



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Bioquímica Clínico-mèdica i Immunologia

**ESTUDI DE LA IMMUNOGENICITAT DE
NOROVIRUS HUMANS I DE LA SEUA
INTERACCIÓ AMB RECEPTORS
CEL·LULARS**

Noelia Carmona Vicente

Directors:

Javier Buesa Gómez

Jesús Rodríguez Díaz

València 2014



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Departament de Microbiologia

Facultat de Medicina

**ESTUDI DE LA IMMUNOGENICITAT DE
NOROVIRUS HUMANS I DE LA SEUA
INTERACCIÓ AMB RECEPTORS
CEL·LULARS**

**Memòria que presenta
Noelia Carmona Vicente
per a optar al grau de
Doctor en Bioquímica**

València 2014



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA (UNIVERSITAT DE VALÈNCIA) Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Microbiologia i Ecologia

Javier Buesa Gómez, Doctor en Medicina i Catedràtic de Microbiologia al Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València, i **Jesús Rodríguez Díaz**, Doctor en Ciències Biològiques,

FAN CONSTAR

Que el present treball de recerca titulat “**ESTUDI DE LA IMMUNOGENICITAT DE NOROVIRUS HUMANS I DE LA SEUA INTERACCIÓ AMB RECEPTORS CEL·LULARS**” ha estat realitzat sota la nostra direcció per **Na Noelia Carmona Vicente**, llicenciada en Bioquímica per optar al títol de Doctora en Bioquímica per la Universitat de València.

València, 15 de maig de 2014

Firma: Dr. J. Buesa Gómez

Firma: J. Rodríguez Díaz

Secció Departament de Microbiologia
Facultat de Medicina i Odontologia
Av. Blasco Ibañez, 17 baix
VALÈNCIA

Telèfon 96 386 46 58

Fax 96 386 46 58

“Si no conec una cosa,
la investigaré”

Isaac Newton

Als meus pares,

iaios i germà

A Misha

AGRAÏMENTS

La gent que me coneix sap que sóc persona de poques paraules i més fets i, per aquesta raó, he deixat els agraïments per al final. Posar-me a escriure el que senc i agrair a tots els que heu participat, bé directa o indirectament, en la realització d'aquesta tesi, per a mi resulta molt difícil. La veritat que des de que vaig començar en el 2008 al laboratori de Microbiologia del Dr. Javier Buesa fins l'actualitat, han canviat molt les coses tant a nivell laboral com personal.

A nivell laboral puc dir que sempre m'ha agradat la investigació i treballar a un laboratori fent experiments i provant coses noves. Els inicis van ser molt durs, com tots els que me rodegen coneixen, de fet hem vaig plantejar deixar-me l'àmbit relacionat amb la investigació i dedicar-me a l'ensenyança, que també és altra rama que m'agrada molt, encara que queda en segon plànol. Però gràcies a l'acollida de tots els companys de laboratori i com no, a la meua família, vaig poder aguantar i superar el "bache" del camí de la meua carrera investigadora. Així que, a la primera persona que he de començar agraint la meua formació com a investigadora és al professor Javier Buesa, i al professor Sergi Ferrer per posar-nos en contacte.

Javier, moltes gràcies per donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral al teu laboratori. La veritat que com el tema era aplicable a la vida quotidiana i estava relacionat amb la salut pública ja de per sí m'agradava, però també el fet de saber que el teu grup era un dels pocs d'Espanya que es dedicava a l'estudi dels norovirus i la teua

llarga carrera investigadora i activa, van fer que m'acabara de decidir. A més, m'has donat l'oportunitat de realitzar dos estàncies en laboratoris estrangers, que és una experiència que aconselle a qualsevol, ja que s'aprèn moltíssim i t'ajuda a ser autosuficient i a establir possibles col·laboracions futures. Per últim, també agrair-te l'haver pogut participar en les tasques docents del departament. El poder donar classes pràctiques a adolescents universitaris també és una experiència que m'ha agradat i que no descarte per a un futur a llarg termini. Gràcies per la teua confiança i dedicació.

Jesús, en poques paraules no sé com agrair-te tot el que m'has aconsellat, m'has ensenyat i has fet per mi. Encara que legalment has passat fa poc a ser un dels meus directors de tesi, sabem de sobra que sempre has estat ahi per a tot allò que t'he necessitat, sobretot aquests dos últims anys. A banda de director, eres amic i et considere una molt bona persona així com un científic que val milions. Sempre estàs pensant en noves idees i nous experiments que dur a terme i en com superar-te dia a dia. Segueix així i no canvis mai. Espere de tot cor que en un futur pròxim pugues consolidar la teua carrera investigadora i poder dirigir el teu propi grup d'investigació (en el qual no tindria cap inconvenient de formar part...).

Miren, gràcies per acollir-me en el teu grup d'investigació, tant a Londres com a Liverpool. Ha sigut una experiència de la qual sols recorde coses bones. He estat molt agust gràcies tant a la teua amabilitat com a la de tots els companys, que si no ens tornem a juntar, no oblidaré mai: David, Farah, Sameena, Mathura, Jacqueline, Fred, Laura, Stavros, Matt, John, Simon... i no pararia de dir noms.

Gràcies per rebrem amb els braços oberts i per tot el teu suport tant a nivell laboral com personal. Eres un punt de referència i un exemple a seguir.

Què puc dir dels meus companys del labo? Mil gràcies per estar ahí tant en els moments bons com en els mals. Heu tingut que aguantar els meus mal humors i també cabrejos, que han sigut prou, però sempre heu tingut paraules d'ànim i intentàveu fer que veguera les coses de forma positiva. Érem pocs però dels bons. Juanma, moltes gràcies per ensenyar-me molt del que ara sé en els meus inicis i com no, de fer de guia en Londres i acollir-me en ta casa. Sense tu, la meua estància a Londres no havera sigut la mateixa. Manuel, hem compartit molts moments, realment és amb el que més temps he passat i encara que de quan en quan tirava de menys alguna xica en el labo, m'alegre moltíssim d'haver compartit aquests 5 anys amb tu. Els dos ens aguantàvem els nostres alt i baixos, i fèiem funcionar el laboratori al 100%. Gràcies pels teus consells. Sempre recordaré que bé ens ho passarem en el congrés de Barcelona, amb Carlos, del que tampoc volia oblidar-me. Per últim, la meua Susanita, que no per això la menys important. Hem estat poc temps juntes però ha sigut molt intens i ha sorgit una bona amistat. Gràcies per les teues locures, era el toc humorístic que faltava en el labo. No canvies mai "loca". A les meues estudiants de màster, Sofia i Karima, pel vostre interès d'aprendre. Bea, moltes gràcies per la teua ajuda amb el seqüenciador.

No vull oblidar-me tampoc de totes les tècniques de laboratori que han anat passant pel departament, des de Cristina i Cinta fins a Elvira. Tampoc de Javier company d'esmorzars, Carmen la secretària

ni de Maria, gràcies en especial a tu per comprendre i recolzar-me sempre. De totes elles em porte molt bon record i espere que no m'obliden mai. Gràcies també pels vostres consells i estones divertides que hem passat en els “piscolabis” del rector per Nadal.

A nivell personal he passat per molts alt i baixos durant aquest període. Moments durs han sigut la meua separació amb Jose, que encara que el destí ha volgut que seguim camins diferents, has format una part important en la meua vida i també en el curs d'aquesta tesi, gràcies. També va ser un colp fort la pèrdua de la meua amiga Vero, de vegades el destí és molt cruel. Sempre te tinc present i no m'oblidaré mai de tu. Però tant família com amics han estat ahi per a animar-me i donar-me les mostres de carinyo necessàries.

Papà, mamà, gràcies per a donar-me tot allò que he necessitat sense esperar mai res a canvi. Sense vosaltres arribar fins ací havera sigut molt més difícil. Gràcies per donar-me el suport necessari per a aconseguir tot allò que me propose i ensenyar-me a ser una lluitadora. Gràcies tete per cuidar de mi, de vegades som gat i gos, eres un punxa, però eres el meu tetuxi. Gràcies cunyiiii per ser com eres. Uelitos, gràcies per cuidar de mi i pels vostres consells tant savis. Encara que no vos ho diga, tots sabeu que vos estime i estic orgullosa de tindre la família que tinc.

Gràcies també a les meues cuquites Misha, Nana i Linda que han compartit les llargues nits d'estudi en època d'exàmens i l'escriptura d'aquesta tesi, baix la llum del flexo.

Jessi, Tere, Sariues, gràcies per estar sempre al meu costat. M'alegre de poder compartir la vostra amistat i de què els meus bixets de laboratori entre vosaltres eren bromes i estones divertides. Sariues, encara recorde aquell estiu que m'ajudares amb els ratolinets. Lidia, gràcies per ser la nostra enfermera particular i les teues extraccions de sang que tant m'han servit. Eva, gràcies per estar ahi i pels teus punts de vista tan encertats. Gràcies a totes també per la vostra participació en els meus estudis. Tampoc oblidar-me de les meues bioquímiques, Teresa, Claudia, Rus i Minerva, i biòloga Tamara, sense vosaltres l'etapa universitària no havera sigut la mateixa. En especial vosaltres, Teresa i Tamara, vos aprecie moltíssim i encara que estigam repartides pel món, sempre ens tindrem les unes a les altres, excusa per a viatjar.

Per últim, a tu Alberto, gràcies per entrar en la meua vida. M'has tornat el somriure a la cara i m'has fet vore les coses des d'altre punt de vista. La nostra Wi-Fi no la comparteixen molts. Sempre estàs disposat a ajudar-me en el que faja falta, sempre tens una mostra de carinyo i de mimo cap a mi, sempre estàs pendent de mi i saps quan me passa algo o estic estressada. Gràcies per la teua ajuda i comprensió. Gràcies per ser com eres, t'estime.

Índex general

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. ASPECTES GENERALS DE LES GASTROENTERITIS VÍRIQUES.....	1
1.2. DESCRIPCIÓ DELS PRINCIPALS VIRUS ENTÈRICS CAUSANTS DE GASTROENTERITIS VÍRIQUES AGUDES	3
1.2.1 Rotavirus	4
1.2.2 Calicivirus	7
1.2.2.1. Morfologia i propietats físico-químiques.....	7
1.2.2.2. Classificació dels calicivirus	10
1.2.2.3. Organització genòmica.....	15
1.2.2.4. El cicle replicatiu dels calicivirus	17
1.2.3. Adenovirus	19
1.2.4. Astrovirus	21
1.2.5. Altres virus causants de gastroenteritis	22
1.3. EL GÈNERE NOROVIRUS.....	24
1.3.1. Antecedents històrics	24
1.3.2. Classificació i organització genòmica.....	28
1.3.4. Morfologia del virió	32
1.3.5. Producció de VLPs i partícules P	36

1.3.6. Diversitat genètica.....	39
1.3.7. Nomenclatura dels NoV	40
1.3.8. Aspectes clínics de les infeccions per NoV	43
1.3.8.1. Simptomatologia	43
1.3.8.2. Transmissió	44
1.3.8.2.1. Brots transmesos per aliments	47
1.3.8.2.2. Brots transmesos per aigua	49
1.3.8.2.3. Brots transmesos de persona a persona	50
1.3.8.3. Patogènia	51
1.3.9. Epidemiologia	53
1.3.9.1. Situació a nivell europeu i a nivell mundial.....	55
1.3.9.2. Situació a Espanya	59
1.3.10. Immunitat	62
1.3.10.1. Resposta humoral.....	63
1.3.10.2. Resposta cel·lular.....	66
1.3.11. Susceptibilitat de l'hoste i factors genètics dels NoVs que influeixen en aquesta.....	67
1.3.11.1. Antígens del grup histosanguini i NoV	70
1.3.11.2. Epítops descrits en la proteïna de la càpside de NoV	78

1.3.12. Desenvolupament de vacunes	81
2. OBJECTIUS	89
3. MATERIAL I MÈTODES	93
3.1. LÍNIES CEL·LULARS	93
3.1.1. Congelació de cèl·lules Sf9 i Caco-2	94
3.1.2. Descongelació de cèl·lules	95
3.2. VIRUS.....	96
3.2.1. Baculovirus	96
3.2.2. Amplificació del virus.....	99
3.2.3. Producció de partícules pseudovíriques de norovirus (VLPs).....	100
3.2.4. Producció de partícules P de NoV	101
3.2.6. Electroforesi SDS-PAGE, tinció Coomassie i Western blot	105
3.2.7. Observació al microscopi electrònic	107
3.3. OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS MONOCLONALS (AcMo) FRONT A VLPs DE NoV GII.4.....	107
3.3.1. Immunitzacions	108
3.3.2. Recollida de les mostres.....	108
3.3.3. Determinació dels anticossos sèrics	109
3.3.4. Producció d'hibridomes	109

3.3.5. Selecció d'hibridomes productors d'AcMo anti-NoV per ELISA	113
3.3.6. Caracterització per Western blot i ELISA de la reactivitat dels AcMo	113
3.3.7. Anàlisi de les seqüències d'aminoàcids de les diferents variants de GII.4.....	115
3.4. MOSTRES CLÍNIQUES	115
3.4.1. Mostres de femtes	115
3.4.2. Mostres de saliva.....	115
3.4.3. Mostres de sang i de sèrum	116
3.5. DETERMINACIÓ DEL GENOTIP DE NOV	117
3.6. DETERMINACIÓ DEL GENOTIP SECRETOR (GEN <i>FUT2</i>)	119
3.7. DETERMINACIÓ DEL GRUP SANGUINI ABO	121
3.8. ENZIMOIMMUNOASSAIGS (ELISA)	122
3.8.1. Determinació d'antígens Lewis.....	122
3.8.2. “ <i>Binding</i> ” de VLPs a saliva.....	123
3.8.3. “ <i>Binding</i> ” de VLPs i partícules P a mucina gástrica porcina (PGM)	124
3.8.4. Detecció d'anticossos IgA específics de NoV en mostres de saliva	125
3.8.5. Detecció d'anticossos IgG específics de NoV en mostres de sèrums	126

3.8.6. Assaigs de bloqueig.....	127
3.9. IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTA (IFI).....	130
3.9.1. Titulació de baculovirus i de l'expressió de NoV	130
3.9.2. Assaigs de “ <i>binding</i> ” de VLPs i partícules P a cèl·lules Caco-2	132
3.9.3. Expressió d'antígens HBGA en la superfície de cèl·lules Caco-2	133
3.9.4. Assaigs de bloqueig del “ <i>binding</i> ” a cèl·lules Caco-2	134
3.10. DETERMINACIÓ DE L'EPÍTOP RECONEGUT PER L'AcMo 3C3G3 MITJANÇANT LA TÈCNICA DE “ <i>PHAGE DISPLAY</i> ”	135
3.10.1. “ <i>Panning</i> ” de l'AcMo 3C3G3 directament a la placa de microtitulació de 96 pouets	137
3.10.2. Titulació del fag	142
3.10.3. Amplificació de les calves per a seqüenciar	144
3.10.4. Purificació de l'ADN del fag	145
3.10.5. Seqüenciació de l'ADN del fag i anàlisi de les seqüències	146
3.10.6. Programes de modelatge de proteïnes	148
3.11. ANÀLISI ESTADÍSTIC	149
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	155

4.1. ESTUDI DE L'ANTIGENICITAT DE LA PROTEÏNA DE LA CÀPSIDE VP1 DE NOROVIRUS HUMANS AMB ANTICOSSOS MONOCLONALS	155
4.1.1. Producció i amplificació de baculovirus recombinants que expressen la proteïna VP1 de la càpside de NoV	156
4.1.2. Producció i purificació de VLPs i partícules P de NoV..	157
4.1.3. Producció d'AcMo i d'un antiserum front a VLPs de NoV	162
4.1.4. Caracterització dels AcMo i de l'antisèrum per ELISA i WB	164
4.1.5. Determinació de l'epítot reconegut per l'AcMo 3C3G3 mitjançant " <i>phage display</i> "	167
4.1.6. Evolució i anàlisi de la variació aminoacídica en el subdomini P2 de la proteïna VP1 de NoV de diferents variants	169
4.2. LES VLPs I PARTÍCULES P DE NoV HUMANS DIFEREIXEN EN LA SEUA CAPACITAT D'UNIÓ A SALIVA I A CÈL·LULES INTESTINALS CACO-2, PERÒ CONTENEN EPÍTOPS ESPECÍFICS DE VARIANT	183
4.2.1. Distribució dels antígens Lewis, estat secretor i grup sanguini ABO entre els voluntaris analitzats.	183
4.2.2. Unió de VLPs de NoV a saliva: diferents genotips i genogrupos mostren diferents patrons d'unió determinats pels HBGAs	187
4.2.3. La unió de les VLPs de NoV a saliva és inhibida mitjançant preincubació amb els AcMo específics anti-antígens Lewis humans i els AcMo anti-NoV	189

4.2.4. Les VLPs de NoV, però no les partícules P, s'uneixen a mucina gàstrica porcina (PGM)	191
4.2.5. Totes les VLPs de NoV GII.4 analitzades, però no les partícules P, s'uneixen a cèl·lules Caco-2 diferenciades (D-Caco-2)	192
4.2.6. Els AcMo anti-Nov també bloquegen la unió de les VLPs a cèl·lules D-Caco-2	193
4.2.7. Diferents mostres de saliva i la PGM són capaces de reduir la unió de les VLPs a cèl·lules D-Caco-2	195
4.2.8. L'anàlisi de la diversitat dels HBGAs sobre la superfície de cèl·lules D-Caco-2 revela una alta expressió d'antígens H2, Le ^y i Le ^x	196
4.2.8. Les VLPs de NoV s'uneixen a cèl·lules D-Caco-2 independentment de l'expressió dels HBGAs.....	197
4.3. SEROPREVALENÇA D'ANTICOSSOS ESPECÍFICS ANTI- NoV GII.4 EN VALÈNCIA	211
4.3.1. Producció del domini P de la proteïna de la càpside de NoV GII.4-2007	211
4.3.2. Detecció d'anticossos anti-NoV GII.4, utilitzant VLPs i el domini P, mitjançant EIA.....	212
4.3.3. Prevalença d'anticossos IgG contra NoV associada a l'edat	213
4.3.4. Bloqueig de la unió de NoV a saliva.....	215
4.4. DIFERENT SUSCEPTIBILITAT A LES INFECCIONS PER NOROVIRUS SEGONS ELS PATRONS D'HBGAs ESPECÍFICS MITJANÇANT L'ESTUDI D'UN BROT NATURAL DE GEA. 225	

4.4.1. El brot de GEA va ser causat per la variant GII.4-2010 de NoV	226
4.4.2. Els individus no secretors (sese) no presentaren símptomes davant la infecció per NoV GII.4-2010.....	226
4.4.3 Els nivells d'anticossos IgA, tant en mostres de saliva com de sèrum, en individus secretors i no secretors, no mostren diferències significatives.	227
4.4.4. Titulació dels sèrums convalescents del brot de GEA als 14 dies i a l'any post-infecció	229
4.4.5. Bloqueig de la unió de les VLPs i partícules P a saliva mitjançant els sèrums convalescents	231
5. CONCLUSIONS	243
6. CONCLUSIONS	249
7. BIBLIOGRAFIA	255

Llistat de taules

Introducció

Taula 1. Estructura taxonòmica dels Calicivirus. 11

Taula 2. Funcions de les proteïnes madures de NoVs. 31

Taula 3. Conversió dels noms de les variants de NoV GII.4 42

Taula 4. Conversió dels noms del genotip segons l'ORF1. 42

Taula 5. Nombre de brots i casos esporàdics de NoV per país i per any (Adaptat de Van Beek et al., 2013). 57

Taula 6. Resum dels patrons d'unió als HBGAs de diferents genotips de NoV basats en assaigs de binding a saliva o oligosacàrids sintètics (adaptat de Shirato, 2011). 77

Material i mètodes

Taula 7. Quantitats necessàries de reactius per a la RT-PCR de NoV. 118

Taula 8. Quantitats necessàries de reactius per a una reacció d'amplificació del gen de la càpside de NoV. 119

Taula 9. Seqüència dels oligonucleòtids sintètics utilitzats per a l'amplificació del gen secretor humà *FUT2*. 120

Taula 10. Quantitats necessàries de reactius per a una reacció d'amplificació del gen *FUT2* per PCR. 121

Taula 11. Quantitats necessàries de reactius per a la digestió dels fragments amplificats del gen *FUT2*. 122

Taula 12. Llistat dels anticossos i les corresponents dilucions necessàries per a la titulació de baculovirus i de norovirus mitjançant IFI. 132

Taula 13. Quantitats de reactius i condicions necessàries per a la reacció de PCR de marcatge de la BigDye..... 147

Resultats

Taula 14. Resum dels pèptids aïllats reconeguts per l'AcMo 3C3G3. 168

Taula 15. Resum de la variació dels aminoàcids en els epítops A, D i E en el període comprès entre 1999 i 2012. 171

Taula 16. Llistat de les 22 mostres de saliva on s'especifica el sexe, l'edat, el tipus de grup sanguini ABO, l'estat secretor en base a l'anàlisi del gen FUT2 i el fenotip Lewis. Les mostres dels individus implicats en el brot de GEA estan marcats amb un requadre morat. 185

Taula 17. Prevalença associada a l'edat d'anticossos IgG contra NoV GII.4. Els títols d'anticossos específics del domini P-GII.4-2007) es van determinar mitjançant ELISA..... 214

Taula 18. Resultats obtinguts amb les mostres recollides després d'un brot per NoV GII.4 234

Llistat de figures

Introducció

Figura 1.1. Fragments genòmics i estructura de la càpside de rotavirus..... 6

Figura 1.2. Classificació de la família Caliciviridae..... 8

Figura 1.3. Morfologia i estructura dels SVs 12

Figura 1.4. Morfologia i estructura del virus RHD 13

Figura 1.5. Morfologia i estructura del FCV..... 14

Figura 1.6. Morfologia i estructura dels Nebovirus i Recovirus..... 15

Figura 1.7. Genoma lineal dels calivirus format per una molécula d'ARN de simple cadena i de sentit positiu de 7,3 a 8,3 kb..... 16

Figura 1.8. Cicle de replicació dels calicivirus 18

Figura 1.9. Estructura d'un adenovirus on es representen els diferents components de la càpside i del core. 20

Figura 1.10. Model de l'estructura de la càpside d'astrovirus T = 3 a 15 Å de resolució..... 22

Figura 1.11. Estructura d'un virió de la subfamília *Torovirinae* 23

Figura 1.12. Estructura d'un virió de coronavirus 23

Figura 1.13. Estructura dels picobirnavirus. 24

Figura 1.14. Classificació dels norovirus en 5 genogrups (GI-V) i 32 genotips basats en la diversitat de seqüència de la proteïna de la càpside VP1 completa.. 29

Figura 1.15. Organització genòmica dels NoVs	33
Figura 1.16. Estructura de la càpside de NoVs.	35
Figura 1.17. Model de formació de les partícules P.....	37
Figura 1.18. Comparació de l'estructura entre les VLPs i les partícules P.	39
Figura 1.19. Principals vies de transmissió desl NoVs	45
Figura 1.20. Principals llocs d'infeccions degudes a NoV segons dades del “ <i>Centers for Disease Control</i> ”	54
Figura 1.21. Distribució mensual de casos de NoV GI, GII i GII diferents a GII.P4 o GII.Pe al llarg del període d'estudi (2010-2013) basada en les seqüències de la polimerasa	58
Figura 1.22. Distribució mensual per anys dels casos de NoV de la variant GII.P4 basats en les seqüències de la polimerasa.	58
Figura 1.23. Distribució mensual per anys dels casos de NoV de la variant GII.P4 basats en les seqüències de la càpside.	59
Figura 1.24. Diagrama de les estructures dels carbohidrats tipus 1 i 2.. ..	71
Figura 1.25. Unió de diferents rVLPs de NoV a 14 mostres de saliva de persones amb diferents tipus d'HBGAs	74
Figura 1.26. Model de la interacció NoV-HBGA	76
Figura 1.27. Posicions clau d'aminoàcids en el subdomini P2 que es preveu que participen en les interaccions virus-hoste, basades en les dades de 5 estudis.....	80

Material i mètodes

Figura 3.1. Diagrama del sistema d'expressió Bac-to-Bac de Invitrogen per a la producció dels diferents baculovirus recombinants. 96

Figura 3.2. Pauta d'administració via intraperitoneal de les dosis de VLPs GII.4 i extracció de sèrums a ratolins Balb/c femella d'entre 6 i 10 setmanes d'edat. 108

Figura 3.3. Esquema del patró de bandes que s'obté després de la digestió enzimàtica dels fragments de PCR amb Ava II. 120

Figura 3.4. Esquema de l'ELISA de determinació dels antígens Lewis en mostres de saliva. 123

Figura 3.5. Esquema de l'ELISA de determinació del “*binding*” de les diferents VLPs a saliva. 125

Figura 3.6. Esquema de l'ELISA de determinació d'anticossos tipus IgA específics de NoV en saliva. 126

Figura 3.7. Esquema de l'ELISA de titulació d'anticossos sèrics tipus IgG específics de NoV en mostres de sèrums humans. 127

Figura 3.8. Esquema de l'assaig de bloqueig de les VLPs a mostres de saliva mitjançant els diferents AcMo anti-antígens Le (Le^a , Le^b , Le^x i Le^y). 128

Figura 3.9. Esquema de l'assaig de bloqueig de les VLPs amb els AcMo anti-NoV, cada variant de VLP amb el seu AcMo homòleg, a mostres de saliva. 129

Figura 3.10. A) Esquema d'un exemple de “*panning*” amb una llibreria de pentapèptids presentats pel fag M13. B) Llibreria Ph.D.-C7C utilitzada on es mostra el segment aleatori i la seqüència d'unió. 136

Resultats

- Figura 4.1.** Assaig d'immunofluorescència indirecta en cèl·lules Sf9 per a comprovar l'expressió dels baculovirus recombinants 156
- Figura 4.2.** Anàlisi de l'expressió de la proteïna de la càpside de NoV GII.4 158
- Figura 4.3.** Cromatogrames de purificació de diferents partícules P en columnes de Ni-NTA, utilitzant l'equip de FPLC Äkta Prime 160
- Figura 4.4.** Anàlisi de les partícules P purificades mitjançant electroforesis SDS-PAGE i microscòpia electrònica..... 161
- Figura 4.5.** a) Assaig d'ELISA per a determinar la resposta immunitària després de les immunitzacions. b) Anàlisi de diferents sobrenadants d'hibridomes mitjançant ELISA 163
- Figura. 4.6.** Caracterització dels patrons de reconeixement dels anticossos anti-NoV, tant dels AcMo com del sèrum de conill del HPA, per ELISA. 165
- Figura. 4.7.** Alineació de les seqüències d'aminoàcids de les diferents variants de VLPs i partícules P de GII.4 166
- Figura. 4.8.** Caracterització de l'AcMo 3C3G3 mitjançant Western blot..... 167
- Figura 4.9.** Model del domini P de la proteïna VP1 de norovirus on es mostren els residus aminoacídics reconeguts pel monoclonal 3C3G3 anti-NoV GII.4-2006b, identificats mitjançant la tècnica de “phage display” 170
- Figura 4.10.** Estructura cristal·lina del domini P de la variant GII.4-VA387 de norovirus i l'evolució temporal de les substitucions aminoacídiques en les diferents variants emergents..... 172

