 13 (18.3%) could not be serotyped. The observed lack of serotype P2 strains among

symptomatic infants is in agreement with the hypothesis that this serotype primarily or solely infects asymptomatic neonates. On the other hand, 7 of 23 serotype G2 specimens were unexpectedly found to be serotype P1A*, even though this serotype had been associated so far only with serotype P1B, suggesting the existence of VP4-VP7 combinations not previously described.

LISTA DE ABREVIACIONES

AFS	Amortiguador fosfatos-salina
AFS-Az	Amortiguador fosfatos-salina + azida de sodio
AMcN	Anticuerpo monoclonal neutralizante
ATP	Trifosfato de adenosina
CTP	Trifosfato de citosina
cDNA	DNA complementario
dATP	Trifosfato de 2'-desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de 2'-desoxicitidina
DD50	Dosis capaz de causar diarrea en el 50% de los animales inoculados
dGTP	Trifosfato de 2'-desoxiguanosina
DNA	Acido desoxiribonucleico
DNAcd	Acido desoxiribonucleico de cadena doble
dTTP	Trifosfato de timidina
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	Acido etilenglicol-bis(eter β -aminoetilico)N,N,N',N'-tetraacético
GTP	Trifosfato de guanosina
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (en inglés: enzyme-linked immunosorbent assay)
KDa	Kilodalton
NS1 a NS5	Proteínas no estructurales de rotavirus
PCR	Reacción de polimerasa en cadena (del inglés: polymerase chain reaction)
RNA	Acido ribonucleico
RNAcd	Acido ribonucleico de cadena doble
RRV	Cepa de rotavirus de simio (en inglés Rhesus rotavirus)
RVH	Rotavirus de humano
RVA	Rotavirus de animales

SA11	Cepa de rotavirus de simio (en inglés Simian Agent 11)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SSC	Solución salina-citrato de sodio
TES	Amortiguador Tris-EDTA-salina
UTP	Trifosfato de uridina
VP1 a VP8	Proteínas estructurales de rotavirus

INTRODUCCION

Los rotavirus del grupo A son uno de los principales agentes etiológicos de diarrea infantil. Se ha calculado que son responsables de 873,000 de las 5 a 10 millones de muertes de infantes que por enfermedades diarreicas ocurren anualmente en el mundo [1]. Los episodios graves de diarrea por rotavirus generalmente ocurren en menores de dos años, entre los que causa entre 12 y 71% (mediana 31%) de las hospitalizaciones por diarrea [2].

Los rotavirus presentan un genoma de 11 segmentos de RNA de cadena doble, separables por electroforesis en geles de acrilamida y nombrados de acuerdo a su movilidad electroforética. La fragmentación del genoma permite que en infecciones mixtas de células cultivadas *in vitro* se produzcan rearrreglantes genéticas con alta frecuencia [3]. Los distintos segmentos de RNA codifican para seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6, y VP7) y cinco proteínas no estructurales (NSP1-NSP5) [4]. El genoma y las proteínas VP1 a VP3 forman el núcleo viral, que se encuentra rodeado por dos capas concéntricas, la capa interna formada por la proteína VP6, y la capa externa formada por las proteínas VP4 y VP7 [5]. Esta última estructura está formada por una capa lisa y delgada de VP7, de la cual emergen espículas de VP4, probablemente diméricas, con la apariencia de un tallo delgado en la región proximal y una protuberancia bilobular en el extremo distal [6]. Los viriones maduros presentan la apariencia de una esfera con un diámetro de 765 Å, de la que sobresalen las espículas cuya longitud es de entre 100 y 120 Å [6].

VP7, producto del gene 7, 8, ó 9, dependiendo de la cepa, es una glicoproteína de 37 KDa, y es el componente más abundante de la capa externa [5]. La proteína nativa es capaz de inducir la formación de anticuerpos monoclonales neutralizantes (AMcN), habiéndose demostrado que induce principalmente AMcN homotípicos, *i.e.* específicos de serotipo (ver definición adelante), aunque también induce AMcN heterotípicos, *i.e.*, anticuerpos que presentan reactividad cruzada al ser ensayados con cepas pertenecientes a serotipos diversos [7].

VP4, producto del gene 4, es una proteína no glicosilada, de aproximadamente 86.5 KDa [8]. Cuando se encuentra en su conformación nativa en el virión, VP4 es susceptible de ser cortada por tripsina, con lo que se producen los polipéptidos VP5* (60 KDa) y VP8* (28 KDa). Este rompimiento resulta en un fuerte aumento de la infectividad viral, probablemente através de incrementar la penetración productiva, pero no la adsorción a la célula huésped [9-12]. VP4 tiene varias funciones adicionales: es la hemaglutinina en algunas cepas virales [13], contiene epítopes de neutralización [14], es un determinante de virulencia en ratones [15], es responsable de la restricción al crecimiento que ciertas cepas de rotavirus presentan en células en cultivo [16] y de la formación de placas [13].

El gene 4 ha sido secuenciado en varias cepas de rotavirus de animales (RVAs) y de rotavirus de humano (RVHs). En ambos casos se observa un marco abierto de lectura que codifica ya sea por una proteína de 776 aminoácidos en los RVAs ó de 775 aminoácidos en los RVHs, los cuáles carecen del aminoácido que ocupa la posición 136 en RVAs [3]. En VP4 de los RVHs existen cuatro cisteínas conservadas en las posiciones 216, 318, 380, y 774, y una cisteína adicional en la mayoría de los RVAs, en la posición 203. Dos de estas cisteínas ubicadas en las posiciones 318 y 380 en la región de VP5* forman un puente disulfuro tanto en RVHs como en RVAs, y estos últimos presentan un puente disulfuro adicional en las posiciones 203 y 216 en la región de VP8* [17].

A través del análisis de la secuencia de aminoácidos en el extremo amino de la proteína VP5* de la cepa de rotavirus de simio SA11 4fM, López *et al.* [18] dedujeron que existen al menos dos sitios de corte por tripsina, en las argininas 241 y 247. Así, el tratamiento con tripsina resulta en dos polipéptidos VP5* cuyo extremo 5' inicia predominantemente en el aminoácido 248, y en menor proporción en el aminoácido 242. No es claro si la escasa infectividad que se detecta previamente al tratamiento con tripsina se debe a la presencia de una pequeña cantidad de virus cuya VP4 haya sido cortada por una proteasa celular endógena, como tampoco es claro cuál es el mecanismo por el que se activa la infectividad viral después del rompimiento proteolítico de VP4.

Los rotavirus han sido clasificados de acuerdo a sus características morfológicas y bioquímicas como un género dentro de la familia *Reoviridae*, el cuál incluye también a los géneros *Reovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, y *Fijivirus* [19] Dentro del género *Rotavirus* se han identificado 6 grupos (A-F), los cuáles no presentan reactividad cruzada por técnicas serológicas como inmunofluorecencia o ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) [5]. Dentro de cada grupo, los rotavirus se clasifican en serotipos determinados por ensayos de neutralización con sueros hiperinmunes preparados en animales seronegativos. Se consideran como pertenecientes a distinto serotipo a aquellas cepas cuyos sueros hiperinmunes presenten una diferencia de 20 o más veces en el título de anticuerpos neutralizantes. De esta manera se han identificado 14 serotipos entre los rotavirus del grupo A (G1-G14), de los cuáles 9 infectan a humanos (G1-G6, G8, G9, y G11). Los ensayos de neutralización detectan la reactividad de anticuerpos contra las dos proteínas de la capa proteica externa del virión (VP7 y VP4), aunque en la mayoría de los casos la reactividad predominante es con VP7, como se demuestra por la clasificación idéntica que se obtiene por ELISA con AMc contra VP7 [20]. Se piensa que en animales hiperinmunizados la respuesta predominante de anticuerpos neutralizantes es contra VP7, a diferencia de lo que ocurre en respuesta a infecciones naturales, donde predominan los anticuerpos neutralizantes contra VP4 [20]. En las partes subsecuentes de este trabajo se hace referencia exclusivamente a los rotavirus del grupo A, a los que se nombra simplemente como rotavirus.

La dificultad para clasificar a la proteína VP4 a través de ensayos tradicionales de neutralización con sueros hiperinmunes obligaron el desarrollo de métodos alternativos. Uno de estos métodos, que en este estudio se considerará como estándar de referencia para fines de clasificación, es el ensayo de neutralización con sueros hiperinmunes contra proteínas VP4 recombinantes, producidas en el sistema de expresión de baculovirus. Idealmente los métodos de clasificación deben ser capaces de determinar la diversidad serotípica que sea relevante en la inducción de protección, y en nuestro concepto, el método que proponemos como estándar de referencia es el que más se acerca a este ideal. A través de este ensayo la proteína VP4 de RVHs

Tabla 1

Clasificación de la proteína VP4 de rotavirus de humano basada en características genómicas y antigénicas

Cepa de referencia	Serotipo de VP4	Tipo genómico	Serotipo de VP7 asociado	Infección sintomática ^a
Wa	P1A	P-gen8	G1, G3, G4, G9	+
DS1	P1B	P-gen4	G2, G12	+
ST3	P2	P-gen6	G1, G2, G3, G4	- (neonatos)
K8	P3	P-gen9	G1	+
69M	P4	P-gen10	G8	+
HCR3	ND	P-gen3	G3	- (infantes)

^a +, infección sintomática; -, infección asintomática. Entre paréntesis se indica si la infección se detecta en neonatos (menores de 28 días) o en infantes (mayores de 1 mes y menores de 5 años).

ha sido clasificada en cuatro serotipos y un subtipo en base a una diferencia de 8 veces en el título de anticuerpos neutralizantes (serotipos P1A, P1B, y P2 a P4) [21-23]. Interesantemente, la infección con uno de estos serotipos, P2, ha sido asociada con infecciones asintomáticas en neonatos [21] (Tabla 1). Asimismo, se ha observado cierta correlación entre los serotipos P y G. Así, el serotipo P1A ha sido asociado con los serotipos G1, G3, G4, y G9, el serotipo P1B con los serotipos G2 y G12, mientras que el serotipo P2 se ha encontrado en cepas de cualquiera de los serotipos G1 a G4 (Tabla 1). Otro enfoque para la clasificación de VP4 se basa en sus características genómicas en lugar de las antigénicas. Así se han considerado como pertenecientes al mismo tipo genómico de VP4 a aquellas cepas cuyos genes 4 resulten en un porcentaje de identidad en secuencia de aminoácidos de 89% o más. Los tipos genómicos de VP4 inicialmente se nombraron con la misma nomenclatura que previamente se usó para denominar a

los serotipos, *i.e.* la letra P seguida de un número, sin embargo, para evitar confusiones recientemente se propuso nombrar a los tipos genómicos con el prefijo P-gen seguido de un número [24]. A la fecha, se han identificado 15 tipos genómicos entre los rotavirus del grupo A, de los cuáles 6 (P-gen4, P-gen6, P-gen8, P-gen9, P-gen11, y P-gen12) infectan a humanos [5, 25]. Se ha encontrado además, que los tipos genómicos P-gen8, P-gen4, P-gen6, y P-gen9 corresponden a los serotipos P1A, P1B, P2, y P3, respectivamente (Tabla 1) [25].