Figura 4.11. Fenotipat de les 22 mostres de saliva de voluntaris espanyols per ELISA.....	186
Figura. 4.12. Patrons d'unió de les 4 variants de VLPs de NoV analitzades a les mostres de saliva de 22 voluntaris espanyols l'eix X les mostres de saliva dels grups sanguinis A, B i O secretors i les salives de no secretors.	188
Figura 4.13. Percentatge de bloqueig de la unió de les diferents variants de VLPs de NoV a mostres de saliva d'un individu secretor i no secretor, respectivament	190
Figura. 4.14. Bloqueig de la unió de les VLPs amb AcMo anti-NoV a mostres de saliva.	192
Figura 4.15. Unió de partícules P i VLPs a mucina gàstrica porcina (PGM).....	193
Figura 4.16. Anàlisi mitjançant microscòpia de fluorescència de la unió de VLPs de NoV de la variant GII.4-2004 (GII.4-v2) a cèl·lules diferenciades Caco-2	194
Figura 4.17. Bloqueig de la unió de VLPs de NoV a cèl·lules D-Caco-2 per AcMo anti-NoV	194
Figura 4.18. Bloqueig amb PGM i mostres de saliva	195
Figura 4.19. Superfície de la monocapa cel·lular Caco-2	197
Figura 4.20. Anàlisi de la unió de VLPs de NoV a cèl·lules D-Caco-2 en base a l'expressió dels HBGAs en la seua superfície.....	198
Figura 4.21. Comparació dels títols mitjans geomètrics d'anticossos anti-NoV GII.4 front a les VLPs i el domini P en 30 mostres de sèrum representatives.....	213

Figura 4.22. Distribució segons l'edat dels títols d'anticossos IgG contra el polipèptid P2 de la proteïna de la càpsida de NoV GII.4 en sèrums humans recollits des de 2009 fins 2010.	215
Figura 4.23. Nivells específics d'anticossos tipus IgA contra 4 variants diferents de VLPs de NoV (GI.1, GII.4-2006b, GII.4-v0 i GII.4-v2) presents en mostres de saliva de 9 individus secretors i 2 no secretors, mitjançant assaigs d'ELISA.....	228
Figura 4.24. Títol d'anticossos IgG anti-NoV d'un brot de GEA entre membres d'una mateixa família (n=5)	231
Figura 4.25. Bloqueig de la unió de les VLPs GII.4-2006b a saliva de secretor mitjançant sèrums convalescents (14 dies post-infecció) d'un brot per NoV.....	233

Abreviatures

°C	Graus centígrads
AcMo	Anticòs/ossos monoclonal/s
ADN	Àcid desoxirribonucleic
ADNc	ADN complementari
AdV	Adenovirus
Asn	Asparagina
Arg	Arginina
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
BeV	Becovirus
BM	Medi d'unió (<i>binding medium</i>)
Bo	Boví
BSA	Albúmina sèrica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca	Caní
CDC	Centres de control de malalties (<i>Centers for disease control</i>)
cm²	Centímetre quadrat
col.	Col·laboradors
COPII	Proteïna que recobreix les vesícules per al transport des del reticle endoplàsmic fins l'aparell de Golgi (<i>coat protein</i>)
D-Caco-2	Cèl·lules Caco-2 diferenciades
DEPC	Dietil pirocarbonat
DMEM	Medi <i>Eagle</i> modificat per Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfòxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAdV	Adenovirus entèrics
EBHSV	Virus del síndrome de la llebre parda europea (<i>european brown hare syndrome virus</i>)
EDTA	Àcid etilen-diamino-tetraacètic

Abreviatures

ELISA	Assaig d'immunoanàlisi acoplat a enzima (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FBVE	Virus transmesos per aliments a Europa (<i>Foodborne Viruses in Europe</i>)
FCV	Calicivirus feli (<i>feline calicivirus</i>)
FITC	Conjugat amb isiotiocianat de fluoresceïna (<i>fluorescein isothiocyanate conjugate</i>)
FPLC	Cromatografia líquida ràpida de proteïnes (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
Fuc	L-fucosa
FUT	Fucosil transferasa
Gal	D-galactosa
GEA	Gastroenteritis aguda
GlcNAc	N-acetilgalactosamina
Gln	Glutamina
Glu	Àcid glutàmic
Gly	Glicina
h	Hores
HAT	Mescla d'hipoxantina, aminopterina i timidina (<i>hypoxanthine-aminopterin-thymidine</i>)
HBGAs	Antígens del grup histosanguini (<i>Histo-blood group antigens</i>)
HRP	Enzima peroxidasa de rave (<i>horseradish peroxidase</i>)
HT	Suplement líquid d'una mescla d'hipoxantina sòdica i timidina (<i>hypoxanthine-thymidine</i>)
hu	Humà
HV	Hawaii virus
IFI	Immunofluorescència indirecta
IFN	Interferó
IgA	Immunoglobulina de classe A
IgG	Immunoglobulina de classe G
IgM	Immunoglobulina de classe M

IL	Interleuquina
Ile	Isoleucina
Kb	Kilobase
KDa	KiloDaltons
LaV	Lagovirus
Le	Lewis
M	Molar
ME	Microscòpia electrònica
MEM	Medi mínim essencial (<i>minimum essential medium</i>)
MIE	Microscòpia immunoelectrònica
µg	Microgram
mg	Mil·ligram
min	Minuts
µl	Microlitre
ml	Mil·lilitre
µM	Micromolar
mM	Milimolar
MNV	NoV murí
m.o.i	Multiplicitat d'infecció (<i>multiplicity of infection</i>)
Mu	Murí
MW	Pes molecular (<i>molecular weight</i>)
NeV	Nebovirus
Ni-NTA	Columnes de níquel
nm	Nanòmetre
NoV	Norovirus
NSP o nsp	Proteïna viral no estructural (<i>non-structural protein</i>)
nt	Nucleòtid
NTPasa	Nucleòsid trifosfatasa
NV	Virus Norwalk (<i>Norwalk virus</i>)
o/n	Incubació entre 14-16 hores (<i>overnight</i>)
OD	Densitat òptica (<i>optical density</i>)

Abreviatures

OPD	o-fenilenediamina
ORF	Pauta oberta de lectura (<i>open reading frame</i>)
PBMCs	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Tampó fosfat salí (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	Tampó PBS amb Tween
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	Reacció en cadena de la polimerasa de polimorfismes de longitud dels fragments de restricció (<i>restriction fragments length polymorphisms</i>)
PDB	Banc de dades de proteïnes (<i>protein data bank</i>)
PEG	Polietilenglicol
pfu	Unitats formadores de calves
PGM	Mucina gàstrica porcina (<i>porcine gastric mucin</i>)
Po	Porcí
Pol	Polimerasa
poli(A)	Cola de poliadenines
Pro	Prolina
PVDF	Fluorur de polivinilidè
RdRp	ARN dependent ARN polimerasa
Ref.	Referència
ReV	Recovirus
RHDV	Virus de l'enfermetat hemorràgica del conill (<i>Rabbit haemorrhagic disease virus</i>)
rpm	Revolucions per minut
RT	Transcripció inversa o retrotranscripció (<i>reverse transcriptase</i>)
RV	Rotavirus
s/s	Sense sèrum
SaV	Sapovirus
SBF	Sèrum boví fetal
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida amb dodecil-sulfat sòdic

Seg.	Segons
SeSe	Secretor homozigot
Sese	Secretor heterozigot
sese	No secretor
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SMV	<i>Snow Mountain virus</i>
SPR	Ressonància plasmònica de superfície (<i>surface Plasmon resonance</i>)
SRSV	Virus xicotets i rodons (<i>small round structured virus</i>)
T^a	Temperatura
TBS	Tampó Tris salí (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	Tampó TBS amb Tween
Th	Limfòcit T cooperador (<i>T helper lymphocyte</i>)
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosi tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TV	Virus Tulane
Tyr	Tirosina
uff	Unitats formadores de focus
UI	Unitats internacionals
UTR	Regió no traduïda (<i>untranslated region</i>)
UV	Ultravioleta
VeV	Vesivirus
VLP	Partícula pseudovírica (<i>virus-like particle</i>)
VP	Proteïna viral (<i>viral protein</i>)
VPg	Proteïna unida al genoma viral (<i>viral protein genome-linked</i>)
WB	Western blot
wt	Silvestre (<i>wild type</i>)

SUMMARY

Summary

Noroviruses (NoVs) are the main cause of sporadic cases and outbreaks of acute gastroenteritis (Tam et al., 2012; Gastanaduy et al., 2013) and are globally associated with a large burden of disease (Patel et al., 2008). NoVs are a highly diverse group of viruses, although over the past two decades most reported NoV outbreaks and epidemics have been caused by NoV GII.4 genotype. Phylogenetic analyses of the GII.4 strains circulating in the last 20 years have shown that this genotype can be divided into distinct variants, which peak and wane over time in a similar pattern to that described for influenza viruses (Buesa et al., 2008; Siebenga et al., 2009; Koelle et al., 2006). In recent years different susceptibilities to NoV infection, depending on their HBGA phenotypes have been reported (Hutson et al., 2004).

NoVs belong to the *Caliciviridae* family and are classified in 5 genogroups (GI-GV), although genogroup I (GI) and GII cause most human NoV infections. The genome is organized in three open reading frames (ORFs): ORF1, ORF2 and ORF3. The VP1, encoded by ORF2, is the major capsid protein, which is further organized into the N-terminal (N), the shell (S), and the protruding (P) domains. The P domain can be further divided into two subdomains: P1 and P2 (Prasad et al., 1999). The P1 subdomain forms the anchoring portion of the P dimer connecting it to the S domain, while the P2 subdomain is exposed on the surface of the capsid protein and is the most variable region of the virus. The main epitopes for immunorecognition and the

histo-blood group antigen (HBGA) binding domains reside within this P2 subdomain. The emergence and accumulation of mutations along the P2 subdomain is the main driver of evolution for GII.4 strains, and results in new epidemic strains with altered antigenicity and HBGA binding properties (Allen et al., 2008, 2009; Shanker et al., 2011; Debbink et al., 2012). The cellular receptors that lead to norovirus infections have not been completely characterized yet, but it has been proposed that NoVs are likely to attach to either HBGA expressed on the gastroduodenal epithelial cells of secretor-positive individuals (Marionneau et al., 2002). However, a recent study has shown that NoV could bind to enterocytes independently of HBGAs (Murakami et al., 2013). To date no cell culture system has shown evidence of supporting norovirus propagation, Caco-2 cells, originally derived from human colorectal carcinoma expressing carbohydrates of the histo-blood group family on their surface, allow significant attachment of norovirus VLPs but only when these cells are differentiated.

The C-terminal of the VP1 (P domain) of NoVs has the ability to auto-assemble into subviral particles, termed P particles (Tan & Jiang, 2005). Previous work showed that P particles retain the capacity to bind to saliva samples and to synthetic HBGA and that are also immunogenic, making them a valuable tool for the study of viral attachment and for the development of vaccines (Tan et al., 2008, 2011).

In this study, the baculovirus expression system in insect cells was used to produce and purify the biologically active form of NoV

VLPs from GII.4-1999 (GII.4-v0), GII.4-Hunter_2004 (GII.4-v2) and GII.4-Den Haag_2006b (GII.4-2006b) NoV strains. On the other hand, P particles (P-GI.1, P-GII.4-VA387, and P-GII.9) and the P domain (P-GII.4-2007_Apeldoorn) were produced in bacteria (*E. coli*) as recombinant proteins tagged with histidines (6xHis), and purified by FPLC in Ni-NTA columns. After the immunization of mice with the different purified NoV VLPs, the mAbs obtained by limiting dilution strongly recognized the P domain of the homologous variant, being indicative of the immunodominance of this region and corroborating the importance of the epitopes previously described in this domain (Zakikhany et al., 2012). Moreover, the av0 mAb also recognized the homologous P particle (P-GII.4-VA387 with a 97'88% of identity), indicating that P particles are antigenically comparable with the entire VLPs.

Polyclonal antiserum were obtained from VLPs mix (GII.4-v0, GII.4-v2 and GII.3) immunized rabbit and recognized all of the variants used, both VLPs and P particles, with the exception of the P particle derived from a GI.1 strain. Therefore P particles contain variant-specific epitopes within genotypes but not between genogroups.

Another objective of this thesis was to determine the epitope recognized by the anti-2006b mAb (3C3G3) which was performed by phage display technique. This mAb recognizes an epitope formed by 11 residues located into the P2 subdomain of NoV VP1 capsid protein,

Summary

close to the blockade epitopes described. Thus being able to conduct inhibitory studies to identify biological activity.

The binding properties to D-Caco-2 cells of virus-like particles (VLPs) of the different variants of NoV GII.4 and of P particles have been assessed by immunofluorescence, as well as inhibition of binding by: a) saliva; b) porcine gastric mucin (PGM); c) the monoclonal antibodies (mAbs) produced against NoV VLPs; and d) anti-Lewis antigens (Le^a, Le^b, Le^x and Le^y) or anti-H antigens (H1 and H2). These assays were performed in order to further investigate the interactions between NoVs and the cellular surface. The results were also compared with binding and blocking salivary assays by ELISA.

All VLPs, but not P particles in the same conditions, were able to bind to saliva and D-Caco-2 cells. The different mAbs anti-NoV used blocked the VLP binding to saliva as well as PGM and D-Caco-2 cells, in a dose-dependent manner. But one interesting result when comparing blocking assays in both saliva and D-Caco-2 cells was that while in salivary assays the anti-Lewis or anti-H antigens used blocked the VLP binding, the HBGA blocking on the surface of D-Caco-2 cells did not affect NoV VLP binding. Furthermore, no co-localisation of HBGA and NoV VLPs was observed by immunofluorescence. These results suggest that binding to Caco-2 cells could be mediated by other receptors different from HBGAs, in addition to these.

It was also studied the IgG antibody prevalence against NoV GII.4 in a Spanish population using the recombinant P domain of the NoV GII.4-Apeldoorn_2007 variant as the coating antigen in ELISA. Baculovirus-expressed virus-like particles (VLPs) of NoV GII.4-Den Haag_2006b variant were also used as antigen to compare seroreactivity. Of the 434 serum specimens analyzed, 429 (98.6 %) had antibodies against the P domain. The comparison of reactivities of 30 serum samples to the NoV GII.4 P polypeptide and VLP showed reproducible results with a correlation coefficient of $r = 0.607$. Titers of antibodies to the P domain increased gradually and significantly with age, reaching the highest levels at the age group of 41-50 years. These results confirm the high prevalence of NoV GII.4 infections in our community from early childhood.

Finally, it is also presented the data on the immunogenicity of the NoV in natural NoV infections in humans. The results showed that the NoV elicits a humoral immune response in people that had been naturally infected by NoV. The IgG serical antibodies developed against the NoV in individuals suffering acute NoV gastroenteritis, present cross-reactivity against more than one genotype, but not against different genogroups, and are capable of blocking the NoV VLPs binding to saliva.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. ASPECTES GENERALS DE LES GASTROENTERITIS VÍRIQUES

Les gastroenteritis, tant les epidèmiques com les esporàdiques, són una causa comú de morbiditat i mortalitat entre persones de qualsevol edat, estimant-se més d'1'8 milions de morts mundials en xiquets menors de 5 anys (Bryce et al., 2005). Les causes d'aquesta enfermetat inclouen una gran varietat de bacteries, paràsits i virus; i en molts casos la contribució relativa d'aquests agents es desconeguda. Comprensiblement, quan una persona presenta un quadre clínic de gastroenteritis no s'analitzen totes les etiologies i inclús, encara que es fera, el 40-50% dels casos permanexerien amb una etiologia desconeguda.

Les infeccions virals en humans es caracteritzen per la diversitat de les respostes de l'hoste, el grau de progressió i els resultats de l'enfermetat. Les respostes depenen no sols dels factors virals, sinó també dels components heredats, afectant la susceptibilitat de l'hoste. Aquests components heredats, poden formar part de la resposta immunitària o dels polimorfismes genètics del receptor. El primer pas en el cicle replicatiu d'un virus és la unió a un receptor específic de la superfície cel·lular, a través del qual el virus entra a la cèl·lula hoste. Aquests receptors juguen un paper molt important en la interacció virus-hoste, en el tropisme tissular i poden, si el gen del receptor presenta polimorfismes, alterar no sols el patró de l'enfermetat, sinó

també la susceptibilitat a alguns patògens en particular, com per exemple, els norovirus (NoVs).

Els NoVs foren els primers agents vírics associats a gastroenteritis (Kapikian et al., 1972) i es consideren la causa més freqüent dels brots de gastroenteritis vírica en persones de qualsevol edat en el món sencer. Segons un estudi realitzat per Patel i col. els NoVs representen el 12% dels casos de gastroenteritis severa en nens <5 anys d'edat i el 12% dels casos de diarrea lleu i moderada entre persones de totes les edats (Patel et al., 2008). A més, constitueixen el primer agent patògen viral responsable d'epidèmies vinculades als aliments i a l'aigua, segons la CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2009), provocant importants despeses econòmiques pels costos d'atenció sanitària, absentisme laboral, etc (Fankhauser et al., 1998). Una estimació recent indica que cada any causen 64.000 episodis de diarrea que requereixen hospitalització i 900.000 visites a la clínica entre els nens dels països industrialitzats, i fins a 200.000 morts de nens <5 anys d'edat en els països en vies de desenvolupament (Patel et al., 2008).

Com s'ha comentat anteriorment, persones de qualsevol edat són susceptibles a la infecció per NoV i, a més, les infeccions secundàries són molt comuns (Green et al., 2007; Johnson et al., 1990; Parrino et al., 1977). Es pot dir que principalment afecten a persones adultes, encara que no es pot menysprear la seua prevalència en xiquets, ja que s'ha descrit que els NoVs són la segon causa, per darrere dels rotavirus (RVs), en provocar gastroenteritis durant la infància (Sakai

et al., 2001; Glass et al., 2009). Considerant l'èxit de la vacunació en xiquets contra les infeccions per RVs (vacuna Rotarix i Rotateq), els NoVs podrien arribar a ser també la causa més comú de diarrea infantil en un futur previsible. De fet, en els últims anys ja s'ha observat un augment de les infeccions per NoVs en menors (Bucardo et al., 2011; Williams et al., 2012; Koo et al., 2013; Payne et al., 2013).

Els principals símptomes que presenten les persones afectades són vòmits, diarrea, nausees, dolors abdominals, febra i malestar general.

1.2. DESCRIPCIÓ DELS PRINCIPALS VIRUS ENTÈRICS CAUSANTS DE GASTROENTERITIS VÍRIQUES AGUDES

Des de 1940, se sospitava que els virus podrien ser importants causes de gastroenteritis, ja que l'etiologia permaneixia desconeguda en la majoria de casos. Però en 1972 Kapikian i els seus col·laboradors foren els primers en identificar un virus (virus Norwalk) en femtes després d'un brot de diarrea (Kapikian et al., 1972), com una causa de gastroenteritis. Un any després, Bishop i els seus col·laboradors observaren la presència de RV en la mucosa duodenal (Bishop et al., 1973) i en femtes (Flewett et al., 1973) de xiquets amb gastroenteritis i, en 1975, astrovirus (Madeley & Cosgrove, 1975) i adenovirus entèrics foren identificats en les femtes de xiquets amb diarrea aguda (Morris et al., 1975). Des de llavors, el nombre de virus associats amb gastroenteritis agudes ha augmentat de

forma constant. Així, coronavirus (Caul et al., 1975), torovirus (Beards et al., 1986), pestivirus (Yolken et al., 1989), kobuvirus (Yamashita et al., 1991) i picobirnavirus (Chandra, 1997), entre altres, que produeixen diarrea en animals, están emergint com a causes de gastroenteritis víriques en humans.

1.2.1 Rotavirus

Les infeccions per RV son la principal causa de gastroenteritis severa infantil (lactants i menors de 5 anys) arreu del món (Parashar et al., 2006), i suposen la tercera part de totes les admissions en hospitals relacionades amb diarrees (Parashar et al., 2006; Linhares et al., 2008; Tate & Parashar, 2011). S'estima que provoquen unes 453.000 morts per any, la majoria en països en vies de desenvolupament, sobretot en països de l'Àfrica sub-sahariana i del sud-est d'Àsia (Linhares 2008; Tate & Parashar, 2011). Aquestes morts es deuen principalment als pocs recursos dels què disposen aquests països, com l'accés a solucions de rehidratació i facilitats mèdiques, i per les condicions de salut general, com per exemple la malnutrició. Aquests virus també poden afectar a les persones adultes, ja que estan en continu contacte amb els xiquets, però els símptomes són molt menys greus i generalment són asimptomàtics.

Els RVs es transmeten per la via fecal-oral amb símptomes que generalment apareixen a les 24-48 hores després de la infecció. La majoria dels xiquets solen infectar-se, almenys una vegada, durant els primers tres anys de vida. Segons estudis epidemiològics el pic

d'incidència de diarrea per RV es troba entre els 6-24 mesos d'edat (CDC-ASIP 1999; Linhares et al., 2008).

La infecció pot ser asimptomàtica o arribar a ser greu, i els principals símptomes característics que presenta són vòmits, febra, diarrea líquida i deshidratació.

Els RVs pertanyen a la família *Reoviridae* i es tracta de virus de simetria icosaèdrica relativament grans, d'aproximadament 100 nm de diàmetre. Son virus d'ARN de doble cadena i el seu genoma codifica 11 segments. Cada segment genòmic codifica una proteïna, exceptuant el 11 que codifica dues proteïnes (Estes and Kapikian, 2007). D'aquestes 12 proteïnes, 6 son estructurals (VPs) i 6 no-estructurals (NSPs) (Estes & Cohen, 1989) (Fig. 1A). La càpside de RV està formada per tres capes de proteïnes concèntriques que engloben el genoma (Fig. 1B i C). Els virions complets s'anomenen partícules de tres capes (TLPs, Fig. 1B), les partícules que han perdut la capa externa, partícules de dos capes (DLPs, Fig. 1E) i no són infeccioses, i les partícules que no tenen cap de les dues capes externes s'anomenen partícules d'una capa (SLPs, Fig. 1D) o "cores".

Mentre que els anàlisis genòmics complets incloïen els 11 segments del genoma (Matthijnsens et al., 2011), les dues proteïnes que en conjunt constitueixen la capa exterior del virus (VP7 i VP4) s'han caracteritzat més ampliament, ja que són les inductores de la producció d'anticossos neutralitzants, fonamentals en la protecció immune davant infeccions per RV, i les que s'utilitzen per al sistema

Introducció

de classificació, definint els genotips G i P respectivament (Estes et al., 2007).

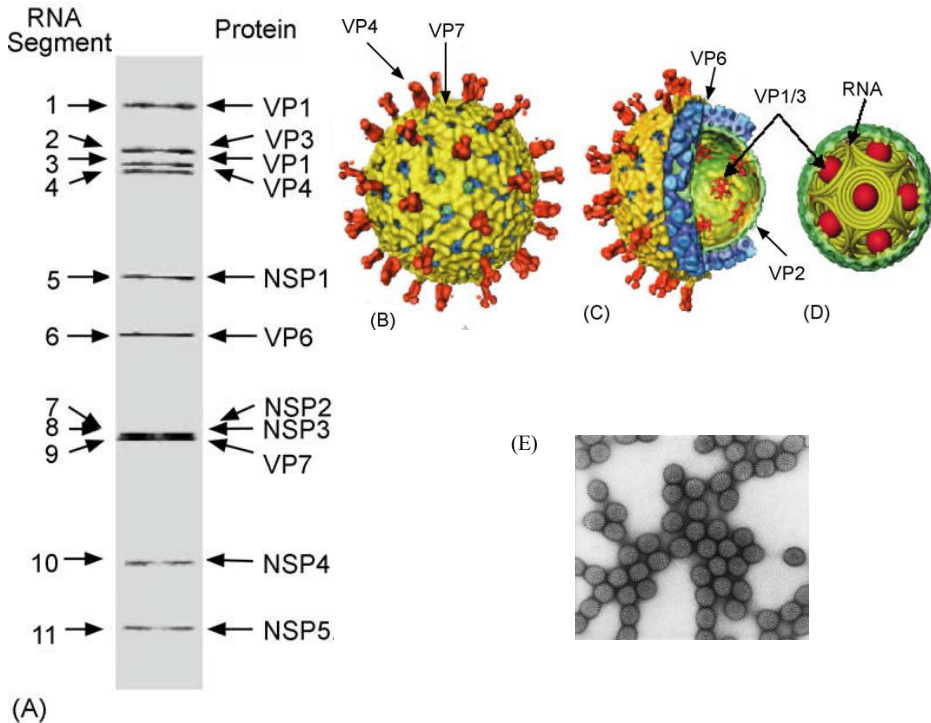


Figura 1.1. Fragments genòmics i estructura de la càpside de rotavirus. (A) Migració dels 11 segments genòmics en gel de poliacrilamida (PAGE). A l'esquerra s'indica el numero del segment i a la dreta la proteïna codificada per dit segment. (B) Estructura tridimensional de la partícula completa de tres capes. Les espícules corresponents a la proteïna VP4 són de color taronja i la capa externa de VP7 en groc. (C) Tall transversal de la TLP que mostra les capes internes de VP6 (blau) i de VP2 en verd, i els enzims transcripcionals (mostrats en roig) anclats a la capa de VP2 dels eixos quintuples. (D) Representació esquemàtica de l'organització del genoma de rotavirus. Els segments del genoma es representen com a espirals còniques invertides que rodegen els enzims de transcripció (els quals es mostren com a boles roges) dins de la capa VP2 en verd. (C i D) Model de Crio-EM de la reconstrucció de la transcripció d'una DLP. (Adaptat de Jayaram et al. 2004). (E) Micrografia de transmissió d'electrons de partícules intactes de rotavirus de doble coberta, on es pot observar l'halo distintiu de capsòmers irradiants (CDC/Dr. Erskine Palmer).

Fins la data, es distingeixen 27 genotips G i 35 genotips P (Matthijnssens et al., 2011), i s'han descrit almenys 73 combinacions de genotips G/P infectant humans (Matthijnssens et al., 2009), sent els més prevalents a nivell mundial G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] i en menor extensió el G12P[8] (Santos & Hoshino, 2005; Matthijnssens et al., 2009, 2010).

1.2.2 Calicivirus

La família *Caliciviridae* inclou cinc gèneres, *Norovirus*, *Sapovirus*, *Vesivirus*, *Lagovirus* i *Nebovirus* (King et al., 2012). Encara que el virus Tulane (TV), que infecta monos rhesus i va ser aïllat en 2008, ha sigut proposat com a nou gènere dins dels calicivirus, els *Recovirus* (Fig. 1.2) (Yu et al., 2013).

Aquesta família inclou virus que provoquen un gran espectre d'enfermetats en una àmplia varietat de mamífers, aus i animals marins. Aquest rang abarca des d'una gastroenteritis aguda en humans (norovirus i sapovirus) a una encefalitis letal en ratolins immunodeficients (norovirus murí), passant per una enfermetat hemorràgica en conills i una infecció respiratòria del tracte superior en gats (calicivirus felí). Encara que els calicivirus infecten tant a humans com a animals, fins el moment no s'ha descrit cap evidència significativa de reservoris zoonòtics (Rohayem et al., 2010).

1.2.2.1. Morfologia i propietats físico-químiques

Els calicivirus són xicotets virus redons d'entre 27 i 32 nm de diàmetre, inicialment anomenats “*small round structured viruses*”

Introducció

(SRSVs), ja que són uns del virus patogènics animals més xicotets. La seua superfície té una estructura en forma de copa i d'ahí el seu nom “calicivirus”, derivat de *calyx* que significa copa en llatí (Lambden et al., 1993; Green, 2007).

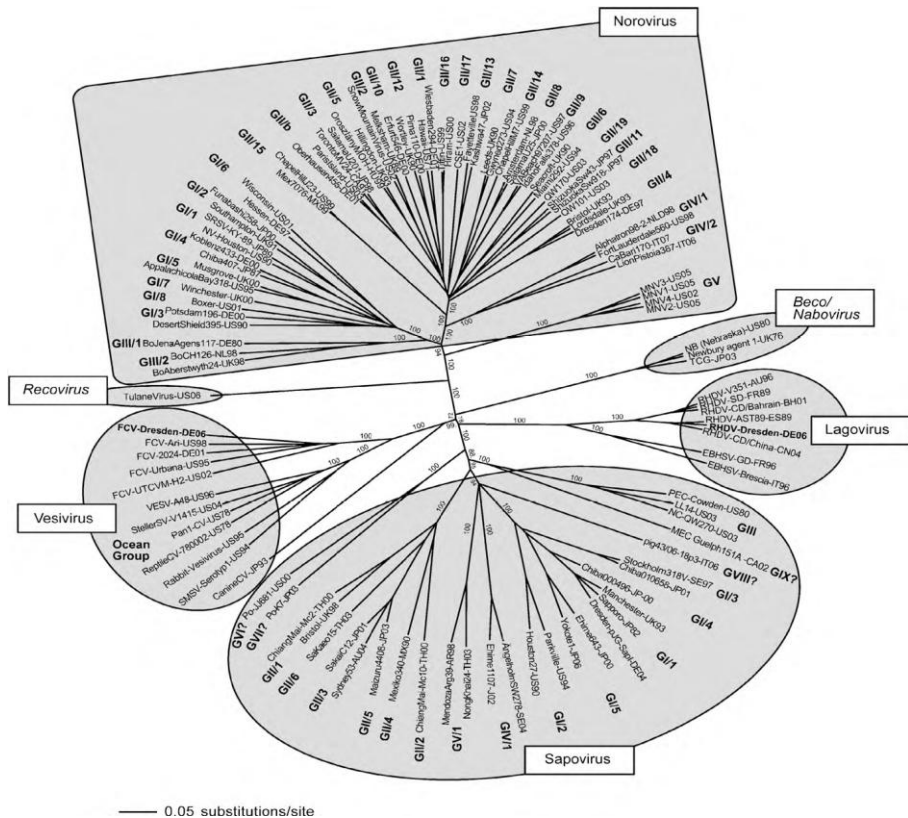


Figura 1.2. Classificació de la família Caliciviridae. Anàlisi filogenètic de les diferents soques descrites als diferents gèneres definits: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus* i els tentatius *Beco/Nabovirus* i *Recovirus*. L'aliniació de la seqüència completa de la càpsida s'ha realitzat amb el programa Clustal X i l'anàlisi filogenètic mitjançant el mètode “neighbour joining” utilitzant el PAUP. Les cepes no definides d'alguns genogrups de sapovirus (GVI, VII, VIII i IX) s'indiquen amb un interrogant (Adaptat de Rohayem et al., 2010).

La primera estructura analitzada va ser la d'un calicivirus de primats a l'any 1994 (Prasad et al., 1994a). A partir d'aquest moment, diverses estructures de partícules pseudovíriques (VLPs, de l'anglès "*virus-like particles*") i dels propis virions han anat publicant-se en diferents treballs. Alguns exemples són l'estructura cristal·logràfica de raigs X del virus recombinant Norwalk (rNV) (Prasad et al., 1999), del gènere *Norovirus*, un virus San Miguel natiu de lleó marí (SMSV) (Chen et al., 2006) i un virió de calicivirus felí (FCV) (Ossiboff et al., 2010), del gènere *Vesivirus*. Mitjançant microscòpia crio-electrònica (crio-EM) les estructures del virus recombinant Grimsby i Parkville (Chen et al., 2004), de l'enfermetat hemorràgica del conill (RHDV, tant VLPs com virions) (Hu et al., 2010), el virió del norovirus murí (MNV) (Katpally et al., 2008) i la VLP de norovirus del genogrup II genotip 10 (GII.10) (Hansman et al., 2012).

Totes les estructures descrites presenten una organització característica similar: 180 monòmers de la proteïna de la càpside (VP1) organitzades en 90 dímers, els quals formen una càpside de simetria icosaèdrica $T=3$ amb 32 buits o depressions al voltant dels eixos icosaèdrics 3 i 5. Aquestes estructures contenen dos dominis: el domini S (de l'anglès "*shell*") que està implicat en la formació de la càpside icosaèdrica, i el domini P (de l'anglès "*protruding*") que al mateix temps es subdivideïx en dos subdominis, P1 i P2, que emanen del domini S i formen les protuberàncies dimèriques (P dímers) en la superfície viral. Aquestes protuberàncies es localitzen en la part més externa dels capsòmers i són les que li confereixen la forma de copa

característica dels calicivirus, a més de determinar l'antigenicitat viral i d'estar implicat en la unió dels virions als seus receptors cel·lulars (Chakravarty et al., 2005). Els dímers P de la superfície s'han suggerit com a responsables de les interaccions virus-hoste (Tan et al., 2004a; Tan & Jiang, 2005b).

La càpside viral juga un paper important en la resistència dels virions als canvis medioambientals. Aquesta resisteix altes concentracions de clor, des de 3'65 fins 6'25 mg/l (Keswick et al., 1985), concentracions que significativament redueixen la infectivitat d'altres agents virals causants de gastroenteritis, com són els poliovirus o els rotavirus. A més, li confereix alta resistència a agents físico-químics com són la calor (60° durant 30 min), el fred (cicles de congelació-descongelació) (Butot et al., 2008, 2009) o les altes pressions (Sánchez et al., 2011), els àcids (pH 2'7 durant 3 h a temperatura ambient) i els dissolvents orgànics (20% d'èter a 4°C durant 18 h) (Green et al., 2001). Totes aquestes propietats contribueixen significativament a l'elevada natura contagiosa d'aquests virus.

1.2.2.2. Classificació dels calicivirus

La classificació dels calicivirus depèn en gran mesura de les anàlisis filogenètiques dels gens virals estructurals i no estructurals, principalment degut a la falta de sistemes de cultius o, fins la data, models animals per a poder cultivar-los i estudiar-los amb detall.

Els calicivirus, com s’ha comentat abans, es poden dividir en 6 gèneres: norovirus (els quals discutirem amb més detall més endavant) i sapovirus, que infecten als humans, i lagovirus, vesivirus i beco/nebovirus i recovirus, que infecten als animals (Taula 1).

Dins d’aquesta família cal destacar els gèneres *Norovirus* (NoVs) i *Sapovirus* (SaVs), que són els responsables de la majoria de brots epidèmics de gastroenteritis agudes.

Taula 1. Estructura taxonòmica dels calicivirus.

Gènere	Espècie	Cepa representativa
Norovirus (NoV)	Norwalk virus (NV)	Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US
Sapovirus (SaV)	Sapporo virus (SV)	Hu/SaV/GI.1/Sapporo/1982/JP
Lagovirus (LaV)	Virus de l’enfermetat hemorràgica del conill (RHDV)	Ra/LaV/RHDV/GH/1988/DE
	Virus del síndrome de la llebre parda europea (EBHSV)	Ha/LaV/EBHSV/GD/1989/FR
Vesivirus (VeV)	Virus de l’exantema vesicular porcí (VESV)	Sw/VeV/VESV/A48/1948/US
	Calicivirus felí (FCV)	Fe/VeV/FCV/F9/1958/US
Beco/Nabovirus (BeV)	Newbury agent-1	Ca/BeV/NA-1/-/1978/UK
	Calivirus entèrics bovins (BEC-NB)	Bo/BeV/BEC/NB/1999/US
Recovirus	Tulane virus (TV)	rMa/ReV/TV/-/2008/US

Els criptogrames estan organitzats de la següent forma: espècie hoste de la qual s’ha obtingut el virus/gènere/espècie (o genogrup)/nom de la cepa/any detectada/país d’orige.

Espècies hoste (les sigles corresponen a les abreviatures en anglés):

Fe=felí; Ha=llebre; Hu=humà; Sw=porcí; Ra=conill; Bo=boví; Ca=caní; rMa=monos rhesus.

Països (les sigles corresponen a les abreviatures en anglés):

DE=Alemanya; FR=França; JP=Japó; US=Estats Units, UK=Regne Unit.

El gènere *Sapovirus* (SVs) conté 5 genogrups. Les soques patogèniques que infecten als humans pertanyen als SVs de GI i GII principalment (Fig. 1.3), i GIV i GV en menor percentatge, mentre que les cepes patogèniques no humanes pertanyen al GIII (Hansman et al., 2007). Provoquen gastroenteritis víriques en tots els grups d'edat de forma global, incloent brots en hospitals (Johansson et al., 2005), guarderies de dia (Matson et al., 1989) i asils d'ancians (Humphrey et al., 1984).

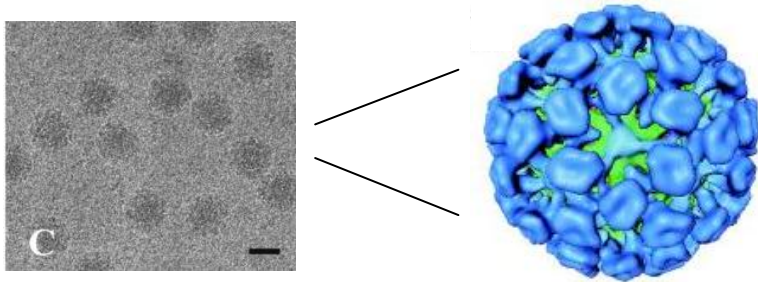


Figura 1.3. Morfologia i estructura dels SVs. Imatge crio-electrònica de partícules de SMSV4 embegudes en gel vitri. Barra = 40 nm (esquerra). Representació de la superfície de l'estructura de SMSV4 a una resolució de ~ 22 Å vista a través de l'eix icosaèdric 3 (dreta) (adaptat de Chen et al., 2004).

Els virus del gènere *Lagovirus* (LaVs) són els causants de l'enfermetat hemorràgica i de l'hepatitis en el conill europeu (*Oryctolagus cuniculus*), provocant la coneguda enfermetat hemorràgica del conill (RHD, de l'anglès “*rabbit haemorrhagic disease*”) (Fig. 1.4). Aquesta enfermetat es caracteritza principalment per la seua elevada mortalitat, fins a un 80–100% en un període de 48 a 96 h (Marcato et al., 1991).

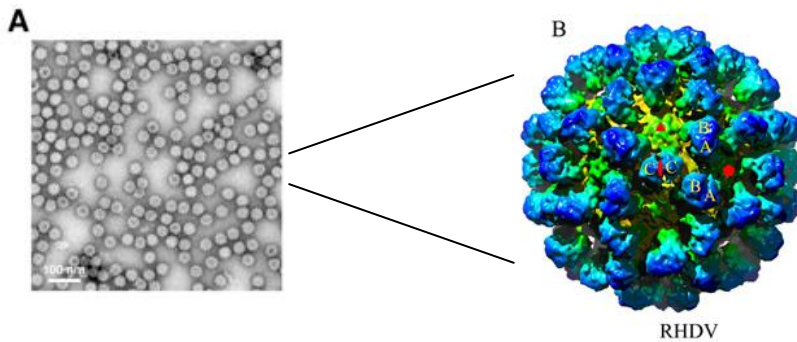


Figura 1.4. Morfologia i estructura del virus RHD. (A) Micrografia electrònica de partícules del RHDV purificades i tintades negativament (barra = 100 nm) (adaptat de Wang et al., 2013). (B) Reconstrucció d'una imatge per criomicroscòpia electrònica d'un virió del RHDV amb un diàmetre de 41 nm, representat com a una isosuperfície (adaptat de Hu et al., 2010).

El gènere *Vesivirus* (VeVs) inclou virus que afecten una àmplia varietat d'animals, incloent felins, rèptils, amfibis, peixos i inclús nematodes (Matson et al., 1996; Smith & Boyt, 1990). El prototip d'aquest gènere és l'exantema vesicular del virus porcí (VESV, “*vesicular exantema of swine virus*”). Els calicivirus felins (FCV, “*feline calicivirus*”) són virus importants dins de l'àrea veterinària, ja que afecten espècies de gats tant domèstiques com salvatges provocant rinitis i una enfermetat ulcerativa de les vies respiratòries superiors (Radford et al., 2007) (Fig. 1.5). També s'han descrit infeccions sistèmiques amb aquest virus (Coyne et al., 2006).

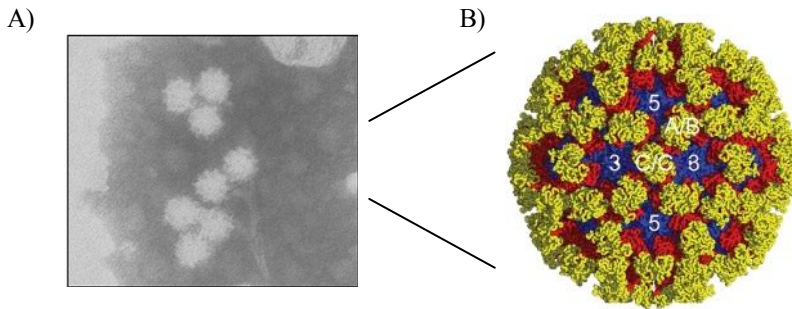


Figura 1.5. Morfologia i estructura del FCV. (A) Anàlisi mitjançant microscòpia electrònica de partícules purificades de FCV a partir del sobrenadant de cèl·lules CrFK infectades amb el FCV-F9. Barra = 50 nm (adaptat de Di Martino & Marsilio, 2010). (B) Estructura de raigs X del FCV-5 vista a través de l'eix icosaèdric 2. També es mostra la localització del set de dímers A/B i C/C i els eixos icosaèdrics 3 i 5 (adaptat de Ossiboff et al., 2010).

Per últim, els recentment reconeguts com a gèneres *Beco/Nebovirus* (BV/NeVs) i *Recovirus* (ReVs) inclouen virus que infecten l'espècie bovina i primats no humans, respectivament. Els becovirus (calicivirus entèrics bovins) i els nebovirus (Newbury agent-1 i NB, Nebraska) foren aïllats d'excrements de vedelles (Park et al., 2008). El virus Tulane (TV) va ser aïllat de macacos rhesus, sent el primer reconegut dins del gènere recovirus (calicivirus entèrics de rhesus) (Farkas et al., 2008) (Fig. 1.6).

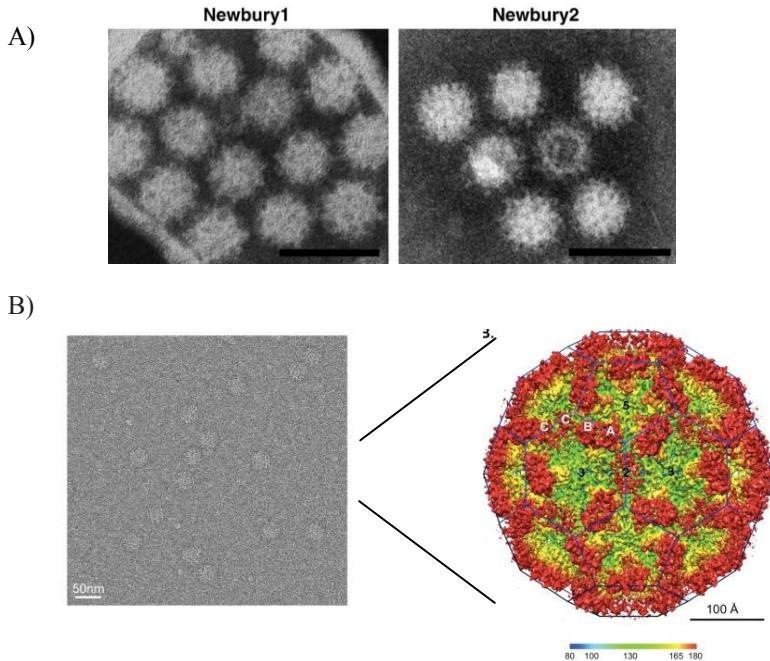


Figura 1.6. Morfologia i estructura dels Nebovirus i Recovirus. (A) Fotografies de microscòpia electrònica de virions de Newbury 1 i Newbury 2 tintats negativament amb una solució de fosfotungstat de potassi al 2% (pH 6.0). Barra = 50 nm (Oliver et al., 2006). (B) Micrografia mitjançant microscòpia crioelèctrica d'un virió de TV procedent d'una mostra purificada i representació de la superfície reconstruïda amb els eixos 5, 3 i 2 marcats. Es poden apreciar dos tipus de dímers en la càpside, A/B i C/C disposats en una gàbia icosaèdrica T=3 (blau). El mapa es va acolorir radialment d'acord amb la clau de color (adaptat de Yu et al., 2013).

1.2.2.3. Organització genòmica

Els calicivirus presenten les següents característiques comunes en relació a l'estructura del genoma i a la seua replicació (Fig. 1.7):

- La llargària de l'ARN genòmic nu és infecciosa de per si, sent una cadena de sentit positiu lligada a la proteïna viral VPg (de l'anglès “*genome-linked protein*”) per l'extrem terminal 5' i a una cua de poli(A) en l'extrem 3'.

- L'ORF1 (de l'anglès “*open reading frame*”) codifica una poliproteïna que es processada encara més co-traduccionalment per la proteasa viral, que condueix a almenys 6 proteïnes no estructurals implicades en la replicació del genoma viral.
- L'ARN dependent ARN polimerasa (RdRp) viral i la VPg juguen un paper essencial en la transcripció i la replicació dels ARN genòmics, antigenòmics i subgenòmics.
- La VPg actua com una estructura similar a una tapa en 5' i interactua amb els factors d'iniciació eIF4E i eIF3 (Goodfellow et al., 2005; Daughenbaugh et al., 2006).
- En els NoVs, VeVs i possiblement els ReVs, les proteïnes estructurals (VP1 i VP2) estan codificades per un ARN subgenòmic.
- En els SVs, LaVs i possiblement els BeV/NeVs, la VP1 s'allibera del precursor de la poliproteïna codificat per l'ORF1 després de l'escissió per la proteasa viral.
- La VP2 és una xicoteta proteïna bàsica essencial per a la generació del viriò (Sosnovtsev et al., 2005).

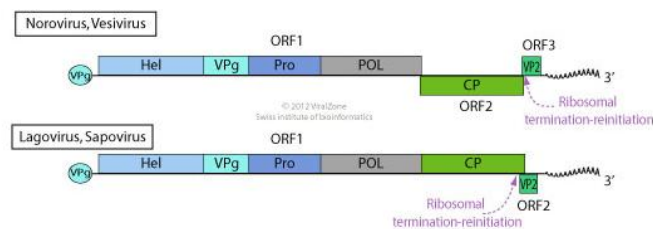


Figura 1.7. Genoma lineal dels calivirus format per una molécula d'ARN de simple cadena i de sentit positiu de 7'3 a 8'3 kb. L'extrem 5'-terminal està unit a una proteïna VPg i l'extrem 3' té una cola poli(A). En els gèneres sapovirus, lagovirus i beco/nebovirus la VP1 està codificada per l'ORF1, mentre que en els gèneres norovirus, vesivirus i recovirus ho està per l'ORF2 (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/32.html).

1.2.2.4. El cicle replicatiu dels calicivirus

Esquemàticament, es pensa que la replicació dels calicivirus conté onze passos (Fig. 1.8). Després de la unió de la càpside viral al receptor cel·lular, el viriò s'internalitza i el genoma d'ARN és després empaquetat en vesícules endocítiques. La VPg lligada al genoma interacciona amb la maquinària de traducció cel·lular (el complex eucariòtic del factor d'iniciació 4 (eIF4) i la subunitat ribosòmica 40S (Daughenbaugh et al., 2003, 2006).

La traducció de la poliproteïna i el processament co-traduccionall allibera les proteïnes no estructurals i els seus precursors, sent els més importants el precursor de la proteasa-polimerasa (NS6-7^{propol}), la proteasa (NS6^{pro}), l'ARN polimerasa ARN depenent (NS7^{pol}), la NTPasa putativa (NS3^{NTPasa}), i les proteïnes NS4-NS5^{VPg}. Aquestes proteïnes se suposa que estan involucrades en el complex enzimàtic que replica el genoma i sintetitza l'ARN antigenòmic. Aquest ARN antigenòmic és la plantilla per a l'ARN subgenòmic, peculiaritat dels calicivirus. En els NoVs i VeVs, la transcripció d'ARN subgenòmic produeix grans quantitats de proteïnes estructurals, la VP1 i la VP2. En FCV, la VP1 és addicionalment escindida per la proteasa viral alliberant una proteïna líder (LC, líder de la proteïna de la càpside) i la càpside (Matsuura et al., 2000; Sosnovtsev et al., 1998).

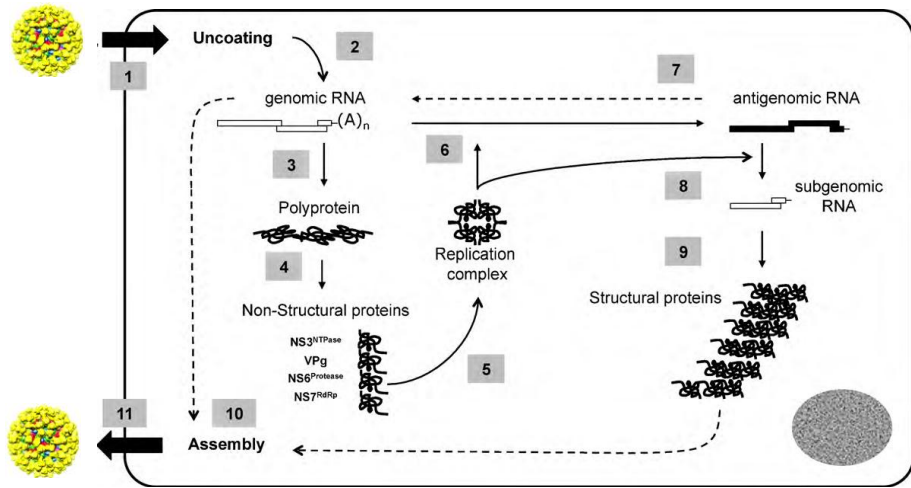


Figura 1.8. Cicle de replicació dels calicivirus. La replicació dels calicivirus es pot subdividir esquemàticament en onze passos. Després de la unió de la proteïna “core” al receptor cel·lular, el viriós s’internalitza a la cèl·lula (pas 1). El desempaquetament del genoma viral (pas 2) és seguida per la traducció del precursor de la poliproteïna (pas 3) i un processament co-traduccionall alliberant les proteïnes no estructurals (pas 4). Aquestes proteïnes es reuneixen en un complex de replicació (pas 5) que sintetitza l’ARN antigenòmic (pas 6), sent en si utilitzat com a plantilla per a la síntesi de l’ARN genòmic (pas 7). L’ARN genòmic recentment sintetitzat es traduït com un precursor de poliproteïna (pas 3) o utilitzat per a l’empaquetament en la proteïna viral core ensamblada (pas 10). L’ARN antigenòmic també és el motlle per a la síntesi d’ARNs subgenòmics (pas 8). En norovirus, vesivirus i possiblement recovirus, l’ARN subgenòmic es tradueix com proteïnes estructurals, VP1 i VP2 (pas 9). En sapovirus, lagovirus i possiblement beco/nabovirus, la VP1 s’allibera de la poliproteïna precursora després del processament per la proteasa viral. En un moment encara no definit en el cicle de replicació, tindria lloc l’ensamblatge de les proteïnes estructurals així com l’empaquetament de l’ARN genòmic (pas 10), seguit per l’alliberament del viriós madur de la cèl·lula (pas 11) (Rohayem et al., 2010).

En els SVs, LaVs i BeV/NeVs, la VP1 s’allibera de la poliproteïna precursora després del processament per la proteasa viral. Aquest mecanisme implica l’anomenat "*termination upstream ribosomal binding site*" (TURBS), que podria regular la ratio de la producció de VP1/VP2 durant la replicació (Luttermann & Meyers, 2007).

L'ARN antigenòmic és també la plantilla per a l'ARN genòmic, sent traduït posteriorment en proteïnes madures no estructurals. En un punt de temps donat en el cicle de multiplicació, té lloc l'empaquetament de l'ARN genòmic, seguit de l'alliberament del virió madur fora de la cèl·lula.

1.2.3. Adenovirus

Els adenovirus (AdVs) humans estan implicats com a agents infecciosos en nombroses enfermetats, incloent infeccions del tracte respiratori, desordres oculars i del tracte gastrointestinal (Kinchington et al., 2005). Generalment, provoquen enfermetats respiratòries o gastrointestinals lleus i auto-limitants, principalment en xiquets; però si l'enfermetat es disemina, pot ser especialment greu en pacients immunocompromesos, particularment en xiquets transplantats de medul·la òssia (Muruve, 2004).

Es tracta de virus no-envoltats d'ADN de doble cadena que pertanyen a la família *Adenoviridae*. S'han descrit almenys 51 serotips d'adenovirus humans classificats en 6 grups (A - F) segons les seues propietats bioquímiques, immunològiques i morfològiques. Dins del gènere adenovirus, la majoria d'adenovirus entèrics (EAdV) descoberts fins ara pertanyen al subgènere F. Especialment, els adenovirus tipus 40 i 41 són una causa important de diarrea en la població infantil a nivell mundial i no es disposa de cap vacuna (Wilhelmi et al., 2003). Els símptomes, vòmits i diarrea, solen aparèixer de 8 a 10 dies després de l'exposició i duren entre 5 i 12 dies. La infecció pot tindre lloc en qualsevol època de l'any.

Els AdVs tenen un tamany d'entre 90-100 nm i la seua estructura consisteix en una càpside icosaèdrica formada per 3 components principals: l'hexó localitzat en les cares i costats de la càpside, el pentó base localitzat en els 12 àpexs quintuples; i fines fibres unides al pentó base (Fig. 1.9).

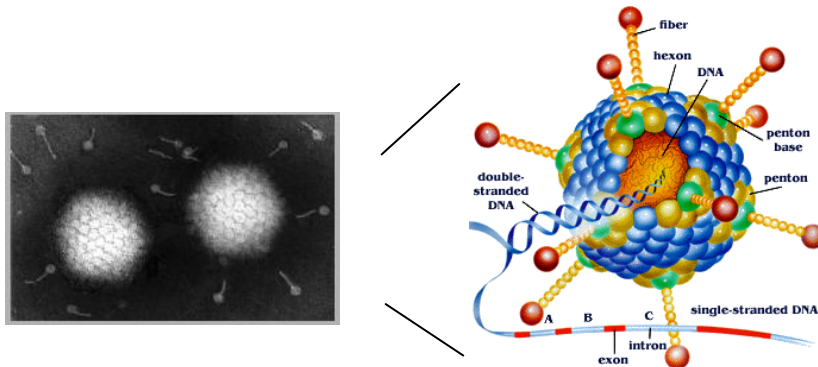


Figura 1.9. Estructura d'un adenovirus on es representen els diferents components de la càpside i del core. Micrografia electrònica d'adenovirus on es pot apreciar l'estructura de la càpside. Les fibres es desprenen amb facilitat durant la preparació per a la microscòpia electrònica (Adaptat de la pàgina web <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish-virology/spanish-chapter16.htm>).

Aquesta càpside es construeix a partir de 252 capsòmers ($T = 25$), dels quals 240 són hexavalents i 12 (situats en els vèrtexs) són pentavalents. Les fibres consisteixen en un eix llarg i fi amb un cap globular, i estan implicades amb el procés de fixació de la partícula vírica a la cèl·lula hoste. Altres components minoritaris són IIIa, VI, VIII i IX, associats també a la càpside. Dins d'aquesta es troba la proteasa del viriò que juga un paper vital en l'ensamblatge i el genoma d'ADN de doble cadena associat a 5 polipèptids: la proteïna terminal (TP), V, VII, Mu i IVa2 (Russell, 2009).

1.2.4. Astrovirus

Les infeccions entèriques per astrovirus (AsVs) en humans s'han descrit per tot el món, afectant principalment a xiquets menors de 2 anys, als ancians i a persones immunocompromeses; i es pensa que són els responsables de fins el 20% dels casos esporàdics de diarrea no bacteriana i del 0'5%-15% dels brots diarreics (Kirkwood et al., 2005; Moser & Schultz-Cherry, 2005). Els símptomes clínics solen aparèixer als 3-4 dies després de l'exposició a l'agent viral, solen durar de 2 a 7 dies i consisteixen en diarrea líquida i menys comunament vòmits, dolor de cap, febra, dolor abdominal i falta de gana (Glass et al., 2001; Mitchell et al., 1999). Les infeccions poden tindre lloc al llarg de tot l'any, encara que els AsVs solen ser més actius durant els mesos d'hivern.