A través de la comparación de la secuencia de aminoácidos de VP4 entre distintas cepas de RVHs, se han identificado noventa y un aminoácidos invariantes entre las cepas de neonatos con infecciones asintomáticas, mientras que otros aminoácidos son invariantes en las mismas posiciones entre las cepas de RVHs aisladas de infantes sintomáticos. Gorziglia *et al.* sugirieron que algunos de estos aminoácidos característicos de las cepas asintomáticas son responsables de la diferencia en virulencia entre distintos RVHs, debido a que no se observaron características similares entre los 10 genes restantes de cepas virulentas o asintomáticas [26]. Esta asociación no tiene amplio soporte experimental, porque un número mucho menor de aminoácidos son invariantes (solo 50) si se comparan las secuencias de RVHs asintomáticos con las de cepas virulentas de origen animal, y no existe prueba de que las cepas de neonatos asintomáticos sean realmente avirulentas [5]. Otros estudios sugieren que factores del huésped y no de la cepa viral son responsables de las infecciones asintomáticas en neonatos, ya que cepas que son virulentas para infantes mayores, pueden causar infecciones asintomáticas en neonatos [27, 28].

La secuencia del gene 4 de mutantes que escapan a la neutralización por AMcN ha permitido identificar los aminoácidos involucrados en neutralización homotípica y heterotípica tanto en RVHs como en RVAs. La mayoría de los AMcN anti-VP4 derivados de RVAs son homotípicos o moderadamente heterotípicos, y seleccionan cambios en la región hipervariable de VP8*, entre los aminoácidos 87-194, mientras que AMcN heterotípicos contra RVAs seleccionan cambios de aminoácidos en una región limitada de VP5*, entre los aminoácidos 388-393 [8, 29]. Los AMcNs contra RVHs, por otro lado, son principalmente heterotípicos e inducen cambios de aminoácidos en tres regiones de VP5*, la región I ubicada en el aminoácido 305, la

región II entre los aminoácidos 385-392, y la región III entre los aminoácidos 428-433 [30, 31].

Las regiones VP8* y VP5* parecen tener distintas funciones relacionadas con las interacciones tempranas virus-célula. VP8* es quizá el ligando a través del cuál ocurre la primera interacción virus-célula huésped, ya que se ha demostrado que AMcN contra VP8* del rotavirus de simio RRV previenen la infección viral al bloquear la adsorción a la célula huésped [32]. El receptor de los RVAs en la célula huésped (cualquiera que éste sea) contiene ácido siálico, ya que, al ser desialidada, la célula pierde temporalmente su susceptibilidad a ser infectada [33]. Se sabe también que los RVAs son capaces de aglutinar eritrocitos, y esta interacción es también dependiente de ácido siálico [33]. Sin embargo, es paradójico que mutantes de rotavirus capaces de replicarse en células huésped desialidadas sean aún capaces de aglutinar eritrocitos normales, indicando que el sitio de unión a ácido siálico se encuentra intacto. Este hallazgo sugiere que los rotavirus tienen un segundo receptor independiente del que une ácido siálico, a través del cuál se inicia la infección de la célula huésped [34]. La mutación que confiere resistencia a la desialidación reside en el gene que codifica a VP4, aunque no es claro qué región de VP4 es responsable de este fenotipo. Se ha propuesto que después de la interacción inicial de los rotavirus con la célula huésped a través de VP8*, ocurre una segunda interacción con otra región de VP4, quizá VP5*, siendo esta última interacción necesaria para la penetración del virus a la célula [34].

VP5* está involucrado quizá en la penetración a la célula huésped, ya que existe una región conservada entre los rotavirus de los grupo A, ubicada entre los aminoácidos 384 y 401, que presenta homología con un dominio hidrofóbico fusogénico presente en la glicoproteína E1 de los virus Sindbis y Semliki [8]. Esta región podría actuar sola o en cooperación con otras regiones hidrofóbicas en VP4, como ocurre con la glicoproteína E1, para mediar la penetración del virión a la célula huésped. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido probada.

La topografía de epítopes de neutralización en VP4 de RVHs y de animales ha sido estudiada examinando los patrones de reactividad de AMcNs contra variantes virales que escapan

a la neutralización y por ensayos inmunoenzimáticos de competencia. De acuerdo al primer método (que para los fines de este trabajo se nombrará análisis de variantes virales) los epítopes reconocidos por dos AMcN se consideran operacionalmente relacionados si una variante viral seleccionada con un AMcN adquiere resistencia a un segundo AMcN. Un grupo particular de epítopes operacionalmente relacionados se definen como un dominio [35]. En la cepa de rotavirus de simio RRV, se han identificado tres dominios de neutralización por análisis de variantes virales, dos dominios homotípicos en VP8* y un dominio heterotípico en VP5*, aunque los dos dominios en VP8* son indistinguibles por ensayos inmunoenzimáticos de competencia. En la cepa de RVH KU, se identificaron dos dominios de neutralización por análisis de variantes virales, ambos ubicados en VP5*. A la fecha no se han identificado dominios de neutralización en VP8* de RVH.

Recientemente, B. Coulson describió la producción de AMcN anti-VP4 específicos de los serotipos P1A, P1B y P2 y su utilización para determinar la diversidad de epítopes en VP4 de cepas de campo de RVHs [36]. Nosotros hemos producido un panel de 13 AMcN anti-VP4 derivados de las cepas de RVH Wa (serotipo P1A) y ST3 (serotipo P2), y hemos caracterizado su reactividad por ELISA y ensayo de neutralización contra un grupo de rotavirus cultivados *in vitro* pertenecientes a diversos serotipos. Algunos AMcNs reaccionaron específicamente por ELISA con cepas de los serotipos P1A ó P2, mientras que otros AMcNs reaccionaron heterotípicamente con cepas pertenecientes a diversos serotipos de VP4 [37]. Tanto los AMcN desarrollados por nosotros como los desarrollados por B. Coulson servirán para conocer más detalladamente la estructura y diversidad antigénica en VP4 de RVHs.

En el presente estudio se procedió a caracterizar a nivel molecular los sitios en la proteína VP4 reconocidos por algunos de los AMcN producidos previamente contra las cepas de RVH Wa y ST3, y se inició el análisis de la utilidad de un subgrupo de estos AMcN, específicos de los serotipos P1A y P2, como herramientas para estudiar la diversidad antigénica de esta proteína en cepas de campo.

OBJETIVOS

1) Estudiar la estructura antigénica de la proteína VP4 de RVHs a través de identificar los aminoácidos importantes para neutralización por AMcNs, y elaborar un mapa operacional de los epítopes reconocidos por los AMcNs.

2) Determinar la variabilidad de epítopes de neutralización de la proteína VP4 en cepas de campo de RVH.

Los resultados del objetivo No. 1 se describen en el artículo que se anexa, y los resultados del objetivo No. 2 en la sección de Resultados adicionales.

Identification of Two Independent Neutralization Domains on the VP4 Trypsin Cleavage Products VP5* and VP8* of Human Rotavirus ST3

LUIS PADILLA-NORIEGA,*¹ STEPHEN J. DUNN,[†] SUSANA LÓPEZ,*
HARRY B. GREENBERG,^{†‡} AND CARLOS F. ARIAS*

*Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico; [†]Division of Gastroenterology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and [‡]Palo Alto Veterans Affairs Medical Center, Palo Alto, California 94304

Received July 1, 1994; accepted September 30, 1994

The antigenic structure of the VP4 protein of human rotavirus (HRV) strains Wa and ST3 was studied by using a panel of Wa- and ST3-derived VP4-specific neutralizing monoclonal antibodies (NMABs) and NMAB-resistant variants. The VP4-coding genes from three Wa and three ST3 variants were sequenced. For Wa VP4, one homotypic and one heterotypic neutralization site, at amino acids 458 and 392, respectively, were identified. For ST3 VP4, three neutralization sites were found at amino acids 72, 217, and 385 that are either homotypic or associated with limited cross-reactivity. Cross-neutralization assays using several pairs of NMABs and resistant variants showed that Wa VP4 has at least one large neutralization domain on its larger trypsin cleavage product, VP5*, consisting of several operationally related epitopes. VP4 of ST3 has at least two neutralization domains, one located on VP5* that is operationally related to the large neutralization domains on VP5* from HRVs Wa and KU, as well as an independent neutralization domain on VP8*, the smaller trypsin cleavage product of VP4. © 1995 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Group A rotavirus particles consist of 11 segments of double-stranded RNA enclosed in a trilayered protein capsid (Estes and Cohen, 1989). The outer capsid shell consists of an 86.5-kDa protein, VP4, encoded by genome segment 4, and a 37-kDa glycoprotein, VP7, encoded by genome segments 7, 8, or 9 depending on the strain (Estes and Cohen, 1989). Both outer capsid proteins elicit the production of neutralizing antibodies (Offit and Blavat, 1986); hence, the serotypic specificity of rotavirus is dual, and is termed G and P for VP7 and VP4, respectively. Oral infection with live rotavirus stimulates protective immunity which can be mediated via VP4 or VP7 (Hoshino *et al.*, 1988; Offit *et al.*, 1986a). In addition, neutralizing monoclonal antibodies (NMABs) to either VP4 or VP7 have been shown to passively protect mice against rotavirus challenge (Offit *et al.*, 1986b).

VP4 forms spikes, probably dimeric, that protrude from the smooth viral surface (Prasad *et al.*, 1988; Yeager *et al.*, 1990), is the viral hemagglutinin (Kalica *et al.*, 1983), and is cleaved by trypsin into VP8* (amino acids 1-247)

and VP5* (amino acids 248-776) (Espejo *et al.*, 1981; Estes *et al.*, 1981; López *et al.*, 1985). Proteolytic cleavage strongly enhances rotavirus infectivity, probably by enhancing virus penetration to the cell (Estes *et al.*, 1981; Fukuhara *et al.*, 1988; Kalijot *et al.*, 1988).

The VP4 from human rotaviruses (HRVs) has been classified into three serotypes and one subtype associated with symptomatic infections (P1A, P1B, P3, and P4), and one serotype associated with asymptomatic infections (P2), as determined by neutralization assays with monospecific antisera (Gorziglia *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1993; Sereno and Gorziglia, 1994).

By sequencing escape mutants selected with anti-VP4 NMABs, amino acids involved in homologous and heterologous neutralization have been identified (Taniguchi *et al.*, 1988; Mackow *et al.*, 1988). In this study, homologous refers to strains bearing the same P serotype, while in early studies it referred to G serotypes due to the lack of a P serotyping scheme. Most VP4-directed NMABs derived from animal rotaviruses are homotypic or exhibit limited heterotypic activity, and induce amino acid changes within a large hypervariable region in VP8* (amino acids 87-188), while heterotypic NMABs from animal rotaviruses induce amino acid changes in a limited area on VP5*, spanning amino acids 388-393 (Mackow *et al.*, 1988). NMABs derived from human rotaviruses are mostly heterotypic and induce amino acid changes in the region of VP5* spanned by amino acids 305-441 (Kobayashi *et al.*, 1990; Taniguchi *et al.*, 1988).

Sequence data from this article have been deposited with the EMBL/GenBank Data Libraries under Accession Nos. L33895 (strain ST3 gene 4) and L34161 (strain Wa gene 4).

¹To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, Mexico 62271. Fax: 52 (73) 172388. E-mail: luisp@pbr322.ceingeb.unam.mx.

The amino acids important for neutralization by homotypic anti-VP8* NMABs derived from human rotaviruses have not been identified (Kitaoka *et al.*, 1986; Padilla-Noriega *et al.*, 1993).