Els AsVs són xicotets virus icosaèdrics no envoltats d'uns 28-30 nm de diàmetre, que contenen un genoma d'ARN de cadena senzilla i sentit positiu d'aproximadament 7 kb (Matsui & Greenberg, 1996). Aquest genoma inclou una regió 5' no traduïda (UTR) seguida de tres pautes obertes de lectura (ORFs) anomenades ORF1a, ORF1b i ORF2 (codifica la proteïna viral de la càpside, CP), una 3' UTR i una cola poli(A) (De Benedictis et al., 2011). Pertanyen a la família *Astroviridae* i es divideixen en dos gèneres, *Mamastroviruses* (MAstVs) i *Avastroviruses* (AAstVs), que infecten, respectivament, a mamífers i aus (Mendez & Arias, 2007).

Aquests virus s'anomenen així perquè tenen com xicotetes estrel·les (5 o 6 punts) que cobreixen la superfície de l'envoltura viral.

Mitjançant microscòpia electrònica de tinció negativa s'observa que mostren un contorn pentagonal i hexagonal, possiblement degut a les projeccions de les partícules icosaèdriques, amb unes espícules protuberants que sobreixen de la superfície viral (Risco et al., 1995) (Fig. 1.10).

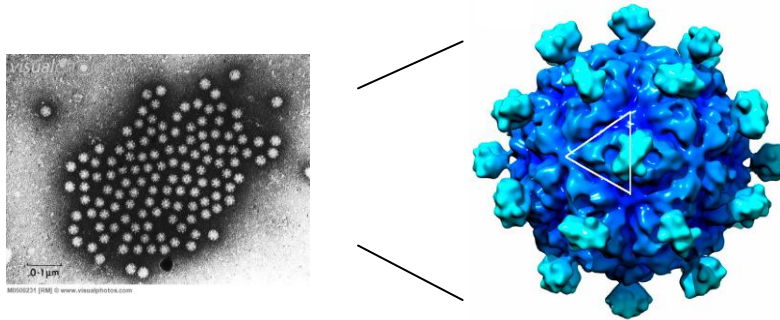


Figura 1.10. Model de l'estructura de la càpside d'astrovirus T = 3 a 15 Å de resolució. El triangle blanc resalta una unitat asimètrica (Adaptat de Dong et al., 2011). A l'esquerra micrografia de transmissió electrònica de partícules víriques d'astrovirus (Image No.M0500231, www.visualphotos.com).

1.2.5. Altres virus causants de gastroenteritis

Els **torovirus** són virus que pertanyen a la subfamília *Torovirinae*, dins de la família dels *Coronaviridae*, i foren detectats per primera vegada en deposicions de pacients amb gastroenteritis en 1984 (Beards et al., 1986). Aquests virus tenen una envoltura d'entre 100-140 nm, amb una càpside de simetria helicoidal i un genoma d'ARN de simple cadena i de sentit positiu (Fig. 1.11). Es tracta de virus associats amb diarrea aguda i persistent en xiquets i podria representar una important causa de diarrea nosocomial (Wilhelmi et al., 2003).

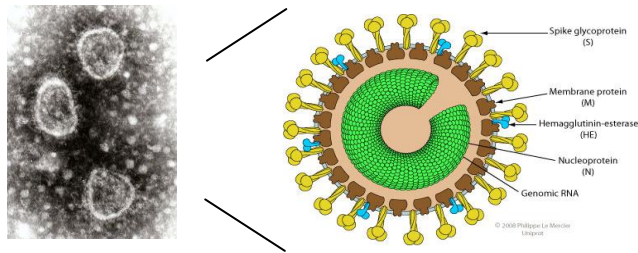


Figura 1.11. Estructura d'un viriò de la subfamília *Torovirinae*, on es pot apreciar la nucleocàpsida tubular del gènere torovirus (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/763.html). Micrografia electrònica de partícules víriques de torovirus (<http://en.wikipedia.org/wiki/Torovirus>).

Els **coronavirus** s'inclouen també en la família *Coronaviridae* i van ser relacionats amb casos de diarrea en humans en 1975. Tenen un tamany d'entre 60 i 220 nm, també de simetria helicoidal i posseeixen una envoltura que els dona l'aparença d'una corona (d'ací el seu nom). El seu genoma és d'ARN monocatenari de sentit positiu i és el més gran dins dels virus d'ARN (Wilhelmi et al., 2003) (Fig. 1.12).

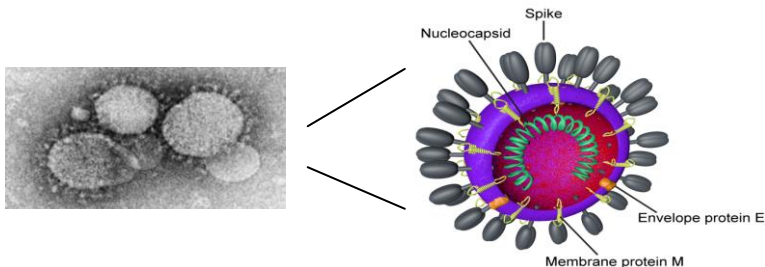


Figura 1.12. Estructura d'un viriò de coronavirus i partícules víriques tenyides negativament observades al microscopi electrònic (Adaptat de Belouzard et al., 2012).

Els **picobirnavirus** són xicotets virus sense envoltura d'uns 30-40 nm de diàmetre, amb una càpsida de simetria icosaèdrica i un

genoma d'ARN bicatenari compost de dos o tres segments (Fig. 1.13). Foren identificats per Pereira i col. en 1988 i des d'aleshores s'han trobat com a agents virals causants de diarrea en una àmplia varietat d'espècies animals (Chandra, 1997; Carruyo et al., 2008; Martínez et al., 2010) i també en humans, tant en xiquets com en adults, incloent pacients immunocompromesos (Gallimore et al., 1995; Cascio et al., 1996; Giordano et al., 1999; Liste et al., 2000).

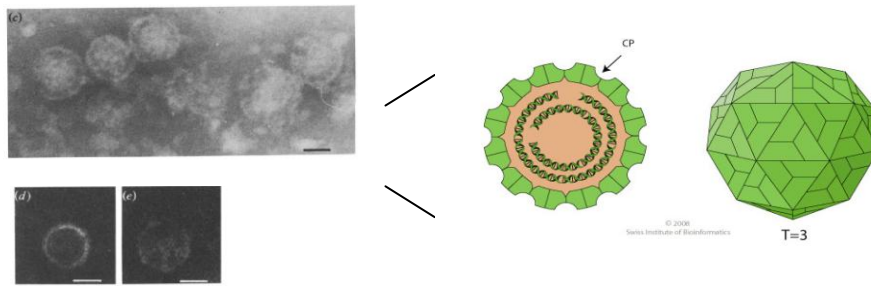


Figura 1.13. Estructura dels picobirnavirus. Càpside d'un picobirnavirus envoltant el genoma bisegmentat, que presenta una simetria icosaèdrica, $T=3$ (dreta). http://viralzone.expasy.org/all_by_species/602.html. Micrografies electròniques d'una mostra purificada en CsCl, fixada en glutaraldehid i tenyida negativament amb acid fosfotúngstic, suggerint l'estructura icosaèdrica. Les barretes representen $0.02 \mu\text{m}$ (Esquerra) (Adaptat de Pereira et al., 1988).

1.3. EL GÈNERE NOROVIRUS

1.3.1. Antecedents històrics

En 1929, Zahorsky va ser el primer en descriure la “hyperemesis hemis” o “*winter vomiting disease*” (l'enfermetat dels vòmits d'hivern), una enfermetat caracteritzada per l'aparició repentina de vòmits autolimitants i diarrea que típicament presentava un pic en els mesos més freds de l'any (Zahorsky, 1929). Entre 1945 i 1953 les

gastroenteritis agudes no bacterianes foren repetidament demostrades. Riemann i col. (1945), Gordon i col. (1947) i Jordan i col. (1953) inocularen grups de voluntaris sans amb filtrats fecals lliures de bactèries, procedents d'individus infectats, que resultaren en infeccions que manifestaven símptomes clínics similars als que presenten les autèntiques infeccions pel virus Norwalk. A pesar dels esforços realitzats, tots els intents de cultivar i caracteritzar *in vitro* l'agent etiològic de les gastroenteritis agudes, fallaren.

En 1968, en una escola primària de la ciutat de Norwalk (Ohio, EE.UU), tingué lloc un brot de gastroenteritis que va afectar el 50% dels alumnes i professors i el 32% de les famílies que estagueren en contacte, sense que cap agent bacterià poguera ser identificat en les diferents exaccions recollides. Però no va ser fins l'any 1972 que Kapikian i altres investigadors descobriren l'etiologia viral d'aquest síndrome, mitjançant la microscòpia immunoelectrònica (MIE). S'examinaren mostres obtingudes d'un grup de voluntaris que desenvoluparen gastroenteritis després de l'administració oral de filtrats fecals d'un grup d'estudiants afectats en l'escola primària de Norwalk. Utilitzant un sèrum convalescent inactivat de voluntaris infectats experimentalment, s'observaren agregats de xicotetes partícules de simetria cúbica i d'uns 27 nm de diàmetre menor i de 32 nm de diàmetre major, aproximadament (Adler et al., 1969; Green et al., 2001; Kapikian et al., 1972).

Aquest virus s'anomenà virus de Norwalk, pel lloc on havia sigut descobert, i va ser el primer virus firmement associat amb les

gastroenteritis agudes. A partir d'ací, s'identificaren altres virus mitjançant microscòpia electrònica, antigènicament diferents, i els van nombrar segons el lloc de detecció. Alguns exemples són el virus de Southampton, Hawaï (Thornhill et al., 1977), Lorsdale, etc. (Atmar et al., 2001; Green et al., 2001).

Tradicionalment, eren anomenats “xicotets virus redons no estructurats” (SRSV) o virus de tipus Norwalk (“*Norwalk-like virus*” o NLV), fins que el Comité Internacional de Classificació va proposar el terme de norovirus com a nom genèric (Von Regenmortel, 2000).

Durant les dècades següents, l'estudi dels NoVs va estar ple de desafiaments: baixes quantitats de virus presents en les mostres fecals d'individus infectats, per tant, la purificació era problemàtica, absència d'un sistema de cultiu cel·lular eficient i d'un model animal per a la seua replicació i propagació. A més, fins la data, els tests disponibles de diagnòstic immunològic incloïen la MIE, els radioimmunoassaigs, els enzimoimmunoassaigs (ELISA) i els immunoblottings. Tots aquests tests requerien la utilització de reactius tals com sèrum i mostres fecals de voluntaris infectats (Green et al., 1995, 1997; Glass et al., 2000; Lopman et al., 2002).

Aquests assaigs foren importants per a elucidar la història natural i les característiques bàsiques del virus Norwalk i de la seua infecció. En canvi, el seu ús estava limitat per la pobra sensibilitat del propi test, la falta de suficient quantitat d'antigen per a permetre estudis epidemiològics o de laboratori a gran escala, i la possible

variabilitat dels resultats per la utilització de mostres de diferents voluntaris. Però un progrés dramàtic va tindre lloc en l'any 1990, on gràcies a la clonació del genoma del virus Norwalk es va poder comprendre la virologia molecular i l'importància epideomològica d'aquests virus que havia sigut àmpliament subestimada, donant lloc al desenvolupament d'assaigs de diagnòstic molecular i a la definició de la càrrega global de l'enfermetat (Jiang et al., 1990). A partir d'ací, es va veure que la proteïna codificada pel segon ORF mitjançant sistemes de transcripció-traducció lliure de cèl·lules i baculovirus recombinants, s'autoensamblava espontàniament formant partícules pseudovíriques ("virus-like particles", VLPs) que són antigènica i immunogènica idèntiques al virus natiu (Jiang et al., 1992). Fet que va suposar el desenvolupament de tests de diagnòstic ràpids, sensibles i fiables, així com estudis estructurals dels NoVs.

Actualment, una gran part dels esforços es centren en l'obtenció de sistemes de cultiu eficients on NoV es pugui replicar (Papafragkou et al., 2013), en la búsqueda d'un model animal xicotet on seguir el procés de la infecció, així com la búsqueda d'antivirals i possibles vacunes eficients (Debbink et al., 2014). Recentment, Taube i col. han descrit el primer model murí que pareix ser susceptible a la infecció per NoV humans, encara que no es capaç de recollir tots els aspectes de dita infecció, com per exemple la transmissió fecal-oral (Taube et al., 2013).

1.3.2. Classificació i organització genòmica

Les soques de NoV que infecten als humans es classifiquen en dos grans genogrups, GI, GII i en menor mesura GIV (Green et al., 2000). Els genogrups III i V engloben les soques de NoV bovines i murines, respectivament (Karst et al., 2003; Han et al., 2004; King et al., 2012) (Fig. 1.14). A banda, s'ha descrit un possible genogrup VI que englobaria soques canines (Mesquita et al., 2010).

GI i GII es subdivideixen en 27 subgrups (genotips), GI.1–GI.8 i GII.1–GII.19 (Zheng et al., 2006; 2010), sent el més comú el NoV de genogrup II genotip 4 (GII.4) (Reuter et al., 2008; Hoa et al., 2013). El GIII també engloba 3 genotips de NoV porcins i el GIV incorpora un genotip amb ceps que infecten als lleons africans (Martella et al., 2007).

Aquests virus están formats per una molécula d'ARN de cadena senzilla de sentit positiu de 7'7 kb (Jiang et al., 1990, 1992, 1993; Matsui et al., 1991), el qual està incorporat dins d'una càpside que consisteix en múltiples còpies d'una proteïna senzilla d'aproximadament 56'6 kDa (Greenberg et al., 1981; Jiang et al., 1992). Aquesta cadena d'ARN ha de codificar totes les entitats requerides per a la integritat estructural dels NoVs, la infectivitat i la immunogenicitat.

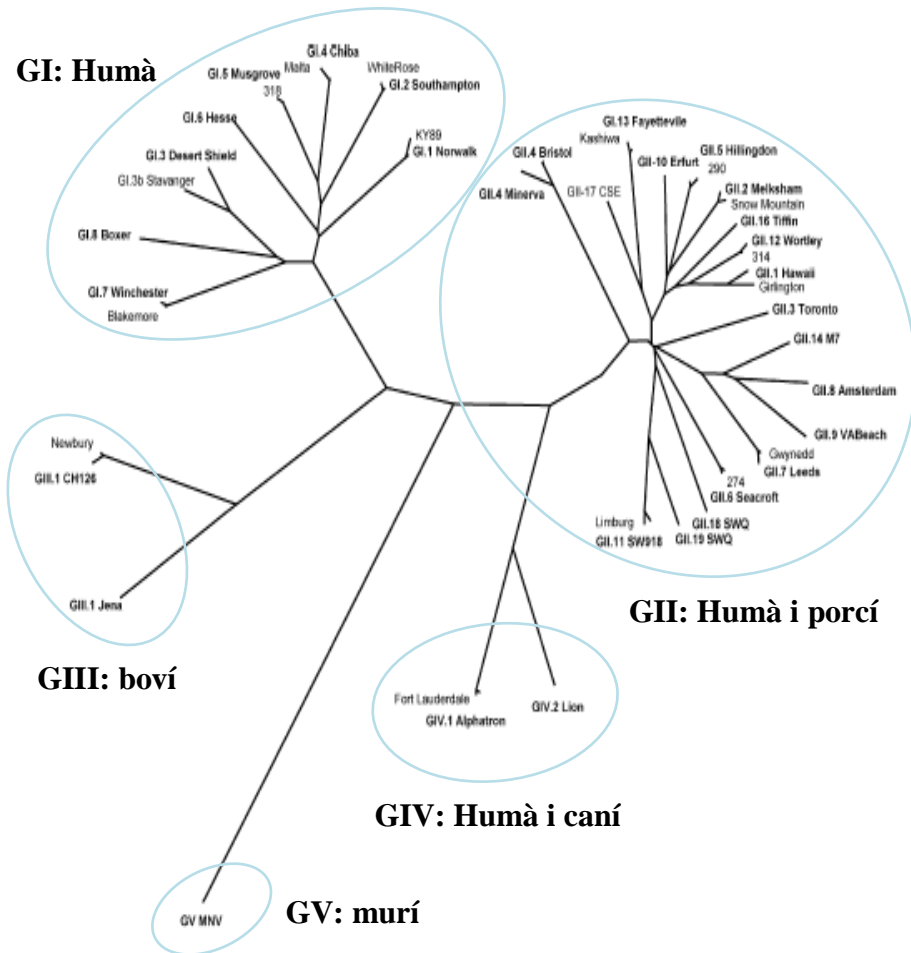


Figura 1.14. Classificació dels norovirus en 5 genogrups (GI-V) i 32 genotips basats en la diversitat de seqüència de la proteïna de la càpsida VP1 completa. Les soques que infecten als humans s'engloben en els genogrups GI, GII i GIV (Patel et al., 2009).

El genoma dels NoVs consisteix en 3 pautes obertes de lectura (ORFs).

L'**ORF1**, en l'extrem 5', codifica un precursor d'una poliproteïna que es processada post-traduccionalment en moltes

proteïnes no estructurals de 1.738 aa (pes molecular de 193'5 kDa), les quals són imprescindibles per a la replicació del virus. Aquesta poliproteïna és escindida en 7 proteïnes madures no estructurals (NS1-NS7) (Seah et al., 2003) (Taula 2). Fins la data no hi ha informació disponible del paper que juga la proteïna majoritària amino-terminal NS1 en la replicació dels NoVs. En canvi, la NS2, també anomenada p48 i la proteïna N terminal, s'ha demostrat que colocalitza amb el complex de Golgi en cèl·lules transfectades i que indueix un reagrupament de la membrana d'aquest (Fernandez-Vega et al., 2004). Aquesta proteïna també interacciona amb una proteïna hoste implicada en la regulació del transport vesicular i que pot inhibir l'expressió de proteïnes de la superfície cel·lular (Ettayebi & Hardy, 2003). L'expressió de la NS4 (també p22 i proteïna 3A) en cèl·lules transfectades ha demostrat recentment que indueix la disrupció de l'aparell de Golgi. A més, la NS4 conté una senyal d'exportació que dona com a resultat un tràfic aberrant de vesícules recobertes de COPII (proteïna que recobreix les vesícules per al transport des del reticle endoplàsmic fins l'aparell de Golgi, "*coat protein*") i en la inhibició de la secreció de proteïnes de l'hoste (Sharp et al., 2010).

Taula 2. Funcions de les proteïnes madures de NoVs.

Proteïna	Funció(ns)
NS1	Desconeguda
NS2/p48	Inhibeix el tràfic de les proteïnes hoste a la superfície cel·lular Implicada en la formació del complex de replicació?
NS3/NTPasa	Activitat NTPasa
NS4/p22	Inhibeix la secreció de les proteïnes de l'hoste Implicada en la formació del complex de replicació?
NS5/VPg	Primer de la replicació de l'ARN viral seguida de la seua uridilinització Recluta factors hoste d'iniciació de la traducció
NS6/pro	Mitjança el tall de la poliproteïna de l'ORF1
NS7/Pol	Replica el genoma viral Genera la VPg uridilinaada
VP1	Important paper estructural
VP2	Incrementa l'expressió de la VP1 i estabilitza les partícules

La resta de proteïnes tenen activitats definides: la NS3 actua com a NTPasa (Pfister et al., 2001), la NS6 és una proteasa (Liu et al., 1996) i la NS7 és una ARN polimerasa ARN dependent (Fukushi et al., 2004). La NS5 és la proteïna VPg que, basat en estudis amb calicivirus animals, pareix que s'uneix covalentment a l'extrem 5' del genoma viral (poliadenilat en 3') en compte de la típica estructura cap (Burroughs & Brown, 1978) (Fig. 1.15) i que podria funcionar com a *primer* en la replicació de l'ARN viral seguida de la seua uridilització (Belliot et al., 2008). La VPg també interacciona amb factors d'iniciació de la traducció de l'hoste, pot ser per a reclutar-los en l'extrem 5' del genoma d'ARN per a la iniciació d'aquesta (Daughenbaugh et al., 2003).

L'**ORF2**, situada en l'extrem 3', codifica la principal proteïna de la càpside, la **VP1**, una proteïna de 530 aa (56'6 kDa). I l'**ORF3** codifica una proteïna estructural, **VP2**, de 212 aa (22'5 kDa) (Fig. 1.15). Aquesta proteïna és xicoteta, bàsica i prou divergent tant en tamany com en seqüència entre virus de la mateixa família, i es pensa que desenvolupa un paper important en els nivells d'expressió de la VP1 i que millora l'estabilitat (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). La càrrega bàsica de la VP2 també suggereix que podria participar en l'encapsidació del genoma viral. En els NoVs murins s'ha descrit una quarta ORF addicional, l'ORF4 que se solapa amb l'ORF2 però en una alternativa pauta de lectura i que es pensa que codifica per a una proteïna de 214 aa (Thackray et al., 2007).

1.3.4. Morfologia del virió

Gràcies al desenvolupament de les VLPs, l'estructura 3D del NV va poder ser estudiada per microscòpia crio-electrònica i cristal·lografia de raigs X, amb una resolució aproximada de 22 Å (Prasad et al., 1994b). Aquests estudis demostraren que els NoVs són virus no envoltats, que exhibeixen una simetria icosaèdrica d'ordre 3 ($T = 3$) i que tenen un diàmetre d'entre 27-30 nm.

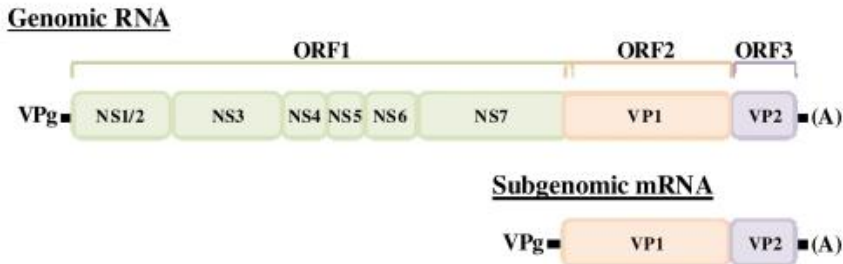


Figura 1.15. Organització genòmica dels NoVs. El genoma dels NoVs està format per una molècula d'ARN lineal de simple cadena i de sentit positiu d'entre 7'4 i 7'7 kb. Conté 3 pautes obertes de lectura: una codifica una poliproteïna que dona com a producte 7 proteïnes no estructurals (verd), l'altra codifica la proteïna de la càpside VP1 (taronja) i l'altra la VP2 (morat). Durant la replicació es produeix un ARNm subgenòmic que actua com a motle per a la producció de les proteïnes estructurals, similar a l'ARN genòmic que està covalentment unit a la proteïna VPg per l'extrem 5' i poliadenilat per l'extrem 3' (adaptat de Karst 2010).

La càpside dels virions està formada per 180 còpies d'una única proteïna, la VP1, organitzada en 90 dímers. Cada dímer forma una protuberància en forma d'arc que s'extén des de la capa interna de la partícula. Cada monòmer de la càpside té, en principi, dos dominis, el **domini conservat S** de l'envoltura amino terminal i el **domini protuberant P** carboxi terminal molt més variable i que forma els braços protuberants, units per una bisagra de 10 residus aproximadament.

En la part N-terminal, 225 residus constitueixen el domini S. Els residus del 50 al 225 es pleguen formant una clàssica cadena β antiparal·lela de 8 cadenes en forma de sandvitx, un plegament comú en moltes proteïnes virals de la càpside. El plegament del domini P, format pels residus del 225 al C-terminal, és diferent de qualsevol altre plegament de la resta de proteïnes virals (Prasad et al., 1999).

El domini P es compon de dos subdominis: P1, que abarca del residu 226 al 278 i del 406 al 520, i P2, del residu 279 al 405 (Fig. 1.16). El **subdomini P2** és una gran inserció dins del subdomini P1, entre els residus 278 i 406. Els residus del 285 al 380 d'aquest subdomini es pleguen adoptant una estructura compacta semblant a un barril format per 6 cadenes β (Prasad et al., 1999). El **subdomini P1**, del residu 216 al 278, conté 3 xicotetes cadenes β , mentre que la zona C-terminal (últims 114 residus) conté 6 cadenes β i una α -hèlix ben definida (Prasad et al., 1999).

P1 es troba més a l'interior i exhibeix una seqüència conservada, mentre que P2 es localitza en la cara externa i presenta una seqüència primària altament variable, indicant que la P2 és la responsable de la interacció amb l'hoste i de les respostes immunes (Cao et al., 2007).

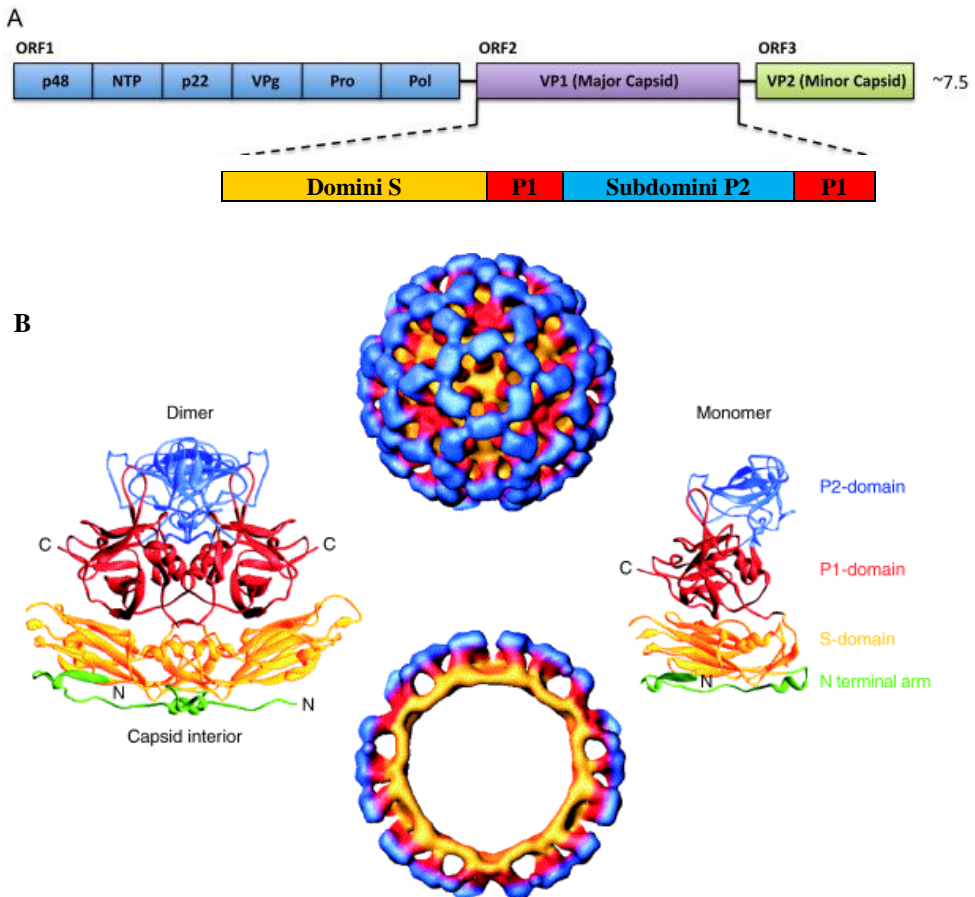


Figura 1.16. Estructura de la càpside de NoVs. (A) La proteïna de la càpside VP1 es divideix en una regió N-terminal (verd) formant l'interior de la VLP, el domini S (groc) que constitueix la superfície del virus, i el domini protuberant P que emana de la superfície del domini S. Aquest domini es subdivideix en els subdominis P1 (roig) i P2 (blau). (B) Imatge de la càpside de NoV per crio-electro microscòpia (dalt), on els colors corresponen a les mateixes zones que en l'anterior cas, i secció transversal de la VLP (baix). Als dos costats de la imatge, d'esquerra a dreta, es pot observar l'estructura cristal·logràfica del dímer i del monòmer de la proteïna de la càpside (adaptat de Le Pendu et al., 2006).

De manera que de forma global, es pot dir que la càpside és una coberta formada per una proteïna ensamblada d'entre 10 i 14'5 nm de

radi, amb protuberàncies que s'extenen per la perifèria donant lloc a un radi exterior de 19 nm, deixant grans depressions en els eixos triple i quintuple. Per tant, el domini S estaria implicat en la formació de la càpside icosaèdrica i els seus contactes i el domini P formaria les protuberàncies que emanen d'aquesta (Prasad et al., 1999), estabilitzant la càpside mitjançant les interaccions dimèriques (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002).

1.3.5. Producció de VLPs i partícules P

Les proteïnes de la càpside VP1 d'aquests virus, independentment de la resta de components virals, s'autoensamblen espontàniament en partícules pseudovíriques (VLPs), partícules buides que no contenen material genètic i, per tant, no es poden replicar i no són patògenes (Jiang et al., 1992). Aquestes partícules són morfològicament idèntiques a les càpsides del virus natiu i presenten unes propietats antigèniques semblants (Prasad et al., 1999), demostrades tant en ratolins com en humans, induint respostes sistèmiques i de la mucosa (Guerrero et al., 2001).

La proteïna VP1 té un pes molecular de 58 kDa aproximadament, i en les cèl·lules d'insecte infectades també s'ha trobat una proteïna de menor tamany (34 kDa), que correspon al producte d'un tall de la proteïna de 58 kDa.

Més recentment, també s'ha demostrat que sols el domini P de la proteïna de la càpside forma espontàniament una partícula petita amb una morfologia única. Aquestes partícules tenen un pes molecular

de ~830 kDa, una forma rodona i buida i uns 5 nm de diàmetre, que juntament amb la literatura descrita, pareix ser que la partícula P és un icosaèdre $T = 1$. A més, el pes molecular d'aquesta suggereix que conté 24 monòmers P organitzats en 12 dímers P idèntics (Tan & Jiang 2005a).

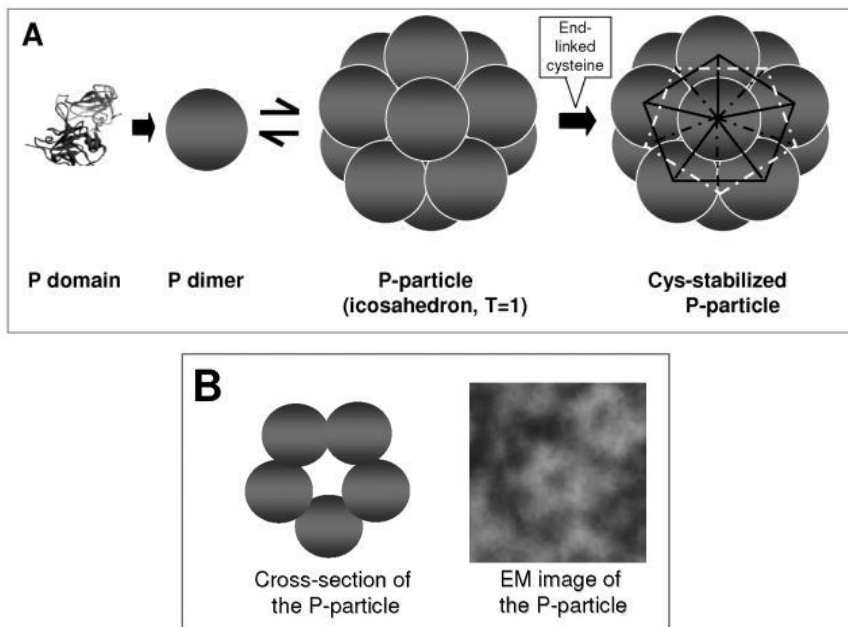


Figura 1.17. Model de formació de les partícules P. (A) Els diferents passos de formació de les partícules P. Els monòmers P espontàniament formen un dímer P globular. Llavors, 12 dímers P idèntics munten en una partícula P icosaèdrica $T = 1$ (depenent de la concentració de proteïna P). Les interaccions intermoleculares entre els dominis P són les forces originals per a la formació de la partícula P. Un pèptid de cisteïnes unit al final estabilitza la partícula P per formació de ponts disulfur intermoleculares. (B) Comparació del tall transversal de la partícula P proposada amb la imatge EM ampliada de la mateixa (Tan & Jiang, 2005a).

L'habilitat de purificar tant VLPs, a partir de cèl·lules d'insecte infectades amb baculovirus recombinants que expressen la VP1 i la

proteïna minoritària VP2 de la càpside, com partícules P, a partir de cultius de bacteries d'*E. coli*, ha sigut extremadament útil per a l'estudi dels NoVs, en absència de sistemes de cultiu cel·lular o models animals, permetent descobriments significants relacionats amb l'estructura dels NoVs i les interaccions virus-cèl·lula hoste (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002; Jiang et al., 1992; Prasad et al., 1999; Tan et al., 2003, 2005a, 2008; White et al., 1996).

També s'han produït VLPs de NoV a partir del sistema d'expressió del virus de l'encefalitis equina (VEE), permetent així una producció en cèl·lules de mamífer (Baric et al., 2002); però la producció en cèl·lules d'insecte de *Spodoptera frugiperda* amb el sistema d'expressió del vector de baculovirus (BEVS) presenta una sèrie de ventatges respecte a la utilització de cèl·lules de mamífer. Per altra banda, la producció de partícules P en bacteries com *E.coli* encara és un sistema més avantatjós que la producció de les VLPs, ja que són molt més fàcils de produir i de purificar, s'obtenen en poc de temps i són extremadament immunogèniques i estables a 4°C (Fig. 1.18).

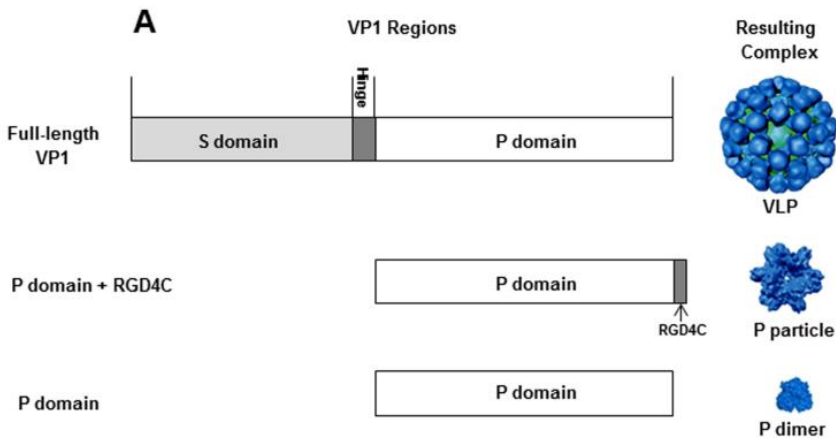


Figura 1.18. Comparació de l'estructura entre les VLPs i les partícules P. Il·lustració esquemàtica de la proteïna VP1 i el domini P i la seua corresponent formació dels complexos. La VP1 forma VLPs mentre que el domini P modificat amb el pèptid RGD4C (pèptid que conté cisteïnes en Ct per al genotip GII.4: CDCRGDCFC) i el domini P sense modificar, formen les partícules P i els dímers P, respectivament (Fang et al., 2013).

1.3.6. Diversitat genètica

Una de les principals causes de variabilitat genètica dels virus resideix en el tipus d'error assignat als seus enzims de replicació. Per als NoVs, com per a la majoria de la resta de virus d'ARN, aquest tipus d'error és molt elevat (10^{-3} substitucions de nt/lloc/any), associats principalment amb l'acumulació de mutacions puntuals a través de la naturalesa propensa a errors de l'ARN polimerasa-ARN dependent viral així com a la recombinació entre cepes de NoV co-circulants (Gallimore et al., 2007).

La diversitat genètica entre els NoVs en la proteïna principal de la càpside (VP1), ja que aquesta és la més variable, suggereix una extensa diversitat antigènica, però es tenen poques dades de com la

variabilitat en la VP1 definida per l'anàlisi de seqüència es tradueix a la variabilitat en la reactivitat antigènica (Lochridge et al., 2005).

Els NoVs mostren un ampli grau de variabilitat genètica. Membres dins d'un genogrup difereixen en un 45-61% dels seus gens de la càpside, els membres dins d'un genotip difereixen sobre el 14-44%, i les cepes dins d'un genotip difereixen entre un 0-14% (Zheng et al., 2006). Aquesta quantitat de variació intragènere és alta fins i tot en comparació amb altres gèneres de famílies de virus d'ARN. Aquest alt grau de variabilitat és, sens dubte, un factor que complica la immunitat protectora davant NoVs.

1.3.7. Nomenclatura dels NoV

Tradicionalment, als NoV se'ls ha assignat el nom del país o ciutat on eren descoberts juntament amb l'any del descobriment o de l'epidèmia. Però la falta d'un sistema de nomenclatura consens internacional i la definició del genotip, ha donat lloc a informes contradictoris sobre determinats genotips en la literatura (Kageyama et al., 2004; Zheng et al., 2006). Amb l'augment de la comprensió dels NoVs i la distribució mundial dels mateixos, l'establir una nomenclatura estandarditzada és fonamental per a permetre una eficient comunicació dels llinatges epidemiològicament importants.

Aquesta necessitat de normes de classificació comuns va ser reconeguda en la 4^a Conferència Internacional sobre els Calicivirus a Xile el 2010, on es va designar un grup de treball d'investigadors

internacionals en NoV per a què desenvoluparen estàndards pràctics i, així, aconseguir un sistema de nomenclatura i tipificació universal.

En el 2013, Kroneman et al., publicaren una actualització de la definició de genotips basada en la filogènia, ja que segons els seus estudis el mètode de “*pairwise distance*”, utilitzat fins el moment, donava lloc a una superposició d’aquestes distàncies tant dins com entre els diferents genotips (Kroneman et al., 2013).

Atenent a tots aquests fets, el nom de la soca s’hauria d’escriure de la següent manera:

hoste/	Hu (humà), Bo (boví), Mu (murí), Po (porcí), Ca (caní)
codi país (ISO)/ any de mostreig/	FR, DE, US, JP, etc 2004
genogrup i genotip (ORF1 i ORF2)/	GII.P4_GII.4 o GII.4 si sols es coneix la seqüència ORF2
nom de la variant	ciutat, si és necessari seguit del nombre de sèrie

Alguns exemples serien NoV GII/Hu/FR/2004/GII.P12-GII.3/Paris23 i NoV GII/Hu/GB/2010/GII.P4_GII.4_New-Orleans2009/London48, i si sols es coneguera la seqüència de la càpside seria NoV GII/Hu/FR/2004/GII.12/Paris25.

Les últimes actualitzacions estan publicades a la pàgina web de “Noronet”, les quals contempnen la conversió dels noms de les variants descrites segons la nova nomenclatura consens (Taules 3 i 4).

Introducció

Taula 3. Conversió dels noms de les variants de NoV GII.4

Nom antic	Nova nomenclatura consens
Bristol	Bristol 1993 (cluster no epidèmic)
Camberwell	Camberwell 1994 (cluster no epidèmic)
1996	US 95_96
2001	Kaiso 2003 (cluster no epidèmic)
2002	Farmington Hills 2002
2002CN	Lanzou 2002 (cluster no epidèmic)
2003 ¹	Asia 2003 ¹
2004	Hunter 2004
2006a	Yerseke 2006a
2006b	Den Haag 2006b
2007	Osaka 2007
2008	Apeldoorn 2007 (cluster no epidèmic)
2010	New Orleans 2009
NA	Sydney 2012 ²

1: Variant 2003/Asia 2003: recombinant de l'ORF2 d'un GII.4 i l'ORF1 d'un GII.P12

2: Variant Sydney 2012: recombinant de l'ORF2 d'un GII.4 i l'ORF1 d'un GII.Pe

Taula 4. Conversió dels noms del genotip segons l'ORF1.

Nom antic	Nova nomenclatura consens	Comentari
Tots	Afegir la P	GII.4 → GII.P4 ("P" de polimerasa)
GI.e	GI.P9	Genotip ORF1 del nou genotip GI.9 ORF2
GII.b	GII.P21	La regió ORF1 del nou genotip GII.21 (VP1) s'agrupa amb l'anteriorment definit genotip orfe ORF1 GII.b
GII.d	GII.P22	La regió ORF1 del nou genotip GII.22 (VP1) s'agrupa amb l'anteriorment definit genotip orfe ORF1 GII.d
GII.17	GII.P13	La VP1 dels genotips GII.P13 i GII.17 tenen el mateix genotip ORF1: GII.13
GII.19	GII.P11	Els genotips porcins de VP1 GII.11 i GII.19 tenen el mateix genotip ORF1: GII.P11

1.3.8. Aspectes clínics de les infeccions per NoV

1.3.8.1. Simptomatologia

Persones de qualsevol edat són susceptibles a la infecció per NoV, i les infeccions secundàries són prou comuns. La infecció en adults immunocompetents, generalment, té una incubació de 24-48 hores i es caracteritza per l'aparició repentina de vòmits, normalment associats amb diarrees. Altres símptomes que poden aparèixer, per norma general, poc greus, són nàusees, calambres abdominals, miàlgies i febra (Green et al., 2001). Habitualment, aquests símptomes solen desaparèixer als 2-3 dies, però estudis recents han demostrat que la mitjana de durada de la malaltia pot ser més llarga (4-6 dies) en pacients afectats durant brots en hospitals i en xiquets menors d'11 anys (Lopman et al., 2004b; Rockx et al., 2002).

Els vòmits són, relativament, més prevalents en els menors d'un any de vida, mentre que els xiquets majors d'un any solen tindre diarrea com a símptoma principal (Kaplan et al., 1982; Rockx et al., 2002). La febra sols apareix en el 37-45% dels casos i sol desaparèixer a les 24 hores (Kaplan et al., 1982; Wyatt et al., 1974).

L'enfermetat severa és rara, però sí que poden aparèixer complicacions inusuals en persones majors, en xiquets i en individus amb alguna immunodeficiència. Per exemple, els nadons i els nens petits poden desenvolupar gastroenteritis més greus després de la infecció per NoV, amb símptomes que duren fins a sis setmanes (Sakai et al., 2001; Murata et al., 2007; Kirkwood & Streitberg, 2008). A més, la infecció simptomàtica prolongada ha estat ben documentada

en els pacients trasplantats i altres individus immunodeprimits, amb símptomes que duren més de dos anys (Kaufman et al., 2003; Gallimore et al., 2006; Westhoff et al., 2009). De la mateixa manera, la infecció per NoV pot ser particularment greu en les persones de la tercera edat, fins i tot amb resultat de mort (Lopman et al., 2003, 2004b; CDC 2007).

L'abast complet de la morbiditat induïda pels NoVs a tot el món i en particular en els països en vies de desenvolupament ha estat difícil de determinar degut a diversos factors. En primer lloc, la detecció de NoV és difícil ja que aquests virus no es poden propagar en cultius cel·lulars i són genèticament molt variables, cosa que complica els assajos de detecció basats en la retrotranscriptasa (RT-PCR). En segon lloc, hi ha una manca de presentació d'informes a les autoritats de salut a pesar de la naturalesa aguda de la malaltia. Finalment, els programes de diagnòstic / vigilància nacional i internacional no estan estandaritzats, si està present en tots. En aquest sentit, una xarxa mundial de vigilància anomenada Noronet (<http://www.noronet.nl/noronet>) va ser recentment establerta per a observar possibles epidèmies de NoV en un esforç per limitar el seu abast. Els continus esforços d'aquest tipus seran fonamentals per definir la càrrega mundial de la malaltia causada pels NoVs.

1.3.8.2. Transmissió

Els NoVs són virus altament contagiosos i poden transmetre's mitjançant menjar o aigua contaminada, o pel contacte persona-persona directament (Goodgame, 2006). La majoria dels brots han

estat documentats en creuers, ambulatoris i escoles, hospitals, asils d'ancians, hotels i entre membres del servei militar (Hutson et al., 2004).

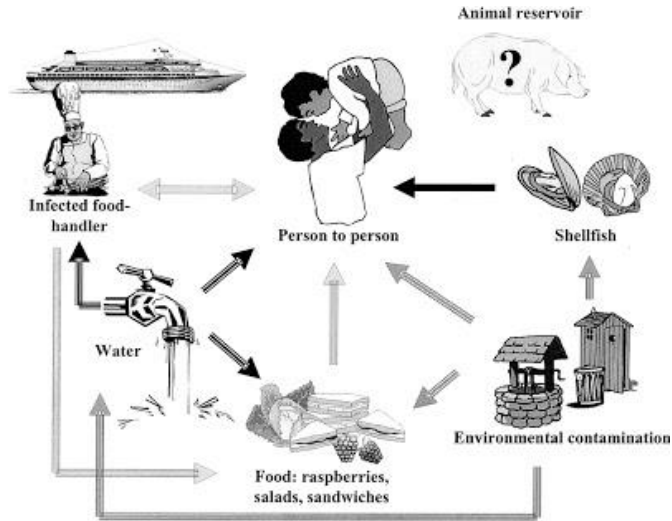


Figura 1.19. Principals vies de transmissió desl NoVs.

Generalment, la via de transmissió més important és la fecal-oral. La transmissió a través de vòmits infecciosos, tant la transmissió mecànica a través de la contaminació de les superfícies en contacte (per exemple, a través del contacte boca-mà) i fòmits de l'individu com l'aerosolització, podria explicar la ràpida i extensa propagació de l'enfermetat en llocs tancats (hotels, creuers, hospitals, etc.) (Widdowson et al., 2005). Sovint, els casos primaris en un brot són el resultat d'una exposició a menjar o aigua contaminada, mentre que el contacte persona-persona amb algun dels casos primaris, propaga l'epidèmia (Becker et al., 2000) (Fig. 1.19). Estan considerats per la

CDC (“*Centers for Disease Control and Prevention*”) com la principal causa de brots transmesos per aliments, de fet, nombroses característiques de les infeccions per NoV han donat lloc a la seua classificació en la Categoria B d’agents de biodefensa. Aquesta sèrie de característiques són (Patel et al., 2009):

a) Baixa dosis d’infecció necessària (<10 partícules virals (Teunis et al., 2008)).

b) Duració prolongada de l’excreció viral inclús després de la desaparició dels símptomes, incrementat el risc d’una segona propagació.

c) L’estabilitat del virus a concentracions relativament elevades de clor (Duizer et al., 2004) i a un ampli rang de temperatures (des de la congelació fins 60°C).

d) Poden tindre lloc infeccions repetides al llarg de la vida d’un individu amb reexposicions, probablement degut a la falta d’una completa protecció creuada contra les diverses soques de NoV i la inadequada immunitat a llarg termini.

En un estudi realitzat l’any 2012, es van analitzar 843 brots de NoV, reportats en 233 articles publicats, de 45 països entre gener de 1993 i juny de 2011. Entre aquests brots, 560 (66%) tingueren lloc en entorns comunitaris i 219 (26%) en hospitals i altres centres sanitaris, 370 (44%) havien sigut transmesos a través d’aliments i/o aigües contaminades i 136 (16%) persona a persona. Sobre la base d’un total de 71.724 casos (69.857 procedents de llocs diferents a hospitals), 501 hospitalitzacions i 45 morts, la taxa d’hospitalitzacions va ser de 54

per 10.000 casos, i les taxes de mortalitat de 6 de cada 10.000 casos (Desai et al., 2012).

1.3.8.2.1. Brots transmesos per aliments

La falta d'informes dels brots de NoV que es presenten arreu del món impedeix tindre un control exacte de les dades. Per exemple, en Anglaterra s'estima que el nombre de casos de gastroenteritis per NoV és 1.500 vegades superior al nombre de casos registrats (Cowden, 2002). Però es pot afirmar que els NoVs són els responsables de més del 90% de casos de gastroenteritis associats al consum d'aliments contaminats; fet que ha suposat que la Unió Europea els haja elegit, juntament amb el virus de l'hepatitis A, per al control específic de virus en aliments de risc.

Hi ha una gran diversitat d'aliments que poden ser vehicle per als NoVs, entre els quals tenen especial importància les ostres i els mol·luscs bivalvs, els entrepans, les amanides, les frambrueses i els pastelits (Cliver et al., 2006), bé per estar contaminats en origen o per haver-se contaminat durant el procés de preparació. Les ostres, mol·luscs i bivalves amb el seu sistema de filtrat concentren les partícules virals presents a l'aigua i al ser consumits després d'un tractament amb vapor, amb freqüència suposen un gran risc de transmissió de virus entèrics com els NoVs; per això es recomana que se sotmeten a un procés de cocció que arribe a una temperatura a l'interior del mol·lusc superior a 90°C durant 1'5 minuts com a mínim. (Hamano et al., 2005). Addicionalment, s'han d'emprar

mesures per evitar la contaminació dels mol·luscs en àrees de cultiu de bivalves, com la identificació de fonts de contaminació en les costes o la prohibició de l'abocament d'aigües fecals des de vaixells (Millard et al., 1987).

Els aliments que han estat preparats per un manipulador infectat i no se sotmeten a tractament tèrmic posterior, com els entrepans i amanides, o els aliments que es poden contaminar per rentar amb aigua que conté material fecal, com fruites i verdures crues envasades, també poden ocasionar brots (Parashar et al., 2001; Sala et al., 2005).

La contaminació dels aliments a partir d'un manipulador que no ha complert amb les normes higièniques és molt difícil d'evitar, ja que l'excreció del virus en una persona infectada pot produir-se abans d'iniciar-se els símptomes (Goller et al., 2004), i quan roman asimptomàtic o amb símptomes molt lleus (Hedberg & Osterholm, 1993; Gallimore et al., 2004). Aquesta excreció pot prolongar-se, fins i tot, setmanes o mesos després de la recuperació (Kaufman et al., 2003).

Estudis elaborats per diversos autors indiquen que el consum de marisc ocasiona la majoria de brots per NoV, brots que es podrien evitar si s'incorporaren nous paràmetres com a indicadors de seguretat en els aliments. També cal tindre en compte que el consum de fruites i vegetals crus envasats va augmentant, i aquests aliments poden provindre de llocs on s'estiguen utilitzant aigües residuals per al reg.

La detecció de NoV en els aliments és complexa, ja que es necessiten grans volums de mostra i perquè la baixa dosi infectant requereix proves molt sensibles per a detectar la presència del virus. A més, cal recordar, que no es disposa d'un sistema de cultiu cel·lular per a NoV humans. Mètodes com la ME o els assaigs de EIAs requereixen almenys una concentració de 10^5 - 10^6 partícules víriques per mil·lilitre, nivells molt superiors a les dosis infectives de 10 partícules víriques, el que fa necessaris mètodes diagnòstics més sensibles com per exemple ho és la RT-PCR (Green et al., 1998; Vinjé et al., 2004; Jothikumar et al., 2005; Morton et al., 2009) o ja mètodes més avantguardistes com la qRT-PCR (Fuentes et al., 2014).

1.3.8.2.2. Brots transmesos per aigua

Aquests tipus de brots són menys freqüents que els propagats per aliments, però s'han descrit alguns brots per consum d'aigua procedent de la xarxa de distribució pública, pous, fonts o gels comercials i alguns relacionats amb el bany en llacs i piscines (Hedberg & Osterholm, 1993). Per exemple, als Estats Units, durant el període 2000-2004, d'un total de 226 brots de gastroenteritis per NoV estudiats, només 12 (5%) van ser transmesos per aigua (Blanton et al., 2006).

La contaminació de les aigües de consum o recreatives pot ser resultat de filtracions en el sistema de clavegueram, en inundacions i pluges torrencials o defectes en el sistema de cloració (Bosch A, 1998; CDC, 2005).

Fins fa poc, els mètodes analítics no permetien detectar la presència de NoV a l'aigua, pel que s'utilitzava, com a mètode d'aproximació, la detecció de microorganismes indicadors de contaminació fecal com el recompte de coliformes (Parashar et al., 2001). Per aquest motiu, el primer brot documentat en el qual es va detectar NoV a l'aigua es remunta a 1997 (Beller et al., 1997). Actualment les tècniques de RT-PCR es poden aplicar per avaluar la contaminació de l'aigua, però és necessària la concentració de grans volums per poder detectar la presència del virus (Bosch et al., 2006; Rodríguez-Díaz et al., 2009).

1.3.8.2.3. Brots transmesos de persona a persona

Moltes vegades, els casos primaris d'un brot de GEA per NoV és el resultat d'una exposició a menjar o aigua contaminada, mentre que el contacte persona-persona entre els casos primaris, propaga l'epidèmia (Becker et al., 2000). Per aquest motiu, i donada la baixa dosi infectant i l'elevada resistència medioambiental dels NoVs, apareixen brots importants en institucions tancades com hospitals, creuers, guarderies o asils d'ancians. Tant si l'origen del brot, en alguna d'aquestes institucions, és el consum d'algun aliment contaminat com si és el contacte directe amb algun membre de la comunitat que estiguera excretant virus (abans, durant o després de les manifestacions clíniques), la transmissió de la infecció als treballadors, i especialment a altres interns, és molt freqüent.

Quan aquests brots es produeixen en un hospital o centre sociosanitari les repercussions són majors, ja que les persones ingressades tenen major risc de sofrir complicacions (Mattner et al., 2006), així com també de la importància del cost econòmic que es deriva.

A banda del contacte directe persona a persona a través de la boca o les mans, aquest tipus de transmissió també inclou les superfícies contaminades amb excrements o partícules aeorolitzades procedents dels vòmits, i els objectes personals de les persones infectades. Tant sols unes poques partícules virals (desenes) són suficients per a què una persona susceptible pugui infectar-se (Evans et al., 2002).

1.3.8.3. Patogènia

A causa de la falta d'un sistema de cultiu cel·lular i la històrica manca de models animals per a les infeccions per NoV, el nostre coneixement sobre la patogènesi de la infecció prové principalment a partir d'estudis histològics, bioquímics i immunològics en voluntaris humans i pacients infectats. En els últims anys, a més, treballs en l'espècie porcina, bovina i en models murins també han començat a contribuir en la nostra comprensió de la patogènesi dels NoVs. De fet, recentment s'ha publicat un treball en ratolins ("*mouse model*") que demostra que aquests són susceptibles a una infecció subclínica per NoV humans, demostrada per la presència tant de proteïnes no estructurals com proteïnes de la càpside en cèl·lules infectades i per l'augment dels títols genòmics respecte l'injectat (Taube et al., 2013).

Encara que queden molts aspectes per aclarir, suposa un avanç molt important per a poder continuar amb l'estudi de la infecció per NoV i dissenyar teràpies funcionals.

Els NoVs infecten als humans per la via oral i com a virus àcid-estables passen a través de l'estòmac i es pensa que es repliquen en l'intestí prim. L'anàlisi histològic de les mostres de biòpsia d'intestí pròxim dels estudis realitzats amb voluntaris que es posen malalts després de l'administració de NoV GI (Norwalk, GI.1) o GII (Hawaii, GII.1), demostren una mucosa intestinal intacta amb canvis histològics específics. Aquests canvis inclouen l'ampliació, escurçament i allisament de les microvellositats, hipertròfia de les criptes intestinals, engrandiment dels mitocondris, augment de la vacuolització citoplasmàtica, edema intercel·lular i inflamació de la mucosa, així com també la mala absorció transitòria de les grasses i de la lactosa degut a una disminució de l'activitat dels corresponents enzims (Dolin et al., 1975; Schreiber et al., 1973). Les biòpsies de voluntaris asimptomàtics també presentaven aquests tipus de lesions. A banda dels canvis en els enteròcits, també s'observa una infiltració inflamatòria lleu en la làmina pròpia, descrita també en vedells gnotobiòtics infectats amb el NoV humà GII.4 HS66 (Souza et al., 2008), i en ratolins infectats amb el NoV murí 1 (MNV-1) (Mumphy et al., 2007). Mentre que totes aquestes lesions intestinals específiques s'observen durant el desenvolupament de l'enfermetat, que es manifesten en forma de diarrea i vòmits principalment, es resolen completament dins de les dues setmanes següents.

1.3.9. Epidemiologia

L'estudi dels brots de gastroenteritis, entenguent per "brot" l'existència de dos o més persones que presenten una clínica similar sempre que estiguen relacionades epidemiològicament, permet destacar la importància que tenen els NoVs com a agents causals i, a més, permet conèixer el mecanisme de transmissió pel qual s'ha arribat a produir el brot, fet que no ocorre amb els casos esporàdics. Així mateix, no es pot obviar que els brots representen sols la part més xicoteta de tots els casos, ja que sols s'inclouen exclusivament els que han consultat amb els serveis sanitaris, que s'han pogut relacionar epidemiològicament, que s'han notificat als serveis de salut pública i que finalment han sigut investigats.