The topography of neutralization epitopes on VP4 of animal and human rotaviruses have been studied by examining the reactivity patterns of NMABs against neutralization escape viral variants, and by competitive NMAB binding. According to the former method, which in this study is referred to as viral variant analysis, the epitopes recognized by two NMABs are considered operationally overlapping if a viral variant selected with either NMAB acquires resistance to the second NMAB. A particular set of operationally overlapping epitopes is considered a domain (Yewdell and Gerhard, 1981). Using the animal rotavirus strain RRV, Shaw *et al.*, (1986) identified three separate neutralization domains by viral variant analysis, two homotypic domains on VP8* and one heterotypic domain on VP5*, the former two being indistinguishable by competitive binding analysis. Using the HRV strain KU, Taniguchi *et al.* (1987) identified on VP5* two neutralization domains by viral variant analysis. One of these domains is recognized solely by NMAB YO-2C2, which induced an amino acid change at position 305, and the second seems to be a larger domain recognized by 11 NMABs that induced amino acid changes at positions 385, 392, 428, or 433 (Kobayashi *et al.*, 1990). The antigenic topography of neutralization epitopes on VP8* of HRVs has not been studied.

We recently described anti-VP4 NMABs directed to the VP4 protein of HRV strains Wa (serotype P1A) and ST3 (serotype P2) that are homotypic, heterotypic, or exhibit limited cross-reactivity (Padilla-Noriega *et al.*, 1993). Preliminary analysis of these NMABs indicated that at least one is VP8*-specific. To further characterize the antigenic structure of the VP4 protein of HRVs, we selected Wa and ST3 rotavirus variants resistant to neutralization by these NMABs and identified the mutations that allow the viruses to escape neutralization. The escape variants were also studied by viral variant analysis in order to gain knowledge on the topography of neutralization epitopes on the VP4 protein on HRV strains.

MATERIALS AND METHODS

Viruses

The two HRV strains used in this work were from stocks in the laboratory of one of the authors (H.B.G.). Strain Wa (serotype G1, P1A) was originally obtained from R. G. Wyatt (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Strain ST3 (serotype G4, P1A) was originally obtained from R. L. Ward (James N. Gamble Institute of Medical Research, Cincinnati, OH), who had in turn obtained it from R. G. Wyatt. Prior to the selection of the viral variants, the two HRV strains were triply plaque

purified and named as clone 1 afterwards. Strain ST3 had been previously plaque purified thrice by R. L. Ward.

Monoclonal antibodies

The production and partial characterization of the nine anti-VP4 NMABs used in this study were described previously (Padilla-Noriega *et al.*, 1993). Five NMABs were derived from the HRV Wa (1A10, 1C6, 1E4, 2C11, and 2A3), and four NMABs from the HRV ST3 (HS6, HS7, HS11, and HS16).

Selection of neutralization escape variants

Five Wa variants (Wa-1A10, Wa-1C6, Wa-1E4, Wa-2C11, and Wa-2A3) were selected with five Wa-derived NMABs, and four ST3 variants (ST3-HS6, ST3-HS7, ST3-HS11, and ST3-HS16) were selected with four ST3-derived NMABs. Each variant was designated with the name of the parental strain followed by the NMAB used for its selection. The variants were selected and plaque purified as described elsewhere (Taniguchi *et al.*, 1987).

PCR amplification and sequencing of gene 4 of rotaviruses

Viral dsRNA was purified, reverse-transcribed, PCR-amplified, and sequenced as previously described (Dunn *et al.*, 1993). PCR amplification of ST3 gene 4 was done with the 5' and 3' primers GGCTATAAAATGGCTTCACTCAAT and GGTCACATCCACTATAGAGCTCTC, respectively. PCR amplification of Wa gene 4 was done with 5' and 3' primers GAATTCGGATCCGGCTATAAAATGGCT and GGTCACATCCTGGATGACATTCTG, respectively.

Focus reduction neutralization assay

Neutralization titers of NMABs were determined as described by Shaw *et al.* (1985).

Determination of the protein specificity of the NMABs

The specificities of the NMABs to the ST3 VP4 polypeptides VP8* and VP5* were determined by DNA amplification-restricted transcription translation (DARTT) (Mackow *et al.*, 1990), with some modifications. Briefly, full-length ST3 gene 4 cDNA was PCR-amplified as indicated above and phenol-chloroform-extracted. Ethanol-precipitated gene 4 cDNA was used as a template for subsequent PCRs of VP8* and VP5* in the presence of 5'-end oligonucleotides containing a T7 polymerase promoter sequence. The 5' and 3' primers used to amplify VP8* sequences encoding amino acids 1-246 were GAATAATACGACTCACTATAGGGGATGGCTTCACTCATTATAGA and ACGTTGATAAGTCACTGATCTAGA, respectively. VP5* encoding sequences (amino acids 247-775) were amplified using the 5' oligonucleotide GAATAATACGACTCACTATAGGGGATGGCTCAGGTTAGTGAAGATATC and the same 3' oligonucleotide used for

TABLE 1
AMINO ACID DIFFERENCES BETWEEN THE VP4s OF DIFFERENT CLONES OF HRV STRAINS Wa AND ST3

HRV strain	Amino acid difference (residue number) ^a			
Wa	Ile-Met (64)	Ser-Phe (331)	Leu-Ile (388)	Gly-Asp (525)
ST3	Thr-Val (49)	Trp-Leu (50)	Ser-Glu (51)	His-Ser (52)
	Gly-Trp (53)	Arg-Gln (70)	Ile-Val (130)	Asn-Ser (146)
	Thr-Ser (175)	Ser-Asn (250)	Pro-Ala (313)	Ser-Leu (331)
	Ile-Val (338)	Asp-Asn (353)	Met-Ile (388)	Gln-Lys (413)
	Leu-Pro (474)	Gly-Arg (565)	Val-Glu (589)	Asp-Ile (633)

^a The first amino acid of each pair corresponds to the VP4 sequences determined by us and the second to the published sequences of Wa VP4 (Kitamoto *et al.*, 1993) or ST3 VP4 (Gorziglia *et al.*, 1988).

full-length gene 4 amplification. PCR-amplified VP8* and VP5* sequences were transcribed by T7 RNA polymerase and translated in the presence of [³⁵S]methionine, as previously described (López *et al.*, 1994). The translated proteins were immunoprecipitated with NMABs from ascites essentially as described by Mackow *et al.* (1990), except that reactions were performed at 4°, and in the presence of two additional protease inhibitors, 0.3 μM aprotinin (Boehringer) and 1 μM leupeptin (Boehringer). Two ST3-derived MABs that had been previously shown to be reactive with Wa VP8* (MAB HS6) or VP5* (MAB HS2) by the DARTT technique (Padilla-Noriega *et al.*, 1993) were used as positive controls for radioimmuno-precipitations. Normal ascites produced from a mouse inoculated intraperitoneally with the nonsecreting myeloma cell line FOX was used as negative antibody control.

RESULTS

Amino acid sequence of VP4 from the parental strains Wa and ST3

The sequence of Wa gene 4 found in this study differs from that found by Kitamoto *et al.* (1993; Genbank Acces-

sion No. M96825) by five nucleotides that result in 4 amino acid changes (Table 1). In addition, our sequence of Wa gene 4 has two extra thymidines in the 3' noncoding region, after nucleotide 2345 of the published sequence. The amino acid sequence of ST3 gene 4 found here differs from that of Gorziglia *et al.* (1988) by 20 amino acids (Table 1). It is unclear why there are numerous amino acid differences between the two ST3 VP4s compared. Since our ST3 strain was extensively cloned (see Materials and Methods), one possible explanation for these differences is that we selected minor viral variants. A comparative analysis of the amino acid differences between the VP4 proteins of HRVs Wa and ST3 has been reported (Gorziglia *et al.*, 1988).

Identification of amino acid changes of Wa and ST3 variants selected with anti-VP4 neutralizing monoclonal antibodies

In order to localize the neutralization epitopes recognized by anti-VP4 NMABs and to construct an operational antigenic map of the VP4 protein of HRV strains Wa and

TABLE 2
NUCLEOTIDE AND PREDICTED AMINO ACID CHANGES OF Wa AND ST3 VARIANTS SELECTED WITH ANTI-VP4 NMABs, AND PROTEIN-BINDING AND VP4 SEROTYPE SPECIFICITIES OF THE SELECTING NMABs

Variant virus ^a	Codon (bp number)	Amino acid (residue number)	Protein-binding specificity ^b	VP4 serotype specificity of selecting NMAB
ST3-HS6	ACA → ATA (224)	Thr → Ile (72)	VP8*	P2-P1A ^c
ST3-HS11	GAA → AAA (658)	Glu → Lys (217)	VP8*	P2
ST3-HS18	AAT → GAT (1162)	Asn → Glu (385)	VP5*	P2
Wa-1E4	GCA → GTA (1184)	Ala → Val (392)	NP	P2-P1A
Wa-1A10	GGA → AGA (1378)	Gly → Arg (458)	VP5*	P1A
Wa-1C6	GGA → AGA (1378)	Gly → Arg (458)	VP5*	P1A
ST3-HS7	ND	ND	VP5*	P2-P1A
Wa-2C11	ND	ND	VP5*	P2-P1A
Wa-2A3	ND	ND	VP5*	P2-P1A

^a Variants were designated with the name of the parental strain followed by the NMAB used for its selection.

^b The protein specificity was determined by *in vitro* transcription of the VP5* or VP8* region of ST3 (this study) or Wa (Padilla-Noriega *et al.*, 1993) gene 4 cDNA followed by translation and radioimmuno-precipitation by MABs from ascitic fluid. NP, nonprecipitating.

^c NMAB HS6 exhibits limited cross-reactivity since it neutralizes serotype P2 strains and one of five serotype P1A strains tested (Padilla-Noriega *et al.*, 1993).

^d ND, not determined.

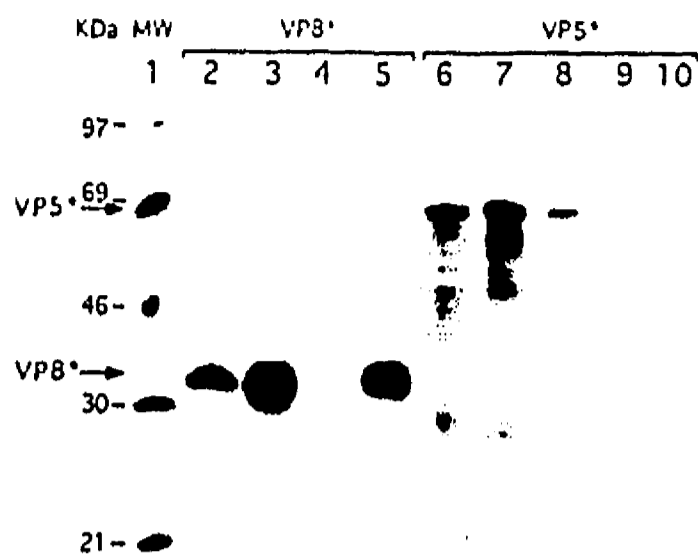


Fig. 1. Radl immunoprecipitation of *in vitro* translated VP8* or VP5* by NMABs. Selected regions (VP5* or VP8*) of ST3 gene 4 cDNA were amplified by PCR with simultaneous addition of T7 polymerase transcription signals and transcribed into RNA by T7 RNA polymerase. The mRNA produced was translated in a rabbit reticulocyte lysate system with [³⁵S]methionine. The translated VP8* (lane 2) or VP5* (lane 6) was immunoprecipitated with NMABs and analyzed by 10% PAGE. Lane 1 contains molecular weight markers. The NMABs tested against VP8* were HS6 (lane 3), HS16 (lane 4), and HS11 (lane 5). The NMABs tested against VP5* were HS2 (lane 7), HS16 (lane 8), and HS11 (lane 9). Lane 10 is a negative control of normal ascites tested against VP5*. HS2 is an ST3-derived MAb previously shown to be reactive with Wa VP5*.

ST3, five Wa variants were selected with Wa-derived NMABs, and four ST3 variants were selected with ST3-derived NMABs. The VP4 serotype specificity of the selecting NMABs had been previously determined (Table 2) (Padilla-Noriega *et al.*, 1993). Two NMABs are serotype P1A-specific (1A10 and 1C6) and two are serotype P2-specific (HS11 and HS16). Four are heterotypic since they neutralize both serotype P1A and P2 strains (1E4, HS7, 2C11, and 2A3). One NMAB exhibits limited cross-

reactivity (HS6) since it neutralizes serotype P2 strains and one of five serotype P1A HRV strains tested. Variants were designated with the name of the parental strain followed by the NMAB used for its selection.

The gene 4 sequence from three ST3 and three Wa variants was determined. Table 2 shows the nucleotide changes and the corresponding amino acid substitutions in the six variants. Both Wa variants selected with serotype P1A-specific NMABs 1A10 and 1C6 sustained the same amino acid change in VP5*, at position 458. The ST3 variants selected with serotype P2-specific NMABs sustained amino acid changes at positions 385 in VP5* (ST3-HS16) or 217 in VP8* (ST3-HS11). The ST3 variant selected with the moderately heterotypic NMAB HS6 sustained an amino acid change in VP8* at position 72 (ST3-HS6). The Wa variant selected with a heterotypic NMAB sustained an amino acid change at position 392 in VP5* (Wa-1E4). Two of the five amino acid substitutions found, at positions 385 and 392 (Table 2), had been previously identified in KU variants selected with a homotypic and several heterotypic NMABs, respectively (Kobayashi *et al.*, 1990; Taniguchi *et al.*, 1988).

Binding of NMABs to the VP4 trypsin cleavage products VP5* or VP8*

We had previously determined the specificity of our VP4 NMABs for binding to either of the trypsin cleavage products, VP4* or VP8*, of Wa VP4. Five NMABs were found to immunoprecipitate VP5* (1A10, 1C6, 2C11, 2A3, and HS7), one precipitated VP8* (HS6), and three did not precipitate either polypeptide (HS11, HS16, and 1E4) (Padilla-Noriega *et al.*, 1993). We extended those results by testing whether the ST3-derived NMABs that did not

TABLE 3

NEUTRALIZATION TITERS OF VP4-SPECIFIC NMABs AGAINST NEUTRALIZATION ESCAPE VARIANTS AND PARENTAL HUMAN ROTAVIRUS STRAINS Wa AND ST3

Neutralization escape variant or parental virus	Protein specificity of selecting NMAB (mutated amino acid) ^a	Neutralizing titer of monoclonal antibody (immunogen) ^b										
		1A10 (Wa)	1C6 (Wa)	1E4 (Wa)	2C11 (Wa)	2A3 (Wa)	YO-1S3 (YO)	YO-2C2 (YO)	HS7 (ST3)	HS16 (ST3)	HS6 (ST3)	HS11 (ST3)
Wa-derived variants												
Wa-1A10	VP5* (458)	<100	400	25,600	6400	6,400	800	≥409,600	100			
Wa-1C6	VP5* (458)	<100	400	6,400	6400	6,400	800	≥409,600	100			
Wa-1E4	NP (392)	6,400	100	100	<100	<100	200	≥409,600	<100			
Wa-2C11	VP5* (ND)	25,600	100	<100	<100	<100	<200	≥409,600	<100			
Wa-2A3	VP5* (ND)	25,600	1600	<100	<100	<100	<200	NT	<100			
Wa (parent virus)		25,600	6400	6,400	1600	6,400	3,200	≥409,600	25,600			
ST3-derived variants												
ST3-HS7	VP5* (ND)			25,600	1600	400	1,600	≥409,600	1,600	6,400	1,600	25,600
ST3-HS16	VP5* (385)			800	400	400	≥409,600	≥409,600	≥409,600	<100	1,600	6,400
ST3-HS6	VP8* (72)			25,600	6400	25,600	≥409,600	≥409,600	≥409,600	≥409,600	<100	100
ST3-HS11	VP8* (217)			6,400	6400	6,400	≥409,600	≥409,600	≥409,600	102,400	1,600	<100
ST3 (parent virus)				25,600	6400	6,400	≥409,600	≥409,600	≥409,600	≥409,600	1,600	25,600

^a NP, nonprecipitating, ND, not determined.

^b Titers are expressed as the reciprocal of the highest dilution that neutralized 60% of the infectious virus. Blank spaces indicate that the corresponding homotypic NMABs were not assayed against the heterotypic rotavirus strains. Boldface indicates that the neutralization titer of the NMAB to the variant was at least 16-fold lower than the titer to the parental virus. NT, not tested.

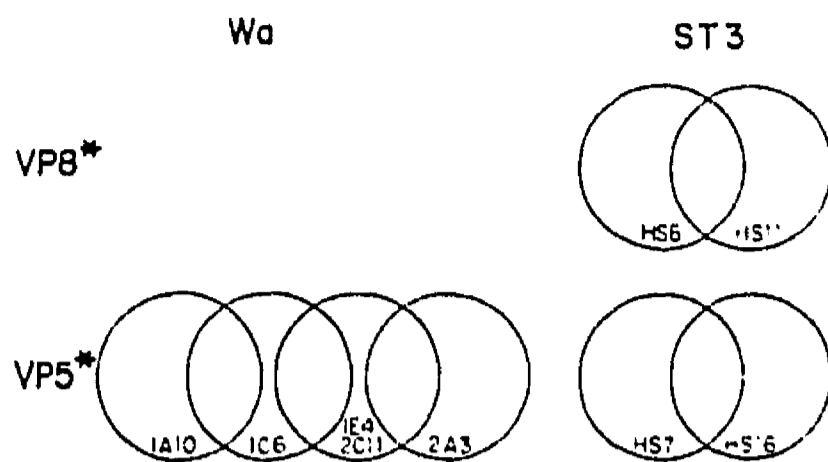


Fig. 2. Operational map of neutralization epitopes on VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of HRV strains Wa and ST3. The circles represent the epitopes recognized by NMABs.

react with either of the two cleavage products of Wa VP4 were able to bind to ST3-derived VP5* or VP8*. Of the two NMABs tested, HS11 precipitated VP8*, and HS16 precipitated VP5* (Fig. 1). In five of the variants analyzed, the location of the point mutation in gene 4 selected by a specific NMAB was shown to lie within the region encoding the trypsin cleavage product actually bound by the monoclonal (Table 2).

Operational map of neutralization epitopes on the VP4 protein of HRV strains Wa and ST3

An operational map of homotypic and cross-reactive neutralization epitopes on either of the two trypsin cleavage products of VP4 was prepared by performing cross-neutralization assays with five pairs of NMABs and NMAB-resistant variants derived from the HRV Wa and with four pairs of NMABs and resistant variants derived from the HRV ST3 (Table 3 and Fig. 2). In addition, several heterotypic NMABs that had not been used to select viral variants were assayed by neutralization against either or both the Wa and the ST3 variants (Table 3). These one-way neutralization assays were performed in order to determine whether neutralization epitopes on VP4 of the HRV strains Wa, ST3, and KU are operationally related. The NMABs used to determine the relationship of the VP4s of Wa and ST3 with the VP4 of the serotype P1A rotavirus KU were YO-2C2 and YO-IS3. These NMABs were derived from the serotype P1A strain YO, and recognize either of the two neutralization domains previously identified on KU VP4 by viral variant analysis (Kobayashi *et al.*, 1990).

Both reciprocal and nonreciprocal reactivity patterns were found in pairwise combinations. For example, reciprocal reactions were noted between NMABs 1A10 and 1C6 when tested against their variants. Both variants were resistant to either NMAB. Nonreciprocal reactions were noted between NMABs HS6 and HS11 when tested against their variants. ST3-HS6 was resistant to HS11, but ST3-HS11 was neutralized by HS6 (Table 3).

The operational maps of neutralization epitopes on the

Wa and ST3 VP4s were constructed by considering as overlapping epitopes those involved in either reciprocal or nonreciprocal reactivity, as suggested by Yewdell and Gerhard (1981) (Fig. 2). All five neutralization epitopes studied on Wa VP4 were found to be operationally overlapping, constituting a single large neutralization domain on VP5* (Fig. 2). Epitopes 1E4 and 2C11 were indistinguishable. On the other hand, the four epitopes studied on HRV ST3 were found to constitute two operationally nonoverlapping neutralization domains that are located on either VP8* (epitopes HS6 and HS11) or VP5* (epitopes HS7 and HS16) (Fig. 2).

Six cross-reactive NMABs were assayed by one-way neutralization tests. Two were tested against all Wa and ST3 variants (YO-1S3 and YO-2C2), one against Wa variants (HS7), and three against ST3 variants (1E4, 2C11, and 2A3) (Table 3). One or more Wa or ST3 variants selected with anti-VP5* NMABs were resistant to NMAB YO-IS3; hence, the neutralization domains described in this study on VP5* of either Wa or ST3 are operationally related to the large neutralization domain recognized by NMAB YO-IS3 on the VP4 protein of HRV KU (Kobayashi *et al.*, 1990). In addition, all Wa and ST3 variants were neutralized by NMAB YO-2C2 to the same titer as the parental strains, suggesting that the neutralization domains on Wa and ST3 VP4 are not operationally related to the neutralization domain recognized solely by NMAB YO-2C2 on KU VP4 (Kobayashi *et al.*, 1990). Neither of the two ST3 variants selected with anti-VP8* NMABs (ST3-HS6 and ST3-HS11) were resistant to any of the heterotypic or homotypic VP5*-specific NMABs tested, suggesting that the neutralization domain on VP8* of HRV ST3 is not operationally related to neutralization domains on VP5* of HRV strains Wa, KU, or ST3.

DISCUSSION

We have identified four neutralization sites on the VP4 protein of HRVs, at amino acids 72, 217, 385, and 458, that are either homotypic or associated with limited cross-reactivity. Homotypic neutralization sites had been previously identified at amino acids 385 and 392 of HRVs, although the original description of their reactivity referred to G rather than P serotypes (Kobayashi *et al.*, 1990; Taniguchi *et al.*, 1988). Amino acid 385 was identified on a KU variant selected with the serotype P1A-specific NMAB KU-12H (Kobayashi *et al.*, 1990), and amino acid 392 on a DS1 variant selected with the serotype P1B-specific NMAB S2-2F2 (Taniguchi *et al.*, 1988). In addition, amino acid 392 has been identified by us and others as important for neutralization by heterotypic NMABs in human and animal rotavirus strains (Kobayashi *et al.*, 1990; Taniguchi *et al.*, 1988; Mackow *et al.*, 1988). The findings in this study indicate that both homotypic and heterotypic epitopes can be identified on VP8* as well as VP5*. Which regions are best able to stimulate

heterotypic immunity after natural infection or vaccination remains to be determined.