Els brots de NoV ocorren amb major freqüència en les comunitats semi-tancades, com ara llars d'avis, escoles, hospitals, creuers, llocs de socors / evacuació de desastres, i en la milícia (Fig. 1.20) (Fankhauser et al., 1998). Encara que aquest tipus de brots tenen lloc durant tot l'any, en climes templats el nombre de brots és notablement major en els mesos de més fred, d'ahí també coneguts com la malaltia dels vòmits d'hivern (Rohayem, 2009). Hi ha diversos factors que més contribueixen probablement a la naturalesa explosiva dels brots causats per NoV, incloent l'alta infectivitat de les partícules (Teunis et al., 2008), la persistència en el medi ambient, l'alliberament prolongat de virus a partir tant d'individus simptomàtics com d'individus asimptomàtics (Atmar et al., 2008), i la manca d'una immunitat a llarg termini.

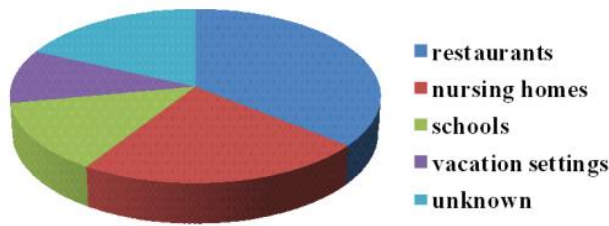


Figura 1.20. Principals llocs d'infeccions degudes a NoV, segons dades del “Centers for Disease Control and Prevention” recollides entre juliol de 1997 i juny del 2000.

En el 2002, tingué lloc un fort augment dels brots de NoVs a tot el món i es va correlacionar amb l'aparició d'una nova variant del virus, especialment en GII.4 (Lopman et al., 2004a). Curiosament, els investigadors han determinat que variants de GII.4 van donar lloc a les pandèmies dels anys 1995-1996 (US95/96) (White et al., 2002), 2002 (Farmington Hills) (Widdowson et al., 2004), 2004 (Hunter) (Bull et al., 2006), i 2006 (Den Haag/2006b i Yerseke/2006a) (Tu et al., 2008) (Fig. 1.20).

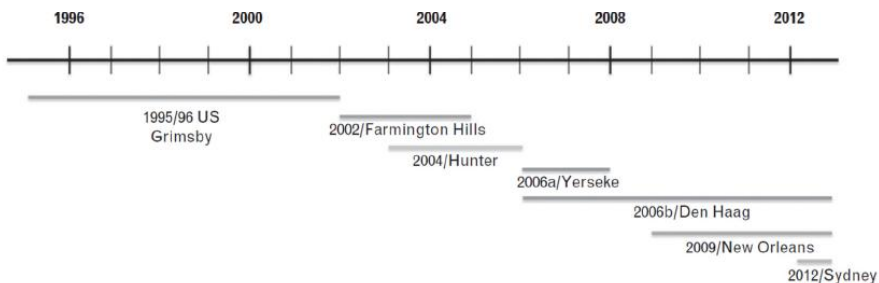


Figura 1.20. Esquema temporal de les variants GII.4 de NoV associades a epidèmies globals de gastroenteritis. Des de 1990 fins el 2013 les variants epidèmiques descrites són US95/96 en el 1996, Farmington Hills en el 2002, Hunter en el 2004, Yerseke_2006a i Den Haag_2006b en el 2007-08, Nova Orleans_2009 en el 2009-2012 i Sydney_2012 a finals del 2012 (Adaptat de Ramani et al., 2014).

Aquestes variants de GII.4 es propaguen ràpidament en el món sencer i es creu que representen el 70-80% de tots els brots de NoV, almenys des de l'any 2002 (Siebenga et al., 2009). Un estudi recent demostra variants de GII.4 associades amb malaltia severa que ja circulava en 1974, i que la soca ancestral més probable sorgiria en la dècada dels 60 (Bok et al., 2009). No està clar per què les variants de NoV GII.4 són tan predominants, però les possibilitats inclouen l'augment de l'estabilitat en el medi ambient, la transmissibilitat i la virulència (Friesema et al., 2009).

L'any 1982, Kaplan i col., partint de la base de què no es disposava de proves diagnòstiques adequades per a establir l'etiologia dels brots de gastroenteritis que podien estar causats per NoV, va desenvolupar un conjunt de criteris clínics i epidemiològics que permeteren distingir aquests tipus de brots dels d'etiologia bacteriana. Aquests criteris són la presència de vòmits en més del 50% dels afectats, un període d'incubació mitjà de 24 a 48 hores, una duració mitjana de l'enfermetat de 12 a 60 hores i absència d'agents bacterians o parasitaris (Kaplan et al., 1982).

1.3.9.1. Situació a nivell europeu i a nivell mundial

L'any 1999 es va constituir la Xarxa Europea de Vigilància d'Infeccions Víriques Transmeses per Aliments (FBVE, "*Foodborne Viruses in Europe*"), una xarxa de viròlegs i epidemiòlegs de 13 països europeus, que comparteixen dades de la vigilància i la investigació sobre les infeccions de virus entèrics, centrant-se principalment en els NoVs. Des d'aquest any la xarxa FBVE ha

mantingut una base de dades comuna en la qual els membres han compartit les seves dades. En primer lloc una base de dades conjunta va ser feta per als brots de transmissió alimentària causades per diferents virus. Però en el 2008, l'ús d'un nou programari, bases de dades independents es van establir per a diferents patògens, i NoV forma una d'elles.

NoroNet és una continuació de la xarxa FBVE, i segons l'últim estudi realitzat per aquesta plataforma entre l'01-01-2010 i el 09-04-2013 (Van Beek et al., 2013), a escala mundial, el percentatge de predomini tant de casos esporàdics com de brots de gastroenteritis causades per NoV, en el període estudiat (2010-2013), varia del 0.02% (Itàlia o Eslovènia) a l'aproximadament 40% (Països Baixos) (Taula 5).

El 8% de totes les seqüències de NoV enviades pertanyen a NoV GI; sent el GI.Pb, GI.P4 i GI.P7 (segons la seqüència de la polimerasa), i GI.4, GI.3 i GI.6 (càpside) els genotips més freqüents. Mentre que la gran majoria (92%) pertanyen a GII.

A més del GII.P4, els genotips més freqüents van ser GII.Pe, GII.Pg i GII.P7 (polimerasa) i GII.6, GII.1, GII.3 (càpside). L'augment de GII.Pe en 2012 va ser probablement causat per l'aparició de la nova variant GII.4-Sydney_2012.

Taula 5. Nombre de brots i casos esporàdics de NoV per país i per any (Adaptat de Van Beek et al., 2013).

País	2010	2011	2012	2013	Total
AUSTRÀLIA			2		2
AUSTRIA	54	32	16		102
BÈLGICA	14	6	28		48
XILE			4		4
XINA		77			77
DINAMARCA	11	23	28		62
FINLÀNDIA	283	94	61	6	444
FRANÇA	215	204	146		565
ALEMANYA	50	62	74	8	194
HONG KONG			3	1	4
HUNGRIA	91	83	48	5	227
IRLANDA	7		4		11
ITÀLIA	1				1
JAPÓ	41	24	84	11	160
PAÏSSOS BAIXOS	662	491	460	72	1685
NOVA ZELANDA			216	34	250
FEDERACIÓ RUSSA		6	20	5	31
ESLOVÈNIA			1		1
SUD ÀFRICA	34	53	14	4	105
ESPANYA	61	36	23		120
SUÈCIA	24	64	32		120
REGNE UNIT	9	6			15
Total	1557	1261	1264	146	4228

Tots els grups de NoV indicats en la figura 1.21 estan presents al llarg de tot l'any. Els pics situats a l'hivern (hemisferi nord) es deuen principalment a GII.4 i, a l'hivern del període 2012/2013, aquest genotip va ser complementat amb GII.Pe, però altres GII i en menor mesura GI, també apareixen elevats en la temporada d'hivern.

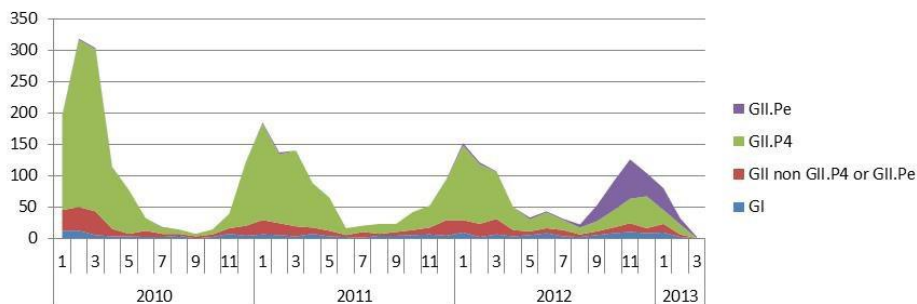


Figura 1.21. Distribució mensual de casos de NoV GI, GII i GII diferents a GII.P4 o GII.Pe, al llarg del període d'estudi (2010-2013), basada en les seqüències de la polimerasa (Van Beek et al., 2013).

A nivell de la polimerasa, la variant que va predominar al llarg dels anys d'estudi va ser la New Orleans_2009, arribant a disminuir fins el 50% en l'any 2013 per l'aparició del genotip GII.Pe, amb el qual compartia l'altre 50% dels casos (Fig. 1.22). La mateixa tendència es pot observar seqüenciant els gens de la càpside, predomini de la variant New Orleans_2009, però amb una clara superposició de la variant Sydney_2012 a finals del 2012 (Fig. 1.23).

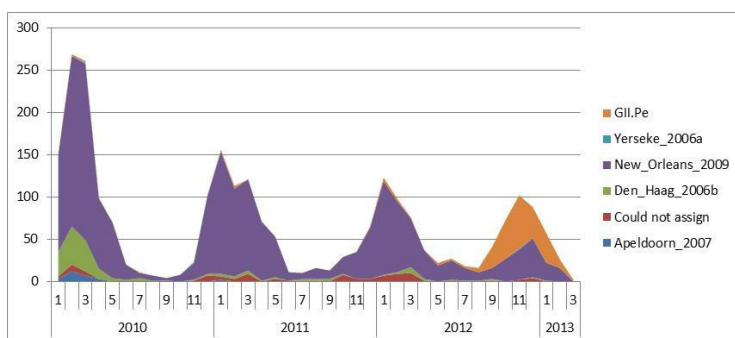


Figura 1.22. Distribució mensual per anys dels casos de NoV de la variant GII.P4 basats en les seqüències de la polimerasa (Van Beek et al., 2013).

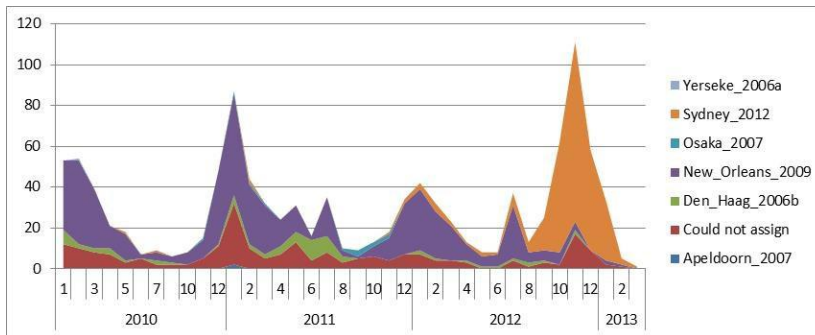


Figura 1.23. Distribució mensual per anys dels casos de NoV de la variant GII.P4 basats en les seqüències de la càpside (Van Beek et al., 2013).

L'última variant reconeguda ha sigut la GII.4-Sydney_2012, segons la seqüència de la càpside, reportada principalment per Nova Zelanda, Japó i França. Aquesta variant s'ha detectat aproximadament 2 mesos abans en comparació amb altres variants de GII.4 de temporades anteriors, encara que cal remarcar que en Nova Zelanda (hemisferi sud) l'estacionalitat de NoV segueix un patró diferent en comparació amb altres països.

Per altra banda, estudis duts a terme en EUA (Hall et al., 2011) també conclouen que NoV és la principal causa de GEA, encara que amb una prevalència molt més baixeta (12%).

1.3.9.2. Situació a Espanya

La prevalència de NoV com a causa de gastroenteritis esporàdiques ha estat pobrament estudiada i probablement subestimada tant en Espanya com en la resta del món. Per exemple, en Espanya, no es realitza de forma rutinaria anàlisis virològics en casos de gastroenteritis, amb l'excepció d'enzimoinmunoassaigs (EIA) per

a RV i AdV (Manso et al., 2013). Altres causes d'aquesta subestimació són la percepció general de què les gastroenteritis provocades per NoV són considerades com a enfermetats autolimitants que no requereixen atenció mèdica, a pesar de què s'han reportat alguns casos d'enfermetat severa i morts (Widdowson et al., 2005; Harris et al., 2008; Rondy et al., 2011; Scallan et al., 2011) i, principalment, perquè la majoria dels pacients amb gastroenteritis no acudeix al metge.

Atenent a aquestes puntualitats, en Espanya sols es disposa de pocs estudis recents relacionats amb els brots de gastroenteritis produïts per NoV; entre els quals destaquen els realitzats en la zona est d'Espanya (Buesa et al., 2002, 2008), en Guipúscoa (nord d'Espanya) (Arana et al., 2013) i l'estudi del nord-oest d'Espanya (Manso et al., 2013). Tots aquests treballs coincideixen amb que la majoria de casos de GEA per NoV foren durant els mesos de més fred, consistent amb els estudis previs realitzats relacionats amb l'estacionalitat de NoV en climes templats (Mounts et al., 2000).

En l'estudi realitzat a Catalunya i València entre gener del 2001 i desembre del 2006, dels 194 brots estudiats de GEA no bacteriana, es va identificar als NoVs en el 87.1% d'ells. El genotip més comú era el GII.P4 (71.9% de les cepes caracteritzades), a l'igual que en la resta del món. A banda, dins d'aquest període es van anar succeint 5 variants genètiques d'aquest genotip GII.P4, identificades com a les variants US95/96, Farmington Hills_2002, Hunter_2004, Yerseke_2006a i Den Haag_2006b (Buesa et al., 2008).

A Guipúscoa, de totes les mostres analitzades, el 1'7% foren brots de GEA causats per NoV GI i el 98'3% per GII. Segons les seqüències de la càpsida de GII, es detectaren 7 genotips diferents: GII.4 (73%), GII.3 (23%), GII.6 (1%) i altres (3%). Les cepes de GII.4 predominaren durant els 4 anys d'estudi (2009-2012), tant en xiquets com en adults, sent la variant Minerva (EUA 2006) la predominant durant el 2009, la New Orleans (EUA 2010) durant el 2011 i la nova variant Sydney (Austràlia 2012) des d'agost del 2012. Les cepes de GII.3 principalment es detectaren en xiquets d'un any en 2009 i 2012 (Arana et al., 2013).

Per últim, a diferència dels dos estudis anteriors, en el treball realitzat a Galícia durant el període 2010-2011, es va detectar que un 15'7% de les mostres analitzades corresponien a gastroenteritis causades per NoV GI, mentre que un 10'5% foren causades per GII. Aquest estudi està en desacord amb la majoria d'estudis d'epidemiologia molecular que demostren un domini del GII sobre el GI a nivell mundial. Per altra banda, es tracta d'una dada important ja que està descrit que NoV GI està més relacionat amb brots transmesos per menjar o aigua contaminada, degut a la seua major resistència a la degradació durant el tractament de les aigües residuals (Le Guyader et al., 2006; Da Silva et al., 2007). Però, tots els casos incluits en aquest estudi estan considerats com a casos esporàdics per la falta de dades epidemiològiques recollides a l'hospital, la qual cosa dificulta el poder establir una correlació entre el desenvolupament de l'enfermetat i la font de la infecció (Manso et al., 2013).

1.3.10. Immunitat

La immunitat causada per NoV es complica per les respostes heterogènies de la població humana i la naturalesa transitòria de la immunitat en alguns individus. Degut a la falta d'un model animal adequat i, principalment, a la impossibilitat de cultivar NoV, la gran majoria de les dades de patogènesi i d'immunologia s'han recollit principalment d'estudis amb voluntaris humans (Agus et al., 1973; Johnson et al., 1990; Parrino et al., 1977; Wyatt et al., 1974). De manera que els estudis d'immunitat sobre aquests virus poden dividir-se en 3 períodes: el temps antic (1972-1978) on predominaven els estudis sobre voluntaris humans; el temps intermedi (1978-1990) amb el desenvolupament dels "mètodes immunològics en fase sòlida" i el temps modern (1990 fins l'actualitat) que coincideix amb la possibilitat de produir VLPs i partícules P i, per tant, sèrums hiperimmunes (Matsui & Greenberg, 2000).

Del temps antic es pot concloure que els voluntaris infectats amb inòculs de virus homòlegs procedents de mostres de femta de pacients infectats, desenvolupaven una immunitat de vida curta, entre 6 i 14 setmanes després de l'exposició inicial (Johnson et al., 1990; Parrino et al., 1977; Wyatt et al., 1974) i una immunitat a llarg termini no pareixia tindre lloc després d'una única exposició al virus en qüestió. Per altra banda, els estudis de voluntaris també demostraren que un grup d'individus permaneixia sense infectar-se, inclús després de repetides exposicions (Gary et al., 1987; Parrino et al., 1977; Wyatt et al., 1974).

Durant el temps intermedi es desenvoluparen proves més sensibles que confirmaren els resultats del temps antic. Aquests estudis demostraren que la presència d'anticossos en el sèrum no es correlacionava, necessàriament, amb la resistència a les infeccions, en particular en els xiquets (Green et al., 2001).

Per últim, els estudis del temps modern han posat de manifest que la resistència als NoVs és multifactorial, implicant factors genètics particulars. Els estudis realitzats suggereixen que el genotip de l'hoste és el factor principal en el desenvolupament de la infecció per NoV.

1.3.10.1. Resposta humoral

La immunitat a curt termini, com s'ha comentat abans, està ben establida per al cas dels NoVs GI.1 (variant Norwalk) (Parrino et al., 1977). En canvi, l'existència d'una immunitat duradera és més controvertida, encara que múltiples estudis han trobat respostes protectores contra GI.1 sis mesos després del pas de l'enfermetat en alguns individus (Johnson et al., 1990; Reeck et al., 2010).

La informació disponible d'infeccions secundàries per NoV en humans recolza un patró atípic de la immunitat en què alguns individus exposats anteriorment són susceptibles a les infeccions repetides.

Un altre subconjunt dels individus és resistent a la infecció, presumiblement a causa de la resistència genètica o a la immunitat

preexistent. Una possible explicació per a la susceptibilitat continuada d'aquest subconjunt d'individus és el no poder generar una resposta immune virus-específica a la infecció per NoV. No obstant això, les dades recopilades de molts estudis de voluntaris humans i de brots de NoV naturals, concloentment, demostren que les persones desenvolupen una resposta d'anticossos virus-específica i que la presència d'aquesta resposta no es correlaciona amb la protecció (Parrino et al., 1977; Cukor et al., 1982; Baron et al., 1984). Específicament, la IgG sérica específica per a NoV s'indueix i persisteix durant mesos després de la infecció, mentre que la IgA i les respostes d'IgM són de vida més curta. La IgA de la mucosa també s'indueix, però la seva durada no ha estat determinada (Agus et al., 1974).

Aquestes respostes d'IgA de la mucosa contra el virus de Norwalk indiquen que una resposta primerenca d'IgA salival (dies 1-5) està correlacionada amb la protecció de la infecció en persones susceptibles, el que suggereix que l'exposició a cepes anteriors podria suscitar una resposta de memòria protectora contra el NoV en qüestió (Lindesmith et al., 2003).

Els anticossos sèrics anti-NoV GI i GII són elevats en el sèrum de la fase aguda, mentre que patrons de reactivitat creuada són genogrup específics (Reeck et al., 2010; Lindesmith et al., 2010). Sèrums de brots de GI tenen reactivitat creuada i bloquegen dins del mateix genogrup i, de vegades, inclús són més alts per a una cepa heteròloga després de la infecció (Lindesmith et al., 2010), però

aquesta resposta bloquejant no s'exten per als NoVs GII (Cannon et al., 2009). Per contra, els sèrums contra els brots GII proporcionen respostes molt més elevades front a genotips homòlegs i no una resposta de bloqueig àmplia per a tot el genogrup GII (Rockx et al., 2005).

Aquests estudis són complicats per la complexa recopilació de les històries de preexposició en les poblacions humanes, juntament amb un pobre entendiment de les relacions serològiques entre les diferents cepes. Utilitzant sèrum de ratolí front a una sola cepa, la reactivitat dins dels genotips de GI és d'aproximadament el 5-10% de la resposta homotípica i és menys d'un 5% entre genogrups (LoBue et al., 2006). Mentre que l'exposició simultània de ratolins o conills a múltiples soques impulsa significativament respostes d'anticossos de reactivitat creuada, el que suggereix que complexos patrons de reactivitat creuada podrien existir dins dels múltiples genotips GI o GII o que repetides i/o exposicions multivalents seleccionarien anticossos d'alta afinitat que tolerarien la variació dins dels epítops descrits (LoBue et al., 2006; Parra et al., 2012).

Per tant, es pot concloure que encara que hi ha una evidència limitada de què existeixen epítops que induirien una reactivitat creuada en GII (Cannon et al., 2009), aquests epítops serien més comuns per a cepes de GI, explicant la freqüència reduïda observada en la població en general de brots de GEA causats per NoVs GI (Lindsmith et al., 2010).

1.3.10.2. Resposta cel·lular

Si bé no s'han realitzat estudis directes de les respostes de cèl·lules T a la infecció per NoV humans, estudis de citocines suggereixen que les cèl·lules T específiques de NoV també s'indueixen en els individus infectats. En un estudi realitzat per Lindesmith i col., les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) es van obtenir de voluntaris infectats per NoV GII.2 pre- i post-episodi, es van incubar amb les VLPs de NoV, i es va mesurar la secreció de citocines produïdes per aquests (Lindesmith et al., 2005). S'observaren augments en les citocines d'IFN γ i IL-2 (típiques de la resposta tipus Th1 dependent de CD4), així com la citocina IL-5 de respostes Th2. Cal destacar, però, que es va observar un augment similar en els nivells de citocines a partir de PBMCs pre- i post-episodi d'individus no infectats, fet que suposadament indica que els controls d'aquest estudi van ser exposats prèviament a alguna infecció natural per NoV. Aquesta troballa posa de manifest la dificultat d'estudiar respostes immunitàries primàries als NoVs humans on les històries d'infecció són impossibles de discernir.

Estudis recents realitzats amb models de vedella i porc gnotobiòtic infectats amb una cepa GII.4 de NoV humà, també reporten augments moderats de diverses citocines Th1 i Th2, així com interferó en sèrum i en el contingut intestinal dels animals infectats, suggerint una resposta mediada per cèl·lules T després d'una infecció primària (Souza et al., 2007a; Souza et al., 2008).

Un treball més actual realitzat per Ponterio i col., utilitzant també PBMCs de pacients asimptomàtics estimulats amb VLPs de GII.4, observen resultats similars que suggereixen que, tot i que un estat inicial caracteritzat per la producció de IL-6, una estimulació prolongada pot induir a les cèl·lules T viables a produir IFN- γ , el que implica que les VLPs de NoV poden activar cèl·lules T autòlogues (Ponterio et al., 2013).

1.3.11. Susceptibilitat de l'hoste i factors genètics dels NoVs que influeixen en aquesta

En les dècades anteriors, la majoria del coneixement sobre les infeccions per NoV provenien dels estudis realitzats d'epidemiologia de brots naturals i d'estudis amb voluntaris. D'aquests estudis es confirmava que algunes persones eren resistentes a la infecció pel virus Norwalk, però, es desconeixia el factor(s) responsable d'aquesta resistència o susceptibilitat a la infecció per aquest virus.

Un dels passos importants en aquest tema, va ser el descobriment de què el calicivirus productor de l'enfermetat hemorràgica del conill (RHDV) s'unia a antígens de la família del grup histo-sanguini ABH (Ruvoen-Clouet et al., 2000), presents en la saliva, la mucosa gastroduodenal i en els glòbuls rojos, el qual va servir per a demostrar que els NoV humans també es fixen a aquests tipus d'antígens. Concretament, el RHDV s'uneix a les cèl·lules epitelials de conill a través del reconeixement específic del trisacàrid histosanguini H tipus 2.

Els primers estudis realitzats amb NoV humans per a estudiar la relació que existia entre el fenotip ABH de l'individu i el risc d'infecció pel genotip NV i posterior enfermetat simptomàtica, es dugueren a terme sobre l'any 2002.

Hutson i col. publicaren el primer article sobre l'associació entre el fenotip ABO d'un individu i la seva susceptibilitat a un patogen viral intestinal. Utilitzaren filtrats de NV que suministraren als voluntaris, i obtingueren uns resultats que suggerien que els individus amb un fenotip O presentaven un augment de la susceptibilitat a la infecció pel NV i els que expressaven l'antigen de tipus B eren més resistents al mateix tipus d'infecció i enfermetat simptomàtica (Hutson et al., 2002). Aquests resultats estaven d'acord amb el mecanisme d'associació entre el fenotip ABO i la susceptibilitat que també utilitzen altres patògens d'orige bacterià.

Altre estudi va ser realitzat per Marionneau i col., també a l'any 2002, utilitzant cèl·lules Caco-2, cèl·lules que provenen d'un carcinoma humà colorectal i que mantenen l'habilitat de diferenciar-se espontàniament en xicotets enteròcits intestinals després de la confluència. A banda, aquestes cèl·lules Caco-2 diferenciades (D-Caco-2) també expressen carbohidrats de la família del grup dels antigens histosanguinis (HBGAs) en la seua superfície (Amano et al., 1999). El seu objectiu era investigar si, per analogia amb el RHDV, les VLPs de NV també s'unien al mateix tipus de carbohidrats i si aquesta unió permetia la internalització de les partícules en cèl·lules gastroduodenals humanes. Els seus resultats mostraren que les VLPs

utilitzades s'unien a les cèl·lules mitjançant el reconeixement dels oligosacàrids H tipus 1 o 3 i 4, pas que podria actuar com a primari en la infecció viral. A més, després de la unió, aquestes partícules eren internalitzades (Marionneau et al., 2002).

Aquests dos estudis es realitzaren amb el NV que pertany al GI, mentre que el treball realitzat per Harrington i col. també estudia el comportament de dos genotips del GII, el Snow Mountain (SMV) (GII.2) i el Hawai (HV) (GII.1), per a veure si també seguien el mateix patró d'unió que el NV als oligosacàrids del tipus H. Els resultats obtinguts confirmaren que el NV s'unia a salives de tots els grups sanguinis excepte el B, i als antígens H tipus 1 i tipus 3 i, a més, a Le^b; mentre que el SMV i el HV seguien un patró diferent. El SMV s'unia a individus de grup sanguini B i AB i el HV no s'unia a cap saliva. D'ací es va concloure que la susceptibilitat a les infeccions per NoV podria estar marcada pel grup sanguini i l'estat secretor dels individus, a més d'un possible tercer mecanisme d'unió que determinaria la unió de genotips com el HV que no segueix cap dels patrons anteriors (Harrington et al., 2002).

A partir d'ací s'ha demostrat que altres membres de la família dels calicivirus (FCV, NoV murí i NoV boví) també s'uneixen als carbohidrats. FCV infecta el tracte respiratori superior mitjançant la unió a àcids siàlics units per enllaços $\alpha 2,6$ (SA) i la molècula-1 d'adhesió per a la internalització (Makino et al., 2006; Stuart & Brown, 2007). El NoV murí MNV-1 s'uneix a àcids siàlics terminals de macròfags murins primaris (Taube et al., 2009), concretament al

terminal del gangliòsid GD1a, i el NoV boví s'uneix a un sucre que té un motiu semblant a l'antigen del grup sanguini B. El prototip Bo/Newbury2/76/UK (NB2) s'uneix molt específicament a l'epítip α -Gal present en la superfície de l'intestí prim de les vaques (Zakhour et al., 2009).