The functional overlapping between the two epitopes that constitute the neutralization domain on ST3 VP8*, in spite of their distant location in the amino acid sequence (from position 72 to 217), suggests that either the amino acid change selected by one NMAb causes an allosteric effect which affects the binding of the second NMAb or the sites recognized by these monoclonals are conformationally close. Two lines of evidence favor the second hypothesis: (i) it has been implicated that some tertiary structure is necessary for binding of NMAbs, since monoclonals directed to RRV VP8* select mutations that are widely distributed (from amino acids 87 to 188), but they all require the same large polypeptide for binding (amino acids 55-222) (Mackow *et al.*, 1990), and (ii) each of these VP8* NMAbs competes with others for VP4 binding, suggesting that these monoclonals bind to adjacent domains of VP8* (Shaw *et al.*, 1987).

The neutralization domains on VP5* of HRVs Wa and ST3 described in this study, as well as a neutralization domain on VP5* of RRV (Mackow *et al.*, 1988), are operationally related to the large neutralization domain on HRV KU. This operational relationship is not surprising since some of the amino acids that define this domain (amino acids 385 and 392) are located within the putative fusion region on group A rotaviruses, which spans amino acids 384 to 401 of RRV VP4 (Mackow *et al.*, 1988). It is tempting to speculate that NMAbs directed to this domain would neutralize by interfering with the presumed function of the fusion region, i.e., the productive internalization of virions to the host cell.

The ratio of NMAbs directed toward VP8* and VP5* that have been isolated from human compared to animal rotaviruses is different. Among HRVs, five NMAbs have been described that map to VP8* and 25 to VP5* (Kitaoka *et al.*, 1986; Kobayashi *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1991; Padilla-Noriega *et al.*, 1993; Taniguchi *et al.*, 1988). Among animal rotaviruses 20 NMAbs have been described that map to VP8* and three to VP5* (Liprandi *et al.*, 1991; Mackow *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 1994). It is unclear why more NMAbs directed at animal rotaviruses map to VP8*, while the reverse is true for NMAbs directed at human rotavirus VP4s. This difference could be the result of differences in screening strategies or the reflection of a more fundamental biologic difference. In addition, the neutralization sites on VP8* of the HRV ST3 (at positions 72 and 217) are different and are located either upstream or downstream of the corresponding amino acids identified in animal rotavirus strains (at positions 87, 88, 89, 100, 114, 148, 150, and 188). These differences may be either the result of insufficient sample testing or from a significant biologic difference between VP8*s of human and animal rotaviruses. It is not currently known which parts of VP4 represent primary targets of protective

immunity after natural infection as opposed to hyperimmunization.

It has been suggested that VP8* from animal and human rotaviruses have different functions in the early steps of host cell infection (Mendez *et al.*, 1993). Among animal rotaviruses VP8* has been identified as the viral hemagglutinin (Fiore *et al.*, 1991) and the target of neutralizing antibodies that inhibit binding of virions to host cells (Ruggeri and Greenberg, 1991). In addition, binding of animal rotaviruses to erythrocytes and to host cells is dependent on the presence of sialic acid-containing receptors, since treatment of cells with sialidases interferes with such binding (Fukudome *et al.*, 1989). On the other hand, although HRVs VP8* is clearly a target of neutralizing antibodies, HRVs do not hemagglutinate, and infection of cells by HRVs is not dependent on the presence of sialic acids on the cell surface. The two anti-VP8* NMAbs described in this study should be useful tools in defining the role of HRV VP8* in the early steps of host cell infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by Grants 75191-527101 from the Howard Hughes Medical Institute and 3270-N and 3901-N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia of Mexico, Grant R01 A121632 from NIH, PHS Grant DK07056 awarded to S.J.D. by the NIDDKD, and a VA Merit Review Grant. H.B.G. is a Medical Investigator at the Palo Alto VA Medical Center. We are grateful to Koki Taniguchi for kindly providing NMAbs YO-IS3 and YO-2C2. We thank Mario Gorziglia for sending us the sequence of gene 4 from his clone of HRV strain ST3, and Tonja Cross, Paul Gaytán, and Eugenio López for synthesizing the oligonucleotides used in this study.

REFERENCES

- DUNN, S. J., WARD, R. L., MCNEAL, M. M., CROSS, T. L., and GREENBERG, H. B. (1993). Identification of a new neutralization epitope on VP7 of human serotype 2 rotavirus and evidence for electropherotype differences caused by single nucleotide substitutions. *Virology* 197, 397-404.
- ESPEJO, R. T., LÓPEZ, S., and ARIAS, C. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37, 156-160.
- ESTES, M. K., and COHEN, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53, 410-449.
- ESTES, M. K., GRAHAM, D. Y., and MASON, B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanisms. *J. Virol.* 39, 879-888.
- FIGLIORE, L., GREENBERG, H. B., and MACKOW, E. R. (1991). The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 181, 553-583.
- FUKUDOME, K., YOSHIE, O., and KONNO, T. (1989). Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell absorption. *Virology* 172, 196-205.
- FUKUHARA, N., YOSHIE, O., KITAOKA, S., and KONNO, T. (1988). Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* 62, 2209-2218.
- GORZIGLIA, M., GREEN, K., NISHIKAWA, K., TANIGUCHI, K., JONES, R., KAPIKIAN, A. Z., and CHANOCK, R. M. (1988). Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J. Virol.* 62, 2978-2984.
- GORZIGLIA, M., LARRALDE, G., KAPIKIAN, A. Z., and CHANOCK, R. M. (1990). Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7155-7159.

- HOSHINO, Y., SAIF, L. J., SERENO, M. M., CHANOCK, R. M., and KAPIKIAN, A. Z. (1988). Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid proteins confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J. Virol.* 62, 744-748.
- KALICA, A. R., FLORES, J., and GREENBERG, H. B. (1983). Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology* 125, 194-205.
- KALJOT, K. T., SHAW, R. D., RUBIN, D. H., and GREENBERG, H. B. (1988). Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62, 1136-1144.
- KITAMOTO, N., MATTION, N. M., and ESTES, M. K. (1993). Alterations in the sequence of the gene 4 from a human rotavirus after multiple passages in HepG2 liver cells. *Arch. Virol.* 130, 179-185.
- KITAOKA, S., FUKUHARA, N., TAZAWA, F., SUZUKI, H., SATO, T., KONNO, T., EBINA, T., and ISHIDA, N. (1986). Characterization of monoclonal antibodies against human rotavirus hemagglutinin. *J. Med. Virol.* 19, 313-323.
- KOBAYASHI, N., TANIGUCHI, K., and URASAWA, S. (1990). Identification of operationally overlapping and independent cross-reactive neutralization regions on human rotavirus VP4. *J. Gen. Virol.* 71, 2615-2623.
- KOBAYASHI, N., TANIGUCHI, K., URASAWA, T., and URASAWA, S. (1991). Preparation and characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed to VP4 of rotavirus strain K8 which has unique VP4 neutralization epitopes. *Arch. Virol.* 121, 153-162.
- LI, B., LARRALDE, G., and GORZIGLIA, M. (1993). Human rotavirus K8 strain represents a new VP4 serotype. *J. Virol.* 67, 617-620.
- LIPRANDI, F., RODRIGUEZ, I., PINA, C., LARRALDE, G., and GORZIGLIA, M. (1991). VP4 monotype specificities among porcine rotavirus strains of the same VP4 serotype. *J. Virol.* 65, 1658-1661.
- LÓPEZ, S., ARIAS, C. F., BELL, J. R., STRAUSS, J. H., and ESPEJO, R. T. (1985). Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144, 11-19.
- LÓPEZ, S., ESPINOSA, R., GREENBERG, H. B., and ARIAS, C. F. (1994). Mapping of the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology* 204, 153-162.
- MACKOW, E. R., SHAW, R. D., MATSUI, S. M., VO, P. T., DANG, M. N., and GREENBERG, H. B. (1988). The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: Location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 645-649.
- MACKOW, E. R., YAMANAKA, M. Y., DANG, M. N., and GREENBERG, H. B. (1990). DNA amplification-restricted transcription-translation: Rapid analysis of rhesus rotavirus neutralization sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 518-522.
- MENDEZ, E., ARIAS, C. F., and LÓPEZ, S. (1993). Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 67, 5253-5259.
- OFFIT, P. A., and BLAVAT, G. (1986). Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. *J. Virol.* 57, 376-378.
- OFFIT, P. A., CLARK, H. F., BLAVAT, G., and GREENBERG, H. B. (1986a). Reassortant rotaviruses containing structural proteins vp3 and vp7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J. Virol.* 60, 491-496.
- OFFIT, P. A., SHAW, R. D., and GREENBERG, H. B. (1986b). Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J. Virol.* 58, 700-703.
- PADILLA-NORIEGA, L., WERNER-ECKERT, R., MACKOW, E. R., GORZIGLIA, M., LARRALDE, G., TANIGUCHI, K., and GREENBERG, H. B. (1993). Serologic analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31, 822-828.
- PRASAD, B. V., WANG, G. J., CLERX, J. P., and CHIU, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199, 269-275.
- RUGGERI, F. M., and GREENBERG, H. B. (1991). Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J. Virol.* 65, 2211-2219.
- SERENO, M. M., and GORZIGLIA, M. I. (1994). The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type. *Virology* 199, 500-504.
- SHAW, R. D., FONG, K. J., LOSONSKY, G. A., LEVINE, M. M., MALDONADO, Y., YOLKEN, R., FLORES, J., KAPIKIAN, A. Z., VO, P. T., and GREENBERG, H. B. (1987). Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. *Gastroenterology* 93, 941-950.
- SHAW, R. D., STONER-MA, D. L., ESTES, M. K., and GREENBERG, H. B. (1985). Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J. Clin. Microbiol.* 22, 286-291.
- SHAW, R. D., VO, P. T., OFFIT, P. A., COULSON, B. S., and GREENBERG, H. B. (1986). Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus. *Virology* 155, 434-451.
- TANIGUCHI, K., MALOY, W. L., NISHIKAWA, K., GREEN, K. Y., HOSHINO, Y., URASAWA, S., KAPIKIAN, A. Z., CHANOCK, R. M., and GORZIGLIA, M. (1988). Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J. Virol.* 62, 2421-2426.
- TANIGUCHI, K., MORITA, Y., URASAWA, T., and URASAWA, S. (1987). Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: Analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Virol.* 61, 1726-1730.
- YEAGER, M., DRYDEN, K. A., OLSON, N. H., GREENBERG, H. B., and BAKER, T. S. (1990). Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryo-electron microscopy and image reconstruction. *J. Cell Biol.* 110, 2133-2144.
- YEWDELL, J. W., and GERHARD, W. (1981). Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 185-206.
- ZHOU, Y., BURNS, J. W., MORITA, Y., TANAKA, T., and ESTES, M. K. (1994). Localization of rotavirus VP4 neutralization epitopes involved in antibody-induced conformational changes of virus structure. *Virology* 68, 3955-3964.

MATERIAL Y METODOS ADICIONALES

Virus. Se usaron las siguientes cepas de rotavirus adaptados a crecer en cultivo de células: Wa (serotipo G1, P1A), S2 (G2, P1B), RRV (G3, P5), ST3 (G4, P2), K8 (G1, P3), y 69M (G9, P4). Los virus fueron propagados en células MA104 (de riñón de mono), utilizando 1 μ g/ml de tripsina en el medio de infección [9, 10, 38].

Muestras de campo de rotavirus. Se utilizó una colección de muestras de heces positivas para rotavirus por electroforesis del RNA genómico que habían sido obtenidas para realizar diversos estudios epidemiológicos [39]. Los pacientes son infantes admitidos por diarrea en dos hospitales de la Ciudad de México: Instituto Nacional de Pediatría, y Hospital Infantil; en el Hospital General O'Haran de Mérida, Yucatán; en el Hospital Civil de Cuernavaca, Morelos; ó que habían sido atendidos en la Clínica Navenchauc del Centro Regional de la Universidad de Stanford en Navenchauc, Chiapas, entre abril de 1988 y enero de 1992.

Muestras de heces de neonatos asintomáticos. Se utilizaron 200 muestras de heces de neonatos asintomáticos de menos de 48 horas de nacidos. Las muestras procedían de recién nacidos de madres que dieron a luz en el Instituto Nacional de Perinatología en la Cd. de México entre julio de 1993 y enero de 1994.

Anticuerpos monoclonales. Para los ensayos de serotipificación de VP4 se usaron los AMcN específicos de los serotipos P1A (1A10), y P2 (HS6 y HS11) descritos anteriormente [37]. Para los ensayos de serotipificación de VP7 se usaron los AMcN específicos de los serotipos G1 (5E8), G2 (1C10) [40], G3 (159) [41], y G4 (ST-2G7) [42].

ELISA con AMcs específicos de los serotipos P1A* y P2* de VP4 y G1 a G4 de VP7. Los ensayos inmunoenzimáticos para determinar los serotipos de VP4 y de VP7 se hicieron como se describió anteriormente [37, 40], con algunas modificaciones. Se cubrieron placas de microensayo Immulon II (Dynatech) con líquido de ascitis diluido 1:1,000 a 1:8,000 en solución salina amortiguada con fosfatos (AFS) adicionada con 0.05% de azida de sodio (AFS-Az). Después de incubar 12 a 24 horas a 4° C las placas se lavaron dos veces con AFS-Az y se

bloquearon con 10% de suero fetal de bovino (SFB) en AFS-Az durante 12-24 horas a 4° C. Cuando fué necesario, las placas cubiertas con líquido de ascitis se sellaron herméticamente y se guardaron hasta 1 mes a 4° C. Todos los lavados posteriores se hicieron con AFS-Az, y todas las incubaciones adicionales en SFB 5%, excepto que se indique lo contrario. Las placas se lavaron dos veces y se incubaron dos horas a 37° C con 75 μ litros de suspensión de heces al 1%. Luego de lavar las placas cuatro veces, se añadió una dilución 1:1,000 de una mezcla equivolúmica de un suero hiperinmune anti-rotavirus (producido en conejo contra los rotavirus Wa, DS1 x RRV [43], RRV, y ST3) y se incubó una hora a 37° C. Las placas se lavaron cuatro veces y se incubaron 1 hora a 37° C con conjugado anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, Mariland, E.U.A.). Finalmente, las placas se lavaron cuatro veces, se añadió el sustrato (fosfato de paranitrofenil 1 mg/ ml, MgCl₂ 1 mM, y dietanolamina 1%, pH 9.8), y las placas se incubaron a 37° C hasta obtener una Abs₄₀₅ de 1 ± 0.25 en los controles. Cada muestra de heces se ensayó por duplicado, y se leyó contra sus propios blancos, los cuáles se corrieron en dos pozos cubiertos con ascitis normal 1:5,000. Como controles positivos se corrieron rotavirus no purificados producidos en cultivo de células, pertenecientes a los serotipos G1 a G4 (para la determinación de serotipos de VP7), ó P1A, y P2 (para la determinación de serotipos de VP4). Los virus se asignaron a un serotipo G ó P específico cuando la Abs₄₀₅ obtenida con el AMcN correspondiente a dicho serotipo fue mayor de 0.2 y al menos el doble del valor obtenido con AMcNs específicos de cualquier otro serotipo G ó P, según el caso.

Purificación de virus. El virus cultivado *in vitro* se congeló una vez para liberar al virus intracelular y se extrajo con triclorotrifluoroetano (Freon) con el fin de liberar al virus asociado a membranas (*i.e.*, se mezcló con 1/2 volumen de Freon, se agitó en Vortex, se centrifugó 30 minutos a 6,000 rpm en un rotor Beckman JS7.5, y se colectó el sobrenadante). El virus presente en sobrenadante se concentró por ultracentrifugación a 24,000 rpm en rotor SW28 (Beckman), y posteriormente se purificó en gradiente isopícnico de CsCl (*i.e.*, el virus se aplicó sobre CsCl con densidad de 1.37 gr/cm³ en amortiguador TC [tris 10 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7.5], se centrifugó 18 horas a 33,000 rpm en un rotor SW50.1 [Beckman], y se

colectó la banda opalescente de mayor densidad, la cuál corresponde a virus sin cápside externa). El virus sin cápside externa se concentró por centrifugación durante una hora a 35,000 rpm en un rotor SW55 (Beckman), y se resuspendió en tris 10 mM, pH 7.5.

Transcripción dirigida por la polimerasa viral. Se produjo RNA de cadena sencilla por transcripción a partir de la polimerasa endógena de rotavirus de acuerdo al método descrito por Flores *et al.* [44] con algunas modificaciones. Se adicionó virus sin cápside externa a la mezcla de transcripción (CTP 2.5 mM, GTP 2.5 mM, UTP 2.5 mM, ATP 8 mM, S-adenosilmetionina 0.5 mM, acetato de magnesio 20 mM, acetato de sodio 100 mM, EGTA 0.05 μ M, bentonita 0.15%, tris 70 mM, pH 8.0), se incubó 6 horas a 42° C, y se eliminó la bentonita por microcentrifugación (*i.e.* centrifugación durante 5 minutos a 12,800 x g). El RNAm en el sobrenadante se precipitó en presencia de LiCl 2M durante 12 horas a 4° C y se colectó por microcentrifugación. La pastilla se lavó 1 vez con etanol absoluto, se resuspendió en 250 μ l de buffer TES (NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, tris 50 mM, pH 7.5), se precipitó con 3 volúmenes de etanol, se colectó por microcentrifugación y se resuspendió en 100-200 μ l de H₂O. El rendimiento de RNAm se estimó visualmente corriendo una alícuota en minigel en presencia de bromuro de etidio.

Transcripción reversa. Se produjo cDNA por la acción de la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar sobre RNAm viral. El RNAm (suficiente cantidad para ser visualizado por minigel) y 750 nanogramos del oligonucleótido 5' (descrito en el siguiente párrafo) fueron desnaturalizados en baño a ebullición durante 1 minuto, y enfriados en hielo. Posteriormente se añadió la mezcla de transcripción reversa (transcriptasa reversa 1 unidad/ μ l, KCl 30 mM, MgCl₂ 8 mM, ditiotretitol 1 mM, RNAsin [Promega] 1 unidad/ μ l, tris 50 mM, pH 8.5) en un volumen total de 25 μ l. Después de incubar una hora a 42° C se eliminó el templado de RNA a través de calentamiento 10 minutos a 70°, y digestión con 2 unidades de ribonucleasa A/ μ litro durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Producción de sondas marcadas con ³²P. Las sondas marcadas con ³²P fueron producidas por PCR usando como templado cDNA del gene 4 producido por transcripción reversa

a partir de tres cepas representativas de los serotipos P1A, P1B, y P4 (Wa, S2, y 69M). Los oligonucleótidos usados para producir la sonda fueron los más cercanos a la región hipervariable del gene 4 (entre los nucleótidos 220-621) que permitieron tener un máximo de dos nucleótidos desapareados con respecto a la secuencia de los genes 4 de cualquiera de las tres cepas usadas. El oligonucleótido 5' GATGGTCCTTATCAACC, es homólogo a los nucleótidos 205-221, y el oligonucleótido 3', CCACCAATTCAGAATAC, es complementario a los nucleótidos 679-695. La mezcla de reacción, en un volumen total de 50 μ l, consistió de cDNA (en cantidad suficiente para producir una banda intensa de producto de acuerdo a ensayos previos), 2.5 unidades de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, 300 nanogramos de oligonucleótido 5', 300 nanogramos de oligonucleótido 3', dATP 200 μ M, dGTP 200 μ M, dTTP 200 μ M, dCTP 4 μ M, 12.5 μ Ci 32 P dCTP (3000 Ci/mmol), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, tris 10 mM, pH 8.3. La reacción de PCR se llevó a cabo en 30 ciclos de desnaturalización (1' a 94° C), renaturalización (1' 30" a 42 °C), y extensión (3' a 72 °C) en un termociclador Perkin-Elmer Cetus. Se estimó el rendimiento del producto por comparación visual de la intensidad de la banda del peso molecular esperado versus cantidades conocidas de marcadores de peso molecular en minigel teñido con bromuro de etidio. El producto se precipitó con etanol-acetato de amonio, se lavó con etanol absoluto, y se determinó la radioactividad incorporada en un contador de centelleo Beckman LS6000IC. Aunque la actividad específica de las sondas fue subóptima (5×10^6 a 1.5×10^7 cpm/ μ g) en relación a la que usan otros autores (1×10^8 cpm/ μ g), de cualquier manera se obtuvo una señal limpia y de la especificidad esperada al hacer el ensayo de hibridización Northern en punto contra RNA de cadena doble (RNAcd) de virus control pertenecientes a los serotipos P1A, P1B, P2, y P3.

Preparación y cuantificación del RNA genómico. El RNAcd de rotavirus presentes en muestras de heces ó de rotavirus propagado en cultivo de células fue obtenido por extracción con Freón seguida de extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol-acetato de amonio. La concentración de ácido nucleico se determinó por comparación de la intensidad de los segmentos de RNA visualizados en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de

plata por el método de Herring [45] versus un control cuya concentración de RNAcd era conocida. Este control se obtuvo a partir de rotavirus purificado hasta gradiente de cloruro de cesio, del cuál se extrajo RNAcd por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, y en el cuál se determinó la concentración de ácidos nucleicos por Abs₂₆₀ en base al factor de conversión reportado para RNAcd de reovirus ($5.4 A_{260} = 1 \text{ mg/ml}$) [46].

Ensayo de hibridización. Se siguieron las condiciones reportadas por Steele *et al.* [47], con algunas modificaciones. El RNAcd fue desnaturalizado en baño a ebullición durante 3', enfriado sobre hielo, y distintas cantidades (0.05, 0.5, y 5 μg) fueron aplicadas sobre varias membranas de Nylon (Nytran, Schleicher & Schuell); esto fue seguido por fijación con 120 miliJoules de luz ultravioleta de onda corta (Stratalinker, Stratagene). Como controles se aplicaron RNAs de cepas cultivadas *in vitro* pertenecientes a distintos serotipos P. Las membranas fueron prehibridizadas 2-4 horas a 54° C en formamida 50%, solución de Denhardt 5x (la solución de Denhardt 1x es Ficoll 400 0.02%, polivinilpirolidona 0.02%, albúmina sérica bovina 0.02%), DNA de esperma de salmón 50 $\mu\text{g/ml}$, SDS 0.02%, SSC 5x (SSC 1x es 0.15 M NaCl, 0.015 M citrato de sodio), KHPO₄ 25 mM, pH 7.4. La hibridización se llevó a cabo durante 16 horas a 54° C en una solución similar a la de prehibridización, pero conteniendo solución de Denhardt 2.5 x, SDS 0.2% y 5×10^6 cpm de sonda desnaturalizada por ml. Posteriormente se lavaron las membranas 4 veces a temperatura ambiente con SSC 2.5x, SDS 0.2%, y 2 veces en SSC 1.25x, SDS 0.05%, para finalmente secar y exponer película de rayos X durante 24 horas.