1.3.11.1. Antígens del grup histosanguini i NoV

Els antígens del grup histo-sanguini humà (HBGAs) són carbohidrats complexos units a la part més externa de N- o O-glicans de moltes glicoproteïnes o glicolípidis presents en les cèl·lules epitelials del tracte gastrointestinal i respiratori, en les superfícies dels glòbuls rojos i com a antígens lliures en fluids corporals tals com la saliva, la sang, la llet i els continguts intestinals.

La seva síntesi requereix de diverses glicosiltransferases codificades per les famílies dels gens ABO, Lewis i secretors, altament polimòrfiques, que actuen sobre oligosacàrids precursors. Hi ha quatre tipus principals de precursors, que són generalment reconeguts perquè tenen en comú una galactosa terminal amb un enllaç β ja siga una N-acetilglucosamina (tipus 1: galactosa (Gal) β N-acetilglucosamina β -R , i el tipus 2 Gal β 1-4 N-acetilglucosamina β -R) o una N-acetilgalactosamina (Tipus 3: Gal β 1-3 N-acetilgalactosamina α -R, i tipus 4: Gal β 1-3 N-acetilgalactosamina β -R). Aquests precursors es converteixen en estructures antigèniques del tipus H per fucosilació en un enllaç α 1,2, pas catalitzat per una α 1,2 fucosiltransferasa per a la qual, en humans, s'han clonat 2 gens i s'han anomenat FUT1 (enzim H) i FUT2 (enzim Se).

L'antigen H (Fuc- α 1-2Gal), com per exemple l'antigen del tipus O, es genera a partir de la transferència d'un grup de fucosa (Fuc) a un residu de galactosa (Gal) en l'enllaç del tipus α 1-2. Els antígens A (GalNAc α 1-3(Fuc- α 1-2)Gal) i B (Gal α 1-3(Fuc- α 1-2)Gal) del grup ABH dels HBGAs es generen per transferència de una GalNAc i una Gal, respectivament, en l'enllaç α 1,3 a una estructura "core" de les estructures H que contenen els 4 possibles precursors. En aquest cas, el pas està catalitzat pels productes d'enzims dels al·lels A i B del locus ABO (Fig. 1.24).

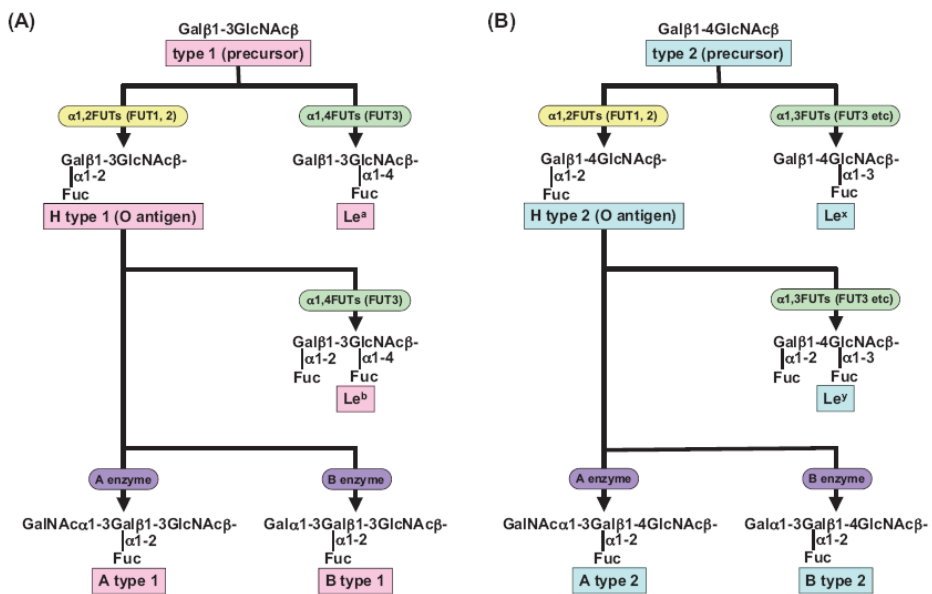


Figura 1.24. Diagrama de les estructures dels carbohidrats tipus 1 i 2. Els antígens ABH i Lewis són sintetitzats per transferències seqüencials, catalitzades per diferents enzims, de residus de carbohidrats a substrats precursors específics (Shirato, 2011).

FUT1 determina l'expressió de l'antigen tipus O (antigen H) del sistema del grup sanguini ABO en els eritròcits, mentre que el FUT2 (Se) determina aquesta expressió en la saliva i secrecions mucoses, és a dir, determina l'estat secretor (Oriol, 1990).

Les mutacions en FUT1 són molt rares i són les responsables del fenotip Bombai caracteritzat per la manca d'antígens ABH en els eritròcits i en l'endoteli vascular. Per contra, les persones que tenen els al·lels nuls del gen FUT2 tampoc poden sintetitzar antígens ABH en les secrecions i per tant, es denominen no-secretors, però sí que poden expressar-los en els eritròcits mitjançant FUT1 (Kaneko et al., 1997). Els al·lels de FUT2 de la població caucàsica d'Europa i Nord Amèrica no secretora (20% de la població) estan completament inactivats per mutacions sense sentit, i es caracteritza per l'absència d'antígens ABH tant en la saliva com en la majoria de cèl·lules epitelials del tracte respiratori, genitourinari i digestiu; mentre que en la població no secretora d'Àsia estan incompletament inactivats per mutacions de sentit erroni (Kudo et al., 1996; Soejima & Koda, 2005). Per tant, es tracta de no-secretors incomplets ja que poden produir petites quantitats d'HBGAs del tipus ABH en les secrecions.

L'enzim FUT3 es requereix per a la transferència d'una Fuc al precursor de tipus 1 o a l'antigen H tipus 1 per a generar l'antigen Lewis a (Le^a : $Gal\beta$ 1-3($Fuc\alpha$ 1-4)GlcNAc) o Lewis b (Le^b : $Fuc\alpha$ 1-2 $Gal\beta$ 1-3($Fuc\alpha$ 1-4)GlcNAc), respectivament (Fig. 1.24A). D'altra banda, el mateix enzim és necessari per a la transferència d'una Fuc al precursor tipus 2 o a l'antigen H tipus 2 per a generar l'antigen Lewis

x (Le^x : Gal β 1-4(Fuc α 1-4)GlcNAc) o Lewis y (Le^y : Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc), respectivament (Fig. 1.24B).

Els assajos d'unió basats en la tècnica d'ELISA, com el “*binding*” de VLPs a saliva o a oligosacàrids sintètics, s'utilitzen de forma general per a detectar i quantificar la unió de les VLPs de NoV als HBGAs; la qual cosa ha permet identificar un nombre de diferents perfils de “*binding*” segons el genotip de NoV que s'utilitze (Fig. 1.25) (Huang et al., 2003; 2005; Shirato et al., 2008; Rydell et al., 2009).

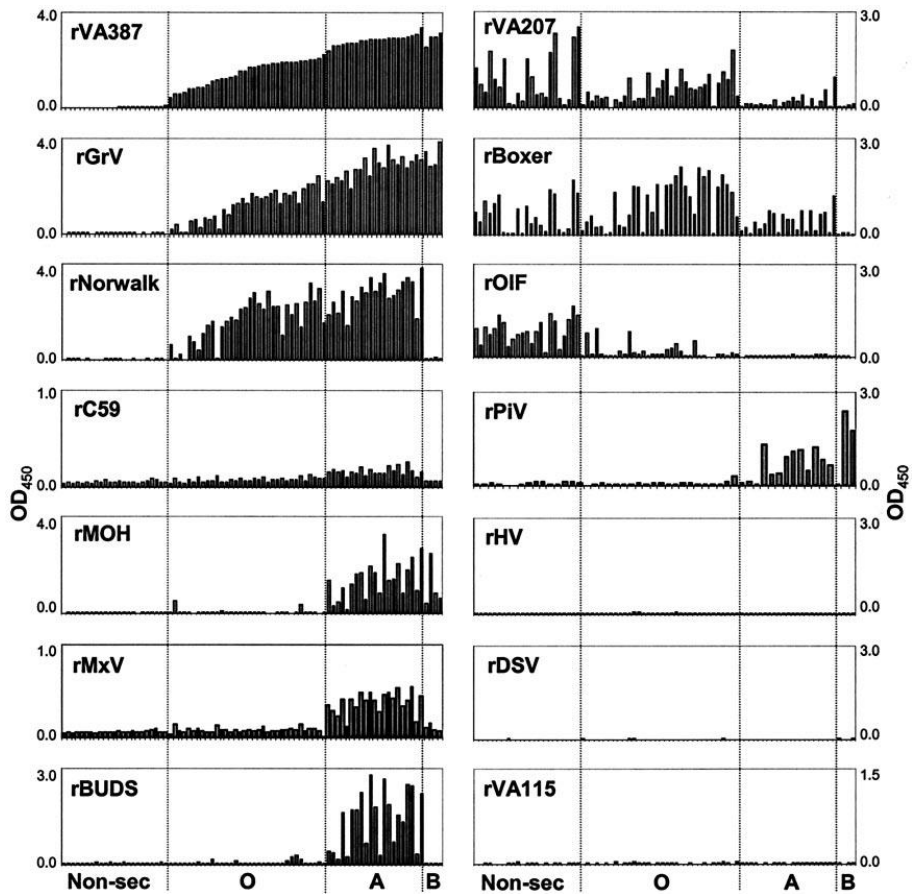


Figura 1.25. Unió de diferents rVLPs de NoV a 14 mostres de saliva de persones amb diferents tipus d’HBGAs. Les mostres de saliva s’utilitzaren a una dilució de 1/1.000. El tipus d’HBGA dels individus es mostra a la part inferior dels panells (Non-sec, no-secretors; O, secretors de grup sanguini O; A, secretors del grup A; B, secretors del grup B) (Huang et al., 2005).

Tan i Jiang proposaren un nou model, en l’any 2011, desenvolupat mitjançant anàlisis estructurals i funcionals disponibles, on els NoVs humans es classifiquen en tres grups diferents segons el patró de “binding” als HBGAs: el H, A/B i el Lewis, basant-se en els principals residus d’interacció dels sucres de la α -1,2 Fuc,

α -GalNAc/ α -Gal, i α -1, 3/4 Fuc, respectivament (Fig. 1.26) (Tan & Jiang, 2011). Dos genotips de GII, VA387 (GII.4) i VA207 (GII.9), pertanyen als grups de “*binding*” H i Lewis, respectivament. Altres genotips de GII revelen activitats d’unió a secretors de grup sanguini A i B, però no a secretors del grup O i no-secretors, com ara MOH (GII.5) (Huang et al., 2005), cosa que suggereix que les principals interaccions tenen lloc amb els epítops A/B i deurien d’agrupar-se dins del grup A/B (Taula 6).

Un principi d’agrupació similar, basat en els principals residus als quals s’uneixen vs. als de menor interacció, es pot aplicar per als NoVs del GI. Per exemple, el genotip Boxer (GI.8), que està ben caracteritzat (Huang et al., 2005), mostra un patró d’unió semblant al de VA207 i, per tant, es podria assignar al grup de “*binding*” dels antígens Lewis. Per contra, el NV podria agrupar-se en el grup dels antígens A/B ja que la seua diana és la α -GalNAc que conté l’antigen A (Choi et al., 2008; Bu et al., 2008). No obstant això, aquest genotip també reconeix la β -Gal en l’antigen H com a principal residu de la interacció, de manera que es necessiten més anàlisis, tant funcionals com estructurals, per a confirmar el principi d’agrupació que seguiria.

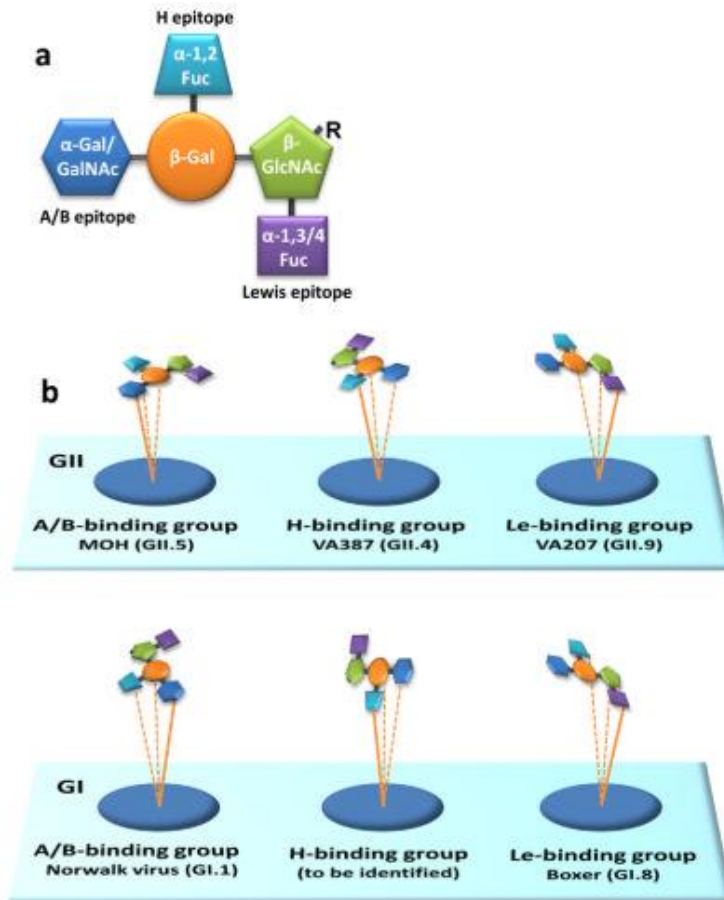


Figura 1.26. Model de la interacció NoV-HBGA. (A) Esquema d'un producte d'HBGA amb els cinc sucres representats en diferents formes i colors, indicant els factors determinants dels tipus humans de sang, H, A/B, i els epítops Lewis. R representa la posició de l'enllaç dels oligosacàrids a la columna de la proteïna o lípid. (B) Classificació de NoVs GII i GI en tres grups d'unió (grups d'unió A/B-, H- i Lewis [Le]) i els seus objectius als epítops A/B-, H- i Lewis, respectivament. Els HBGAs en (b) es mostren de la mateixa forma i color que en (a). Les línies gruixudes indiquen les interaccions majors, mentre que la fina de línies discontinües indiquen les interaccions menors entre els virus (formes rodones blaves) i els HBGAs (Tan & Jiang, 2011).

Els NoVs de GII.3 revelen un patró d'unió intermedi entre els grups de binding dels grups sanguinis A/B i l'antigen H. Aquests s'uneixen feblement a l'antigen H i fortament a l'antigen A/B.

Taula 6. Resum dels patrons d'unió als HBGAs de diferents genotips de NoV basats en assaigs de binding a saliva o oligosacàrids sintètics (adaptat de Shirato, 2011).

Genogrup	Genotip	VLP	Patró d'unió (a)
GI	1	rNV/68	H1, 2, 3, A, Le ^b
	1	r124	H1, 2, 3, A, Le ^b
	2	r258	H1, 3, A, Le ^a
	2	C59	H, A
	3	r645	H2, A, Le ^a
	3	DSV	no unió
	3	VA115	no unió
	4	rCV	H1/2, A, Le ^a , Le ^b
	8	rW18	H1/2, A, B, Le ^a , Le ^b
	10	Boxer	Le ^b , Le ^y
GII	1	r485	no unió
	1	rHV	no unió
	2	BUDS	A, B
	3	r18-3	H3, A, B
	3	r336	H3, A, B
	3	PiV	A, B, Le ^b
	3	Mexico	A, B, Le ^b
	4	r104	H1, 2, 3, A, B, Le ^b
	4	VA387	H1, 3, A, B, Le ^b , Le ^y
	4	Grimsby	H, A, B
	5	r754	A, B
	5	MOH	A, B
	6	r7k	H2, 3, B, Le ^a , Le ^b
	6	r445	H1/2, 3
	7	r10-25	H1/2, 3, B, Le ^a , Le ^b
	9	VA207	Le ^x , Le ^y
12	r76	B	
14	r47	no unió	
16	OIF	Le ^a	

Aquestes interaccions segueixen el principi fonamental del patró clau-pany. Un ajust estructural o conformacional entre la interfície d'enllaç (el pany) i l'HBGA (la clau) és un requisit previ per a la unió, que sembla que és independent de la composició genètica i de les seqüències primàries de les càpsides virals. De totes formes, encara que la classificació dels 3 grups de “*binding*” proporciona una eina valuosa, existeixen moltes variacions i/o excepcions.

1.3.11.2. Epítops descrits en la proteïna de la càpside de NoV

Els llocs d'unió o epítops descrits als HBGAs en la proteïna de la càpside VP1 han sigut identificats mitjançant anàlisis de mutagènesi dirigida i programes informàtics de “*modelling*” (Tan et al., 2003), de traces d'evolució (Chakravarty et al., 2005) i per cocristal·lització i estudis de raigs X, tant de VLPs com de partícules P amb diferents HBGAs sintètics (Cao et al., 2007). Aquests epítops es troben dins del domini P, confirmat per experiments d'expressió *in vitro* dels dos dominis (S i P) per separat on sols el domini P revela activitat d'unió (Tan et al., 2004a). Concretament, s'han descrit en el subdomini P2.

Tan i col. en el 2003 descriueren un “*binding pocket*” en aquest subdomini, compost per 4 llocs d'unió (“*sites I-IV*”), que podria mediar la unió als diferents receptors d'HBGAs descrits (Tan et al., 2003). Utilitzant unes aproximacions similars, altres autors començaren a identificar altres llocs d'unió formats per diferents residus aminoacídics.

En l'any 2007, Siebenga i col. van descriure 13 llocs hipervariables dins del subdomini P2, és a dir, 13 llocs que presentaven més d'una mutació aminoacídica al llarg de totes les variants GII.4 que utilitzaren en l'estudi (Siebenga et al., 2007). En el 2008, Lindesmith i col., van identificar 6 posicions aminoacídiques hipervariables també a través de l'aliniació de les variants estudiades, on 4 coincidien amb les descrites per Siebenga i col. (Lindesmith et al., 2008). Allen i col., en el mateix any, van descriure el “*site A*” compost pels aminoàcids del 296 al 298 i el “*site B*” del 393 al 395 (Allen et al., 2008), i així successivament fins l'actualitat.

La comparació de les dades de 5 estudis diferents coincideix en l'assignació dels residus al voltant de les posicions 296-298 (*site A*) i 393-395 (*site B*) com a possibles factors determinants del fenotip antigènic del virus (Fig. 1.27).

La fina resolució del mapeig d'epítops per mutació sistemàtica de la proteïna de la càpside va revelar que els residus que comprenen el lloc A, més 3 altres dins del subdomini P2 (epítop A) defineixen un epítop superficial clau, i també que els residus que comprenen el lloc B (epítop D) estan involucrats en la modulació de les interaccions entre el virus i els HBGAs (Debbink et al., 2012). Aquesta conclusió també està d'acord amb les dades de Shanker i col. (Shanker et al., 2011) que descriuen dos llocs (*site 1* i *site 2*), també en el subdomini P2, que també influeixen en les interaccions entre el virus i els HBGAs. En aquest estudi, utilitzant tècniques estructurals cristal·logràfiques, els autors van trobar que els residus conservats en

Introducció

el subdomini P2 (*site 1*) estaven implicats en una interacció d'unió definitiva amb els residus d'una α -fucosa conservada entre els antigens Lewis, i que el *site 2* (o *site B*) estava implicat en l'estabilització de la interacció a l'HBGA a través de la unió a un residu de β -galactosa en la molècula d'HBGA.

P2 Domain Amino Acid Residue Position

	294	296	297	298	333	340	342	343	344	345	346	347	355	356	365	368	372	374	390	391	392	393	394	395	407	412	413	440	444
Siebenga et al, 2007																													
Lindesmith et al, 2008																													
Allen et al, 2008																													
Shanker et al, 2011																													
Debbink et al, 2012																													

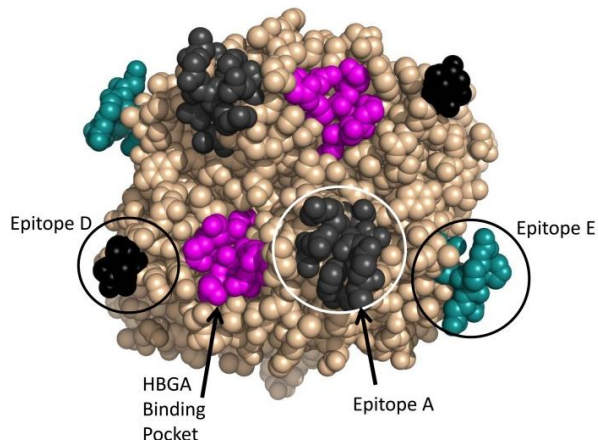


Figura 1.27. Posicions clau d'aminoàcids en el subdomini P2 que es preveu que participen en les interaccions virus-hoste, basades en les dades de 5 estudis. En l'estudi d'Allen i col. (2008), es van identificar dos llocs: el lloc A (roig) i el lloc B (verd). En l'estudi de Shanker i col. (2011), el lloc 1 (morat) i el lloc 2 (groc). En l'estudi de Debbink i col. (2012), l'epítot A (blau cel) i l'epítot D (verd clar) (adaptat de Zakikhany et al., 2012). La molècula representa una VLP de GII.4 on s'assenyala la posició dels diferents epítots i del "binding pocket" (adaptat de Lindesmith et al., 2013).

Les dades disponibles en l'actualitat dels diferents estudis semblen suggerir un paper important per als residus del *site A* i del seu voltant definint un epítop de superfície dominant (Shanker et al., 2011). Pareix ser que canvis en la superfície/estructura d'aquest epítop són més restringits, concurrent amb l'observació que aquests residus estan implicats en la unió de molècules d'HBGAs del grup dels antígens Lewis (Allen et al., 2009; Debbink et al., 2012). Les estructures definides pels residus aminoacídics en el lloc A han d'estar sota pressió per a mantenir les seves funcions d'unió al receptor, de manera que les mutacions que alteren el perfil antigènic en aquest lloc, però que mantinguen la funcionalitat d'unió al receptor, són susceptibles de ser seleccionades amb èxit en la població de les variants circulants.

Per contra, les dades per al lloc B suggereixen un paper més subtil pel que fa a la definició d'un epítop de superfície, però un paper important en la modulació de la força de les interaccions d'unió amb les molècules d'HBGA (Shanker et al., 2011). Es podria dir que el virus utilitza la genètica i flexibilitat antigènica del lloc B per millorar i modular les interaccions amb els receptors i el sistema immune que ocorren en el lloc A.

1.3.12. Desenvolupament de vacunes

Els esforços actuals per a dissenyar vacunes front a NoV humans se centren en l'expressió de la proteïna de la càpside de NoV en diferents vectors, el que resulta en l'autoensamblatge d'aquesta en VLPs immunogèniques (Green, 2007). De fet, les VLPs posseeixen

totes les propietats necessàries per a ser un bon candidat vaccini (Estes et al., 2000):

- Són estables després de la liofilització i una exposició a un pH de 2'5, és a dir, el pH intestinal.
- Són molt immunogèniques després de la injecció per via parenteral en animals (Estes et al., 2000) i després de l'administració oral o intranasal en ratolins (Ball et al., 1998; Guerrero et al., 2001).
- No presenten cap perill per a la salut humana (no contenen el material genètic viral) i són immunogèniques després de l'administració oral en voluntaris analitzats positivament per a anticossos anti-NoV (Ball et al., 1999).

Aquests tipus de vacunes provoquen respostes tant de la IgG sèrica com de la IgA de les mucoses, però la durada d'aquestes respostes i el seu potencial de protecció no s'han determinat. Els assajos en Fase I/II d'una vacuna bivalent, amb VLPs de NoV de GI i GII, per via intramuscular, s'han dut a terme de forma segura. L'estudi ha demostrat que dues dosis dels NoVs bivalents experimentals van ser ben tolerats, i que la vacuna va tenir un efecte clínicament rellevant sobre la incidència de la malaltia causada pel NoV després de l'exposició, així com la gravetat dels casos de brot. A més de l'impacte en la malaltia clínica, també es va observar una tendència positiva cap a la reducció de l'excreció del virus en la femta (https://www.takeda.com/news/2013/20131007_6021.html).

Els resultats d'estudis d'inoculació de VLPs de NoV amb models animals també són encoratjadors: (i) la inoculació intranasal de vedells amb VLPs de NoV boví + adjuvant indueix tant la immunitat humoral sistèmica com la de la mucosa, tot i que la protecció d'exposicions posteriors al virus és només parcial i es segueix excretant partícules víriques (Han et al., 2006), (ii) exposicions repetides de la mucosa a VLPs d'HS66 VLP + adjuvant indueixen respostes immunes i confereixen protecció a l'HS66 viu en la majoria dels porcs gnotobiòtics vacunats (Souza et al., 2007b), (iii) la inoculació de ratolins en el coixinet plantar amb VLPs de NoV murí + adjuvant indueix respostes immunes humorals i càrregues virals menors, tot i que la protecció de la malaltia no va ser avaluada en aquest estudi (Lobue et al., 2009). Treballs addicionals amb NoV murins suggereixen que una àmplia resposta immune adaptativa incloent cèl·lules B i cèl·lules T CD4 i CD8, és fonamental per a la protecció completa (Chachu et al., 2008).

Tot i que la informació disponible sobre les vacunes basades en VLPs de NoV és prometedora, diversos obstacles potencials requereixen seriosa consideració. Per exemple, vacunes de calicivirus felí, tant vacunes vives modificades com inactivades donades amb adjuvants, s'han utilitzat durant molts anys (Radford et al., 2006). Aquestes vacunes indueixen una immunitat protectora en els gats en termes de la prevenció de la malaltia clínica, però, no impedeixen la infecció o la persistència de la mateixa. En aquest context, la presència de la immunitat no neutralitzant en realitat podria induir l'aparició de

soques virulentes (Mackinnon & Read, 2004). De fet, múltiples aïllats de calicivirus felins virulents han sorgit recentment com a causa de malaltia sistèmica associada a una elevada mortalitat, i gats vacunats han destacat per estar afectats en aquests brots (Pedersen et al., 2000; Hurley et al., 2004). Aquestes dades posen de manifest la necessitat potencial de dissenyar estratègies de vacunació de NoV que s'adrecen tant a la malaltia clínica com a la infecció prolongada.

Altres obstacles importants en el disseny de vacunes front a NoV són la variabilitat genètica d'aquest virus dins de la mateixa família i la substitució de les soques pandèmiques en curts intervals de temps. Aquests factors poden requerir una preparació de la vacuna que estiga en contínua evolució similar a la que actualment s'utilitza per al virus de la *influenza*. D'altra banda, es podria necessitar la inclusió de múltiples soques de NoV en la preparació de la vacuna per a poder induir una immunitat eficaç per a cada genogrup. Per exemple, estudis comparatius utilitzant virus GI i GII duts a terme en els anys 70 no van demostrar protecció heterotípica, fet que suggeria que una vacuna eficaç podria necessitar incloure VLPs tant de genogrups GI com GII. Per fer front a aquest fet, es va dissenyar una nova VLP de GII.4 per l'alineació de la seqüència de la VP1 de tres NoV GII.4 humans (Parra et al., 2012).

Un possible obstacle final per a una vacuna de NoV amb èxit és la incapacitat de la infecció natural per obtenir una protecció duradora en tots els individus. Aquest punt serà crític per a delinear la base per a aquesta falta d'immunitat i per a determinar si un fenomen similar es

produeix després de l'exposició a les possibles vacunes candidates front a NoV.