RESULTADOS ADICIONALES

Serotipificación de VP4 y VP7 por ELISA con AMcN. En el presente trabajo iniciamos el estudio de la utilidad de un AMcN anti-VP4 específico del serotipo P1A (AMcN 1A10), y dos AMcN anti-VP4 específicos del serotipo P2 (AMcNs HS6 y HS11) para distinguir serotipos de VP4 en cepas de campo de RVHs. Los AMcNs anti-VP4 no han sido ampliamente validados como reactivos específicos de serotipo, por lo que los resultados de este método se consideraron preliminares y por tal motivo se marcaron con un asterisco (P1A* ó P2*). Se determinaron también los serotipos G1 a G4 por ELISA con AMcN específicos, ya que se ha observado cierta correlación entre los serotipos P y G (Tabla 1). A diferencia de lo que ocurre con respecto a VP4, el ensayo de ELISA con AMcN anti-VP7 para determinar serotipos G en muestras de campo de rotavirus ha sido ampliamente validado por comparación con la serotipificación por el método tradicional de neutralización [48].

De los 71 especímenes en los que se demostró previamente la presencia de rotavirus por electroforesis del RNA viral, 35 (49.3%) reaccionaron con el AMcN 1A10 por lo que se consideraron como serotipo P1A*, y ninguno reaccionó con los AMcN HS6 ó HS11, por lo que se consideró que no hubo cepas de serotipo P2* (Tabla 2). Con respecto a la serotipificación de VP7, 16 (22.5%) presentaron serotipo G1, 23 (32.4%) serotipo G2, 17 (23.9%) serotipo G3, 2 (2.8%) serotipo G4, y 13 (18.3%) no pudieron ser serotipificados (Tabla 2).

Relación entre serotipos de VP4 y VP7. Entre las cepas de rotavirus de serotipo P1A* en las que fue posible determinar el serotipo de VP7, 25 corresponden a los serotipos G1, G3 ó G4, y 7 al serotipo G2 (Tabla 2). En estudios de serotipificación hechos por otros autores con un número limitado de cepas de rotavirus, se encontró una asociación entre los serotipos G2 y P1B, por lo que fue sorprendente el encontrar 7 cepas de serotipo G2 y P1A* en este estudio. Desafortunadamente no dispusimos de AMcN específicos del serotipo P1B en nuestro estudio, lo cuál nos permitiría hacer un análisis más completo de las asociaciones entre serotipos P y G.

Tabla 2

Distribución de los serotipos de las proteínas VP4 y VP7 en 71 muestras de campo de rotavirus de humano

Serotipo de VP4 ^b	Serotipo de VP7					Total
	G1	G2	G3	G4	NI ^a	
P1A*	13	7	11	1	3	35
P2*	0	0	0	0	0	0
NI ^a	3	16	6	1	10	36
Total	16	23	17	2	13	71

^a NI, no identificado.

^b Se indica con un asterisco que la asignación serotípica es preliminar debido a que los AMcN anti-VP4 no han sido ampliamente validados como reactivos específicos de serotipo.

Diagnóstico de la presencia de rotavirus en heces de neonatos asintomáticos. La ausencia de cepas de rotavirus del serotipo P2* en los 71 infantes sintomáticos estudiados es congruente con la hipótesis de Gorziglia *et al.*, que propone que este serotipo infecta principal o exclusivamente a neonatos asintomáticos [26]. Sin embargo, para analizar la validez de dicha hipótesis, es necesario estudiar directamente los serotipos de rotavirus presentes en neonatos asintomáticos. Con este objetivo en mente, obtuvimos heces de 200 neonatos asintomáticos, en las cuáles estudiamos la presencia de rotavirus por electroforesis del RNA genómico. En ninguna de estas muestras se detectó la presencia de rotavirus, por lo que no fue posible seguir adelante con el objetivo de serotipificación de rotavirus aislados de neonatos asintomáticos.

Tipificación del gene 4 por hibridización Northern en punto. Los ensayos de serotipificación de VP4 por el ensayo de neutralización con sueros hiperinmunes monoespecíficos no son fácilmente aplicables a estudios epidemiológicos, ya que requieren la adaptación de las muestras de campo de rotavirus a crecer en cultivo de células, lo cuál resulta fastidioso por la pobre capacidad de rotavirus silvestres para replicarse *in vitro* [19]. Como alternativa a la serotipificación, se han desarrollado métodos para determinar la diversidad genómica de VP4, como la hibridización [47]. Igual que ocurre con los serotipos de VP7, existe cierta asociación entre tipos genéticos y serotipos de VP4 (Tabla 1), sin que se hayan encontrado a la fecha excepciones en las cepas de referencia analizadas.

Para ayudar a resolver la no correspondencia entre el serotipo G esperado y el serotipo P* de 7 de los especímenes estudiados (serotipo P1A*, G2), se tipificó el gene 4 de dos de ellos, los cuáles fueron asignados al tipo genómico P-gen4. Este tipo genómico es el que se espera de cepas del serotipo G2, pero diferente del que se espera de cepas del serotipo P1A (P-gen8) (Tabla 1).

DISCUSION ADICIONAL

Alcance y limitaciones del estudio. En este trabajo estudiamos la diversidad de epítopes de neutralización de cepas de campo de RVHs a través de un panel de AMcNs específicos de los serotipos P1A y P2. Los resultados de serotipificación con este método se consideraron preliminares, y por esta razón se marcaron con un asterisco, debido a que los AMcN no han sido ampliamente validados como reactivos específicos de serotipo a través de comparación con la técnica que consideramos como estándar de referencia para la determinación de la diversidad antigénica de VP4, *i.e.*, el ensayo de neutralización con sueros hiperinmunes contra proteínas VP4 recombinantes. Es de esperarse que el serotipo determinado de esta manera sea el resultado del efecto aditivo de diversos anticuerpos neutralizantes sobre los epítopes correspondientes. En la búsqueda de AMcN específicos de serotipo se espera que un epítope en particular sea dominante en la determinación del mismo, de tal manera que un simple ensayo de reactividad con dicho AMcN pueda ser usado como sustituto de un ensayo de neutralización con anticuerpos policlonales. En este estudio se inició el análisis de la utilidad como reactivos específicos de serotipo de un grupo de AMcN que en experimentos previos con un número limitado de cepas de referencia de rotavirus cultivadas *in vitro* demostraron especificidad contra los serotipos P1A y P2 [37]. Desgraciadamente no podemos comparar el ensayo basado en AMcNs que estamos proponiendo para determinar la diversidad antigénica de VP4 con el ensayo de neutralización considerado como estándar de referencia porque este último requiere la adaptación de las cepas de campo a crecer en cultivo de células, proceso fastidioso que requiere muestras de campo de rotavirus frescas (*i.e.* que no hayan sido congeladas y descongeladas numerosas veces), de las cuáles no disponíamos. En base a esta limitación se decidió determinar otras especificidades como el serotipo de la proteína VP7 y en segunda instancia el tipo genómico de VP4, ya que estas propiedades han sido asociadas con los serotipos de VP4, aunque sólo con un número limitado de cepas de referencia adaptadas a crecer en cultivo de células.

Prevalencia de los serotipos P1A* y P2* en los infantes sintomáticos estudiados. Nuestros resultados sugieren que el serotipo P1A presenta una alta prevalencia en infantes con infecciones sintomáticas por rotavirus. Este resultado coincide con la inferencia (basada en serotipificación de cepas de RVH adaptadas a crecer en cultivo de células) de que los serotipos P1A y P1B (en ese orden) son los que ocurren con mayor frecuencia en infantes sintomáticos (Y. Hoshino, comunicación personal). No se puede descartar la posibilidad de que la prevalencia de infección con RVHs del serotipo P1A sea aún mayor que la que nosotros encontramos, ya que aunque en este estudio utilizamos un AMcN (1A10) que en un estudio previo reaccionó específicamente con todas las cepas de referencia de RVHs del serotipo P1A que se probaron (cinco en total), pudieran existir cepas de éste serotipo que no presenten el epítipo reconocido por el AMcN 1A10. Si tal fuese el caso, podría ser necesario utilizar más de un AMcN específico del serotipo P1A para lograr identificar a todas las cepas de este serotipo. Por otro lado, para la realización este estudio preliminar no dispusimos de un AMcN específico del serotipo P1B, lo cuál explica al menos en parte el alto porcentaje (aproximadamente la mitad) de especímenes en que no fue posible determinar el serotipo de VP4.

En este estudio no se encontró alguna cepa que reaccionara con los AMcN específicos del serotipo P2, en concordancia con la hipótesis postulada por Gorziglia *et al.* [26] de que el serotipo P2 está asociado con infecciones asintomáticas. Esta hipótesis ha sido cuestionada debido a que se han detectado cepas de los tipos genómicos P-gen6 (comunmente asociado con el serotipo P2) en infantes sintomáticos, y P-gen8 (comunmentre asociado con el serotipo P1A) en neonatos asintomáticos [5]. Ciertamente la hipótesis de Gorziglia *et al.* dista mucho de haber sido probada, sin embargo, es importante determinar si es correcta o no, dadas las implicaciones que tendría en el diseño de mecanismos profilácticos contra la diarrea por rotavirus.

Consideraciones sobre la necesidad de determinar la prevalencia de distintos serotipos de VP4 en neonatos asintomáticos. Un enfoque epidemiológico para abordar la pregunta acerca de una posible diferencia en virulencia entre RVHs es determinar la prevalencia de los diversos serotipos de VP4 en neonatos asintomáticos e infantes sintomáticos.

En este estudio se hizo un primer esfuerzo para conseguir muestras de rotavirus de neonatos asintomáticos, donde se colectaron muestras de heces desde el momento del nacimiento hasta las 48 horas *post partum*. Dado que de los 200 neonatos analizados ninguno excretó rotavirus, resulta necesario modificar la estrategia para obtener este tipo de muestras. Una forma de resolver el problema será coleccionar heces de neonatos mayores de 48 horas. Sin embargo, esta tarea es más complicada que la que se siguió, dado que las madres sanas que dan a luz a bebés sanos rara vez permanecen en el hospital más de 48 horas, por lo que la colección de muestras de neonatos mayores de 48 horas requiere la participación de trabajadoras sociales que adquirieran la muestra a través de visita domiciliaria.

Consideraciones sobre los factores genéticos de los rotavirus que determinan la virulencia. Las bases genéticas que determinan la virulencia de RVAs no se conocen a ciencia cierta, sin embargo, parece ser que se trata de un fenómeno multifactorial, en el que se ha involucrado al gene 4 [15], y no se descarta que otros genes virales también participen, especialmente el gene 5 [49]. Estos estudios de virulencia se han llevado a cabo en el modelo murino de infección por rotavirus. En este modelo, se han encontrado diferencias de hasta 10^5 veces entre la capacidad de rotavirus homólogos (murinos) y heterólogos (procedentes de otras especies) para causar enfermedad. Así, la diferencia en dosis capaz de causar diarrea en el 50% de los animales inoculados (DD₅₀) se considera una diferencia en virulencia. Otro factor de virulencia que se ha medido en este modelo es la capacidad de un virus para propagarse de un animal inoculado a otros miembros de la misma camada que no hayan sido inoculados. Usando el modelo murino, Offit *et al.* [15] encontró que el gene 4 es responsable de diferencias moderadas en DD₅₀ (50 veces) entre rearreglantes genéticas producidas a partir de un rotavirus bovino y un rotavirus de simio. En un estudio similar basado en rearreglantes genéticas, Brome *et al.* encontraron datos que sugieren que el gene 5 en asociación con otro gene, aún no identificado, son responsables de las grandes diferencias en DI₅₀ (de hasta 10^5 veces) que se observan entre un rotavirus murino y otro de simio, y de la capacidad que presenta el virus murino para propagarse a animales no inoculados [49]. En estos estudios no se ha valorado la influencia que

factores dependientes del huésped pudieran tener sobre la virulencia, como la presencia o ausencia de anticuerpos maternos circulantes, o diferencias en la susceptibilidad a infección de células blanco en distintos estadios de su maduración funcional.

Relación entre los serotipos de VP4 y VP7, y entre estos serotipos con el tipo genómico de VP4. En estudios hechos por Gorziglia *et al.* se ha observado asociación entre los serotipos G2 ó G12 y P1B ó G1, G3, G4, ó G9 y P1A en cepas de rotavirus de referencia cultivables *in vitro* (Tabla 1) [21, 25]. En nuestro estudio, la mayoría de los especímenes en los que se determinó el serotipo P*, el serotipo G correspondió con lo que se esperaba en base a las asociaciones observadas por Gorziglia *et al.* Así, 25 de 35 especímenes del serotipo P1A* presentaron los serotipos G1, G3, ó G4, mientras que en tres de los especímenes del serotipo P1A* no fue posible determinar el serotipo G. Sin embargo, también encontramos, contrariamente a lo reportado por Gorziglia *et al.*, 7 especímenes del serotipo P1A*, G2. En dos de estos especímenes se identificó el tipo genómico, que resultó ser P-gen4, el cuál se ha reportado que corresponde al serotipo P1B, y a la fecha solo se ha encontrado asociado con el serotipo G2 de VP7. Hay dos posibles explicaciones a estos resultados. La primera es que el AMcN 1A10 detecta un epítipo que no es propiamente específico del serotipo P1A, sino compartido entre cepas de los serotipos P1A y P1B, las cuáles perteneciendo a distintos subtipos dentro del mismo serotipo deben de compartir uno o más epítopos de neutralización; y la segunda explicación es que la asignación serotípica dada por el AMcN 1A10 sea correcta, y que exista un subgrupo de cepas del serotipo P1A que presenten el tipo genómico P-gen4, a pesar de que en cepas de referencia solo hayan coincidido a la fecha el serotipo P1A con el tipo genómico P-gen8, y el serotipo P1B con el tipo genómico P-gen4. En cualquiera de los dos casos, es evidente que hay heterogeneidad antigénica en la proteína VP4 de cepas pertenecientes al serotipo G2 en relación con la presencia o ausencia del epítipo reconocido por el AMcN1A10. El estudio detallado de la presencia de diversos epítopos de neutralización en cepas de RVHs pertenecientes a distintos serotipos servirá para entender las bases que determinan la especificidad serotípica.

CONCLUSIONES

El presente estudio contribuye al conocimiento de la estructura antigénica de la proteína VP4 en RVH al ubicar sitios antigénicos importantes para el reconocimiento por AMcNs en la estructura lineal del gene. Estos estudios deberán servir como marco de referencia para la identificación de los sitios antigénicos en la estructura tridimensional de VP4 una vez que esta se resuelva.

El estudio detallado de la estructura y función de las distintas proteínas de los rotavirus es importante *per se* porque permite entender la biología del virus. Además, el estudio de las funciones virales relacionadas con la producción de enfermedad, como son algunos de los aspectos abordados en este estudio, *i.e.*, la neutralización por anticuerpos, la virulencia, y la diversidad antigénica, deben ser útiles para desarrollar mecanismos profilácticos efectivos.

BIBLIOGRAFIA

1. Walsh, J.A. y K.S. Warren. *Selective primary health care: an interim strategy for disease control in developing nations*. N. Engl. J. Med., 1979. **301**: p. 967-974.
2. Shaw, R.D. y H.B. Greenberg. *Rotaviruses*, en *Encyclopedia of Virology*, R.G. Webster y A. Granoff, Editor. 1994, Academic Press: London. p. 1274-1290.
3. Desselberger, U. y M.A. McCrae. *The rotavirus genome*, en *Current Topics in Microbiology and Immunology*, R.F. Ramig, Editor. 1994, Springer-Verlag: Berlin. p. 31-66.
4. Mattion, N.M. et al. *The rotavirus proteins*, en *Virus infections of the gastrointestinal tract*, A.Z. Kapikian, Editor. 1994, Marcel Dekker: New York. p. 169-247.
5. Estes, M.K. y J. Cohen. *Rotavirus gene structure and function*. Microbiol. Rev., 1989. **53(4)**: p. 410-449.
6. Prasad, B.V.V. y W. Chiu. *Structure of rotavirus*, en *Virus infections of the gastrointestinal tract*, A.Z. Kapikian, Editor. 1994, Marcel Drekker: New York. p. 9-29.
7. Matsui, S.M., et al. *Molecular determinants of rotavirus neutralization and protection*. Advances in virus research, 1989. **36**: p. 181-214.
8. Mackow, E.R., et al. *The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988. **85(3)**: p. 645-649.
9. Clark, S.M., et al. *Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement*. J. Virol., 1981. **39(3)**: p. 816-822.
10. Espejo, R.T., et al. *Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin*. J. Virol., 1981. **37(1)**: p. 156-160.
11. Fukuhara, N., et al. *Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7*. J. Virol., 1988. **62(7)**: p. 2209-2218.

12. Kaljot, K.T., et al. *Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis.* J. Virol., 1988. 62(4): p. 1136-1144.
13. Kalica, A.R., et al. *Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation.* Virology, 1983. 125(1): p. 194-205.
14. Offit, P.A. and G. Blavat. *Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities.* J. Virol., 1986. 57(1): p. 376-378.
15. Offit, P.A., et al. *Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4.* J. Virol., 1986. 57(1): p. 46-49.
16. Greenberg, H.B., et al. *Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus.* J. Gen. Virol., 1983. 64: p. 313-320.
17. Patton, J.T., et al. *Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VP8* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4.* J. Virol., 1993. 67: p. 4848-4855.
18. Lopez, S., et al. *Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity.* Virology, 1985. 144(1): p. 11-19.
19. Kapikian, A.Z. y R.M. Chanock. *Virology*, in *Virology*, B.N. Fields and D.M. Knipe, Editor. 1990, Raven Press: New York. p. 1353-1404.
20. Hoshino, Y. y A.Z. Kapikian. *Rotavirus antigens*, in *Rotavirus*, R.F. Ramig, Editor. 1994, Springer-Verlag: Berlin. p. 179-228.
21. Gorziglia, M., et al. *Antigenic relationships among human rotaviruses ad determined by outer capsid protein VP4.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990. 87: p. 7155-7159.
22. Li, B. y M. Gorziglia. *En prensa.* J. Clin. Microbiol.
23. Li, B., et al., *Human rotavirus K8 strain represents a new VP4 serotype.* J. Virol., 1993. 67(1): p. 617-620.

24. Homes, I.H., et al. *Nomenclature of rotavirus serotypes. (Elaborado por el Rotavirus nomenclature working group). Seventh International Conference of Comparative and Applied Virology.* 1994. Montreal, Canada.
25. Sereno, M.M. y M.I. Gorziglia. *The outer capsid protein of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type.* *Virology*, 1994. **199**: p. 500-504.
26. Gorziglia, M., et al. *Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections.* *J. Virol.*, 1988. **62**(8): p. 2978-2984.
27. Tufvesson, B., et al. *A prospective study of rotavirus infections in neonatal and maternity wards.* *Acta Paediatr. Scand.*, 1986. **75**(2): p. 211-215.
28. Vial, P.A., et al. *Molecular epidemiology of rotavirus infection in a room for convalescing newborns.* *J. Infect. Dis.*, 1988. **157**(4): p. 668-6673.
29. Zhou, Y., et al. *Localization of rotavirus VP4 neutralization epitopes involved in antibody-induced conformational changes of virus structure.* *Virology*, 1994. **68**: p. 3955-3964.
30. Kobayashi, N., et al. *Identification of operationally overlapping and independent cross-reactive neutralization regions on human rotavirus VP4.* *J. Gen. Virol.*, 1990. **71**: p. 2615-2623.
31. Taniguchi, K., et al. *Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus.* *J. Virol.*, 1988. **62**(7): p. 2421-2426.
32. Ruggeri, F.M. y H.B. Greenberg. *Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture.* *J. Virol.*, 1991. **65**(5): p. 2211-2219.
33. Fukudome, K., et al. *Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell absorption.* *Virology*, 1989. **172**: p. 196-205.

34. Mendez, E., et al. *Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture.* J. Virol., 1993. **67**(9): p. 5253-5259.
35. Yewdell, J.W. y W. Gerhard. *Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies.* Ann. Rev. Microbiol., 1981. **35**: p. 185-206.
36. Coulson, B.S. *Typing of human rotavirus VP4 by an enzyme immunoassay using monoclonal antibodies.* J. Clin. Microbiol., 1993. **31**(1): p. 1-8.
37. Padilla-Noriega, L., et al. *Serologic analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies.* J. Clin. Microbiol., 1993. **31**(3): p. 622-628.
38. Estes, M.K., et al. *Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms.* J. Virol., 1981. **39**(3): p. 879-888.
39. López, S., et al. *Correlación entre serotipo y electroferotipo de rotavirus aislados en dos poblaciones de México.* Bol. Hosp. Infant. Mex., 1993. **50**(10): p. 736-740.
40. Padilla-Noriega, L. et al., *Diversity of rotavirus serotypes in Mexican infants with gastroenteritis.* J. Clin. Microbiol., 1990. **28**: p. 1114-1119.
41. Shaw, R.D., et al. *Antigenic mapping of the surface proteins of rhesus rotavirus.* Virology, 1986. **155**(2): p. 434-451.
42. Taniguchi, K., et al. *Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-, 2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7.* J. Infect. Dis., 1987. **155**(6): p. 1159-1166.
43. Midthun, K., et al. *Reassortant rotaviruses as potential live rotavirus vaccine candidates.* J. Virol., 1985. **53**(3): p. 949-954.
44. Flores, J., et al. *In vitro transcription of two human rotaviruses.* J. Virol., 1982. **43**(3): p. 1032-1037.
45. Herring, A.J., et al. *Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels.* J. Clin. Microbiol., 1982. **16**(3): p. 473-477.

46. Kapahnke, R., et al. *The stiffness of dsRNA: hydrodynamic studies on fluorescence-labelled RNA segments of bovine rotavirus.* Nucleic Acids Res., 1986. **14**(8): p. 3215-3228.
47. Steele, A.D., et al. *Distribution of VP4 gene alleles in human rotaviruses by using probes to the hyperdivergent region of the VP4 gene.* J. Clin. Microbiol., 1993. **31**(7): p. 1735-1740.
48. Urasawa, S., et al. *Validity of an enzyme-linked immunosorbent assay with serotype-specific monoclonal antibodies for serotyping human rotavirus in stool specimens.* Microbiol. Immunol., 1988. **32**(7): p. 699-708.
49. Broome, R.L., et al. *Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence.* J. Virol., 1993. **67**(5): p. 2448-2455.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**