L'observació de què les partícules P indueixen anticossos específics front a NoV que bloquegen la unió de les VLPs als receptors dels HBGAs, també suggereix que aquestes podrien ser un candidat vacunal prometedor contra la infecció causada pels NoVs, particularment considerant el fet de que les partícules P són molt més fàcils de produir (Tan et al., 2008). D'aquesta forma es podrien esquivar els obstacles proposats per a les vacunes basades en les VLPs molt més fàcilment.

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Els objectius que ens plantegem en el següent treball són:

2.1. Clonar i expressar la proteïna de la càpside VP1 de norovirus GII.4 i GI.1 mitjançant baculovirus recombinants per a produir partícules pseudovíriques (VLPs).

2.2. Clonar i expressar els dominis P de les variants GI.1, GII.4-VA387, GII.4-Apeldoorn_2007 i GII.9 de la VP1 de norovirus en *Escherichia coli*, per a analitzar la reactivitat d'anticossos sèrics i de pacients convalecents de gastroenteritis per norovirus front a determinants antigènics d'aquesta regió de la càpside.

2.3. Obtindre i produir anticossos monoclonals front a la proteïna VP1 de la càpside de norovirus, ja que aquesta és la més variable i interacciona amb receptors cel·lulars.

2.4. Caracteritzar l'especificitat dels anticossos monoclonals produïts, tant al nostre laboratori com al laboratori de la “*Health Protection Agency*” de Colindale (Londres), i analitzar la seua activitat bloquejant sobre la interacció de VLPs i partícules P amb receptors histosanguinis HBGA en saliva i en cèl·lules Caco-2.

2.5. Caracteritzar l'epítop dels anticossos monoclonals produïts mitjançant la tècnica de “*phage display*” i definir la conformació del mateix.

2.6. Estudiar el “*binding*” de partícules pseudovíriques (VLPs) i partícules P de norovirus GII.4, de diferents variants, a saliva i cèl·lules Caco-2.

2.7. Evaluar el percentatge d’inhibició de la unió d’aquestes partícules als receptors cel·lulars mitjançant assaigs de bloqueig utilitzant mucina gàstrica de porc (PGM) a diferents concentracions, els anticossos monoclonals produïts front a VLPs de norovirus i anticossos monoclonals comercials anti-antígens Lewis (Le^a, Le^b, Le^x i Le^y) i anti-antígens H (H1 i H2), a saliva i cèl·lules Caco-2.

2.8. Estudiar la seroprevalença d’anticossos davant norovirus GII.4, utilitzant el domini P de la variant GII.4-Apeldoorn_2007 clonat, en individus de diferents grups d’edat de la població, així com en pacients convalecents d’infeccions per norovirus.

2.9. Estudiar la diferent susceptibilitat a les infeccions per norovirus segons els fenotips d’HBGAs específics, basats en una cas natural d’un brot per gastroenteritis aguda provocat per norovirus.

3. MATERIAL I MÈTODES

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. LÍNIES CEL·LULARS

Al llarg d'aquest estudi s'han utilitzat dos línies cel·lulars: la línia cel·lular Sf9 d'insecte i la línia cel·lular Caco-2 de mamífer.

La línia cel·lular contínua **Sf9** (ATCC CLR 1711) emprada per a la propagació dels baculovirus recombinants i la producció de VLPs de NoV, té el seu origen en cèl·lules epitel·lials de la larva de la papallona *Spodoptera frugiperda*. Aquestes cèl·lules es conreen a 27°C en medi SF900 II M (Gibco), suplementat amb antibiòtics (estreptomicina, penicilina i fungizona), i en frascos de 75 cm² (Costar) per al cultiu en estacionari o en matraços de 250 ml (Costar) per als cultius en suspensió.

La línia cel·lular contínua **Caco-2** prové de cèl·lules heterogènies epitelials humanes d'un adenocarcinoma colorectal, i es va utilitzar per a l'estudi de les interaccions virus-receptor hoste. En aquest cas, les cèl·lules es mantingueren en estufa a 37 °C amb un 5% de CO₂ i en Dubecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) (Gibco) com a medi de cultiu. El medi DMEM se suplementava amb un 10% de sèrum boví fetal (SBF) (Gibco), 100 UI/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml d'estreptomicina (Gibco), amino àcids no essencials, 2 mM de glutamina i 1 mM de piruvat sòdic. El medi que s'ha utilitzat com a "*binding medium*" (BM) contenia tots els suplementos anteriors excepte el SBF.

Tots els tipus cel·lulars es van cultivar fins a obtenir una monocapa confluent, i una vegada alcançada es procedia a realitzar el pase del cultiu. Aquests pases es realitzaven dos dies per setmana i, generalment, el frasc de cultiu es canviava per un de nou cada 5-6 pases.

El protocol seguit va ser el següent:

- ✓ Per a les Caco-2 es descartava el medi de cultiu, es rentava dues vegades amb PBS (Phosphate buffered Saline, pH 7.3, Oxoid), s'afegia 1 ml de tripsina 0.25 % - EDTA (Gibco) i es deixava tripsinitzant a 37°C uns minuts fins que les cèl·lules es despegaven. En el cas de les Sf9, les cèl·lules es despegaven colpejant suaument el frasc varies vegades sense eliminar el sobrenadant.
- ✓ Una vegada despegades, les Caco-2 es resuspenien en DMEM fresc i es passaven a un nou frasc o simplement es descartava (generalment 1/3 del volum total). Per a les Sf9, directament es passava 1/5 del volum a un nou frasc i s'afegia medi SF900 fresc.

Les cèl·lules Sf9 adaptades a créixer en suspensió foren cedides pel Dr. Javier Cervera del Laboratori de Reconeixement Molecular del Centre d'Investigació Príncep Felipe (València).

3.1.1. Congelació de cèl·lules Sf9 i Caco-2

Totes les línies cel·lulars es van conservar en nitrogen líquid ($N_2(l)$).

Les cèl·lules **Sf9** es deixaven créixer fins la confluència, es despegaven i se centrifugaven a 1.100 rpm durant 10 min (centrifuga Beckman Coulter TJ-25, rotor TS-5.1-500). A continuació, es passava el sobrenadant a un tub estèril i les cèl·lules es resuspenien (1 ml amb una densitat recomanada de 2×10^7 cèls/ml) en la mitad de medi gastat i l'altra mitad de medi de congelació (85% de medi fresc + 15% de dimetilsulfòxid, DMSO).

Per a les **Caco-2** se seguien els mateixos pasos que es realitzaven en una pase normal fins la resuspensió de les cèl·lules tripsinitzades, les quals se centrifugaven a 1.100 rpm durant 5 min. El sobrenadant es descartava i el pellet es resuspenia en 1 ml de SBF amb 10% de DMSO (Sigma) com a criocervant en un criovial de 1'5 ml. Els criovials es col·locaven en un bany d'isopropanol (Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene) al congelador de -80 °C perquè la temperatura descendira gradualment i al dia següent, els criovials s'emmagatzemaven en $N_2(l)$.

3.1.2. Descongelació de cèl·lules

Per a protegir a les cèl·lules de la congelació es mantenen amb DMSO, que és un compost tòxic per a cèl·lules actives, per tant la descongelació ha de fer-se ràpidament. El primer que s'ha de fer és atemperar el criotub que conté les cèl·lules en un bany a 37°C, per tal de descongelar-les. A continuació, es resuspenen en un vial amb 15 ml de medi (SF900 II M o DMEM segons el tipus cel·lular) (el DMSO es dilueix i baixa la seua toxicitat) i se centrifuga a 1.500 rpm durant 5 min (centrifuga TJ-25, Beckman Coulter). Després s'elimina el

sobrenadant (s'elimina la resta de DMSO) i es resuspenen en 10-20 ml de medi fresc. Per últim es pasen a un frasc T-75 i s'incuben a 27-37°C segons el cas.

3.2. VIRUS

3.2.1. Baculovirus

Per a la construcció dels baculovirus recombinants de NoV GII.4-Den Haag_2006b (GII.4-2006b) i GI.1_Norwalk (GI.1) es va utilitzar el sistema *Bac-to-Bac Expression System* (Invitrogen). Els passos següents es mostren en la següent figura (Fig. 3.1).

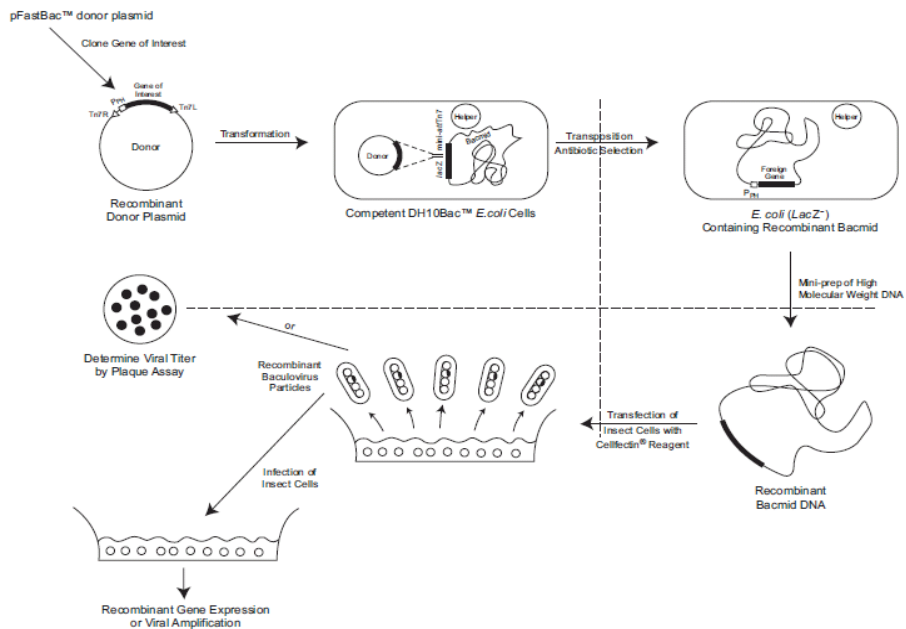


Figura 3.1. Diagrama del sistema d'expressió Bac-to-Bac de Invitrogen per a la producció dels diferents baculovirus recombinants.

L'ARN viral es va obtenir d'una mostra (nº 1430) de femta d'un pacient infectat per la variant GII.4-Den Haag_2006b de NoV i el gen de la càpside es va amplificar per transcripció inversa (RT-PCR) utilitzant els següents *primers*:

Elin2F: 5'-GGCTCCAGTTTTGTGAATG-3'

Elin2Rev: 5'-CCAGAGCCGAGGACATCAGA-3'

L'amplímer corresponent al gen de VP1 es va clonar en el vector pGEM-T-Easy (Promega) mitjançant una reacció de lligació amb la T4 DNA ligasa (New England BioLabs). Després de confirmar l'orientació correcta de l'insert de l'ADNc, per anàlisi de la seqüència del plàsmid recombinant obtinguda amb els *primers* **pUC/M13 Forward** (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') i **pUC/M13 Reverse** (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), l'insert es va digerir amb *EcoRI* i es va clonar en el plàsmid pFastBacHTb (Invitrogen), que conté el promotor de la polihedrina per a l'expressió de la proteïna recombinant en el sistema de baculovirus amb una seqüència 6xHis N-terminal. Aquest plàsmid es va utilitzar per a transformar la cepa d'*E. coli* OneShot® TOP10 (Invitrogen).

El gen de VP1 es va clonar en pFastBacHTb amb la pauta de lectura correcta, però interessava expressar la proteïna de la càpside de NoV sense cola d'histidines, de manera que l'insert es va digerir amb *BamHI* i *XhoI* i es va transferir al vector pFastBac1 (Invitrogen) que no incorpora ninguna etiqueta 6xHis. A continuació es van transformar les cèl·lules competents Max Efficiency DH10Bac

d'*Escherichia coli* amb el plàsmid recombinant pFastBac1-VP1-GII.4-2006b i es van sembrar en plaques d'agar Luria que contenia 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de tetraciclina, 40 µg/ml d'IPTG i 100 µg/ml de Bluo-gal (Invitrogen), seguint les instruccions del fabricant (sistema d'expressió Bac-to-Bac). Els ADN recombinants del bàcmid es van aïllar de les cèl·lules bacterianes transformades i es van utilitzar per a transfectar cèl·lules Sf9 amb Cellfectin (Invitrogen). Els baculovirus recombinants resultants es van recollir del medi de cultiu cel·lular a les 72 h després de la transfecció i es van emmagatzemar a 4°C i en oscuritat.

En el cas de les VLPs de GI.1, l'ADNc es va obtenir sintetitzant el gen corresponent a la proteïna VP1 de la càpside del virus Norwalk (Jiang et al., 1993) (nº acc. M87661, GenBank) en GeneArt (Life Technologies). Per a facilitar la seua clonació en el vector pFastBac1 es van incorporar els llocs de restricció *SalI* i *PstI* (enzims que no tallen el gen de VP1 de virus Norwalk i que estan presents en el “*poly-linker*” del vector pFastBac1) en 5' i 3', respectivament, de la seqüència del gen de VP1. El gen sintètic, de 1.605 pb incluint els llocs de restricció, es va clonar en pFastBac1, es van transformar cèl·lules competentes Max Efficiency DH10Bac d'*Escherichia coli* i la resta del procediment es va seguir igual que en el cas anterior.

Les VLPs de NoV GII.4-1999 (GII.4-v0) i GII.4-2004 (GII.4-v2) es van obtenir a la “*Health Protection Agency*” de Colindale,

Londres (HPA) i es van expressar com està descrit prèviament (Allen et al., 2009).

3.2.2. Amplificació del virus

La propagació de baculovirus en la línia cel·lular Sf9 es pot realitzar seguint dos protocols diferents, depenent de si les cèl·lules es creixen en suspensió o adherides a suport plàstic en frascos de 75 cm² (T75).

a) Cèl·lules en suspensió:

Les cèl·lules es deixaven créixer durant 2 dies en medi SF900 II, suplementat amb penicilina, estreptomycina i 1% de Pluronic F-68 (Sigma) (tensioactiu que fa que les membranes de les cèl·lules siguin més elàstiques i suporten millor l'agitació mecànica), per a què arribaren a la fase de creixement exponencial, 1.5×10^6 cèl/ml (es parteix d'una concentració de 3×10^5 cèl/ml). Aquestes es cultivaven a 27°C i 105 rpm en un agitador orbital (K, VRN-360).

Una vegada alcançada la concentració ideal, s'infectaven directament amb l'inòcul víric amb una multiplicitat d'infecció (m.o.i.) de 0.1. A les 48 hores, les cèl·lules eren centrifugades a 1.100 rpm durant 10 min, recuperant el sobrenadant, que és on es troben els baculovirus, i conservant-lo a 4°C (envoltant el tub amb paper d'alumini, ja que la llum afecta de forma negativa als baculovirus).

$$\text{m.o.i} = \text{n}^\circ \text{ virus infectant} / \text{n}^\circ \text{ cèl·lules a infectar}$$

Finalment, la càrrega vírica de les suspensions es determinava mitjançant la tècnica d'immunofluorescència indirecta (IFI), detallada en l'apartat 3.9.1.

b) Cèl·lules adherides a soport plàstic (T75):

Les cèl·lules es deixaven créixer durant 24 hores després del pase en un T75 a 27°C i en medi SF900 II, arribant a una concentració aproximada de 2×10^7 cèl·lules per frasc T75 (recompte en càmera Neubauer amb blau tripà).

Una vegada adherides al plàstic, es descartava el sobrenadant i s'afegia l'inòcul víric, sense diluir, amb una m.o.i de 0'1, deixant en contacte amb les cèl·lules durant 1 h a 27°C i agitant cada 10-15 min.

Després de l'adsorció, sense descartar l'inòcul, s'afegien 8 ml de medi SF900 i el frasc s'incubava durant 48 h a 27°C. A partir d'ací se segueix el mateix procediment que en el cas anterior (apartat a).

3.2.3. Producció de partícules pseudovíriques de norovirus (VLPs)

L'expressió de la proteïna es va avaluar tant a partir de la fracció cel·lular com dels sobrenadants dels cultius. Les cèl·lules es cultiven igual que en el cas d'amplificació del virus, però en compte

d'infectar amb una m.o.i de 0'1, s'infecta amb una m.o.i de 5-10 i es procedeix de la mateixa forma fins l'addició del medi SF900 després de l'adsorció.

En aquest cas, les cèl·lules es deixaven créixer durant 5 dies i al 6é dia post-infecció es despegaven mitjançant colps suaus i se centrifugaven, en un tub corning de 50 ml, a 1.000 rpm durant 10 min (TJ25, Beckman). A continuació, el sobrenadant es recuperava en altre tub i les cèl·lules infectades, que és on majoritàriament es troben les VLPs, es lisaven amb el tampó de lisis (PBS amb 100 mM de NaCl, 1% de Tritó X-10 i 0'1% d'un coctel d'inhibidors de proteases, Sigma ref. P8849) durant 30 min a 4°C en gel.

Una vegada lisades les cèl·lules, es passaven a un tub Beckman i se centrifugaven a 11.800 rpm durant 10 min (rotor A-14), i després ja es procedia a la purificació d'aquestes. Per a la qual cosa, tant el sobrenadant com el lisat, es passaven per un matalaf de sacarosa al 40% i se centrifugaven a 120.000 g (31.500 rpm) durant 3 h en ultracentrífuga a 4°C (rotor 70.1 Ti, centrífuga Beckman L8-70M). Si es volguera un major grau de purificació, el següent pas seria passar les mostres per un gradient de clorur de cesi. Finalment, s'elimina el sobrenadant, el pellet es resuspen en PBS (rascant el fons del tub) i es conserva congelat a -80°C fins que es vaja a utilitzar.

3.2.4. Producció de partícules P de NoV

Els gens que codifiquen per a la proteïna VP1 de la càpside de la variant VA387 (genotip **GII.4**) (GenBank accession number

M87661), de la variant Norwalk (genotip **GI.1**) (GenBank accession number AY038600) i de la variant VA207 (genotip **GII.9**) (GenBank accession number AY038599) foren sintetitzats per GeneArt (Life Technologies).

La regió codificant del domini P de la variant **VA387** (del aa 222 al 539) va ser amplificada a partir dels gens sintètics utilitzant els *primers* p524 i p590. El *primer* revers incorpora unes bases que codifiquen per a un pèptid ric en cisteïnes (Cys): **CDCRGDCFC** (en 3'), que afavoreix l'estabilitat de les partícules P (Tan & Jiang 2005a).

p524 5'-GCACGGATCCTCAAGAACTAAACCATTACC-3'

p590 5'-GCATGCGGCCGCTTAGCAAAAGCAATCGCCACGG
CAATCGCATAATGCACGTCTGCGCCCCGC-3'

Per a amplificar el fragment que codifica el domini P de la variant **Norwalk** (del aa 225 al 530) es va realitzar una modificació del *primer* p649, incorporant el domini ric en Cys CNGRC (amino terminal) i és el que es va utilitzar com a *primer forward*, i el *primer* p494 es va utilitzar com a revers (Tan & Jiang, 2005a).

p649-mod 5'-GCGTGGATCCTGCAACGGCCGTTGCCAGAAAACC-3'

p494 5'-GGACGCGGCCGCTTATCGGCGCAGACCAAGCCT-3'

Per a clonar el domini P de la variant **GII.9** (del aa 222 al 537) el gen sintètic ja incorporava els llocs de restricció i es va subclonar directament sense amplificar per PCR. A l'igual que en la variant GII.4, s'inclou la seqüència rica en cisteïnes **CDCRGDCFC** en 3' per a facilitar la formació de partícules P.

Els llocs de restricció incluits per a la clonació estan subratllats i els codons de “stop” estan en negreta.

Les amplificacions per PCR es dugueren a terme amb la polimerasa *Pfx* (Invitrogen) i els fragments amplificats (excepte el GII.9) es digeriren amb *Bam*HI i *Not*I i es clonaren en el vector **pQE80** (Qiagen), digerit amb *Bam*HI i *Sma*I i transformats en la cepa d'*E.coli* DH10B. La integritat de les seqüències es va verificar per seqüenciació i els plàsmids generats es van transferir a la cepa d'*E. coli* BL21, la qual inclou el plàsmid **pREPGroES/EL** que codifica unes chaperones que milloren la solubilitat de les partícules P recombinants (Dale et al., 1994).

En el cas del domini P de la variant **GII.4-Apeldoorn_2007** (P-GII.4-2007), l'ARN viral es va extraure d'una mostra de femta d'un individu infectat amb dita variant amb el kit QiaAmp d'ARN viral (Qiagen). A continuació es va realitzar una RT-PCR (reverse) per a obtindre el cDNA utilitzant els primers **P_GII-4F** (forward) i **P_GII-4R** (reverse). El producte amplificat es va seqüenciar i es va realitzar una segon PCR anidada, obtinguent-se l'amplificació del domini P de la proteïna VP1 de la càpside mitjançant els següents primers: **PREV_PET** i **PFOR_PET**.

P_GII-4F	5'- GANGATGTCTTCACAGTCTCTT -3'
P_GII-4R	5'- CATTCTGGGGGAGTAGACA -3'
PREV_PET	5'-CTATTCTGGGGGAGTAGACA-3'
PFOR_PET	5'-CACCGATGTCTTCACAGTCTCTT-3'

Es va obtenir un fragment de 790 pb (nt 579-1379; aa 194-456) el qual es va clonar en el vector **pET100/D-TOPO** i es va transformar la cepa d'*E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen), expressant-se com a proteïna recombinant amb coles d'histidina (6xHis).

Per a millorar la solubilitat de les partícules P, el cultiu d'*E. coli* es va créixer o/n (de l'anglès “*overnight*”, és a dir, incubació durant 16 h aproximadament) a 25°C i induït amb 0'2 mM d'IPTG durant 4 h a la mateixa temperatura. A continuació, les cèl·lules bacterianes es van recollir per centrifugació (7.500 rpm durant 10 min) i congelades a -80°C.

Per últim, la purificació es va realitzar utilitzant el sistema de cromatografia Äkta Prime FPLC system (GE Healthcare) i 1 ml de columnes de FastFlow Ni-NTA (GE Healthcare). Els pellets cel·lulars es descongelaren i es resuspengueren en el tampó A (100 mM Tris-HCl pH 7'5, 10 mM NaCl, 50 mM NaSO₄) suplementat amb 0'5 mM de dithioerythritol (DTT), 0'5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride i 1 mg/ml de lisozima i incubats durant 30 min a temperatura ambient. Els lisats cel·lulars es van obtenir per sonicació en gel seguit d'una centrifugació a 20.000×g durant 20 min a 4°C. Una vegada clarificats, els lisats es van carregar en la columna de Ni-NTA i llavats amb el tampó A amb un gradient d'imidazol de 0 a 500 mM. Per a l'elució de les partícules P es va utilitzar el tampó A amb 2M d'imidazol. Per al domini P-GII.4-2007 la purificació es va dur a terme seguint el mateix procediment que per a la resta de les partícules P, excepte que el llavat es va realitzar amb el tampó A i un gradient d'imidazol de 0 a 60 mM.

La determinació de la concentració proteica es va realitzar mesurant amb un espectofotòmetre UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) l'absorbància a 280 nm.

3.2.6. Electroforesi SDS-PAGE, tinció Coomassie i Western blot

Després de la purificació de les diferents proteïnes, es realitza una electroforesi de proteïnes en SDS-PAGE amb les fraccions recollides, per a assegurar-se que la fracció purificada correspon a les VLPs, a les partícules P o al subdomini P2 segons el cas.

Per a l'electroforesi s'utilitzà l'equip de Mini Protean[®] Tetra (Bio-Rad), cubetes d'electroforesi vertical amb gels d'un tamany de 7 cm x 8'5 cm x 1 mm. Es preparava el gel “*stacking*” i el gel “*running*” al 4% i al 12% de poliacrilamida, respectivament, i les mostres corresponents; tenint en compte la quantitat estimada mitjançant l'espectofotòmetre Nanodrop i que si aquestes provenien de lisats celulars s'havien de passar prèviament per una xeringa d'insulina per a trencar el DNA.

Generalment, es preparaven 2 gels i es carregaven 10 µl de mostra + 10 µl de tampó de càrrega (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (v/v), blau de bromofenol 0,04 mg/ml, ditiotretitol (DTT) 31 mg/ml), prèviament desnaturalitzant a 100°C durant 5 min. A continuació, es deixava correr a 200 V fins que el colorant arribava al final del gel, aproximadament una hora i se seguia amb la tinció.

El gel es tintava durant uns 15 min amb blau Coomassie i es destintava amb una dissolució que contenia metanol, àcid acètic glacial i aigua (25:25:50) durant tota la nit, canviant abans una o dues vegades la solució de destint. A l'endemà, el gel es deshidratava amb el kit DryEase Mini-Gel Drying System (Invitrogen) i es podia guardar indefinidament.

L'altre gel s'utilitzava per al **Western blot**, realitzant la transferència a una membrana de PVDF (*Immobilon Transfer Membranes*, Millipore), la qual primer s'havia d'activar amb metanol uns 10 seg. El tampó per a dur a terme la transferència estava compost per Tris base 12'5 mM, glicina 0'1 M i metanol 20% (v/v). A continuació, tant la membrana com el gel, s'incubaven durant 10-15 min en el tampó de transferència i després ja es procedia amb el muntatge del *cassette* en el següent ordre: esponja, 2 paper Whatman, gel, membrana de PVDF, 2 paper Whatman i esponja; banyant tot amb el tampó de transferència en cada pas. Per últim, es deixava transferint 1 h a 100 mA en càmera freda (4°C).

Una vegada realitzada la transferència, es bloquejava la membrana durant 1 hora amb PBS-BSA 3% en agitació, es llavava dues vegades amb PBS i s'incubava o/n amb el primer anticòs (IgG anti-NoV de conill a una dilució 1/200) (regal del Dr. Lennart Svensson, de la Universitat de Linköping, Suècia) diluït en PBS-BSA 0'5%. Després es tornaven a fer llavats amb PBS i s'incubava 1'5 h amb el segon anticòs (anti-IgG de conill conjugat amb peroxidasa

(Sigma) dilució 1/5.000). Finalment, es revelava pel mètode colorimètric segons el protocol del kit AEC staining (Sigma).

3.2.7. Observació al microscopi electrònic

Les VLPs de GI.1 i GII.4, així com les diferents partícules P, foren observades al microscopi electrònic. Primer es van preparar les reixetes de microscòpia electrònica que s'impregnaven amb Formvar dissolt a l'1% en cloroform i es recobrien amb carboni per mitjà d'un vaporitzador (Polaron P650A). A continuació les mostres es tenyien amb àcid fosfotúngstic al 2% en aigua destil·lada (pH 6'7), es deixaven secar i s'observaven al microscopi electrònic del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) del Campus de Burjassot de la Universitat de València.

3.3. OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS MONOCLONALS (AcMo) FRONT A VLPs DE NoV GII.4

L'AcMo anti-GII.4-v0 (av0) i anti-GII.4-v2 (av2) es van obtenir com s'ha descrit prèviament (Allen et al., 2009). Els antisèrums policlonals contra les VLP es van obtenir en l'Agència de Protecció de la Salut (HPA, Colindale, Londres) mitjançant la immunització de conills amb una barreja de VLPs (GII.4-v0, GII.4-v2 i GII.3). Per a l'obtenció d'AcMo contra les VLPs de la variant GII.4-2006b es va seguir el procediment descrit en els punts següents.

3.3.1. Immunitzacions

Per als estudis d'immunització s'utilitzaren ratolins femella BALB/c d'entre 6 i 10 setmanes d'edat. El grup d'inoculació estava format per 3 ratolins i cada individu va ser analitzat prèviament mitjançant ELISA anti-NoV per a confirmar que es trobava lliure d'anticossos front a aquest (sèrum pre-immune).

La via d'administració va ser sols una, intraperitonealment, inoculant 250 µL de la solució d'antigen (20 µg/ml d'una dissolució de VLPs de GI.4 amb PBS) amb xeringues d'insulina de 2 ml i la pauta d'inoculacions va consistir en tres dosis: una en el moment, altra als 14 dies i per últim, un “*booster*” aproximadament als 43 dies, tal i com s'indica a la figura 3.2.

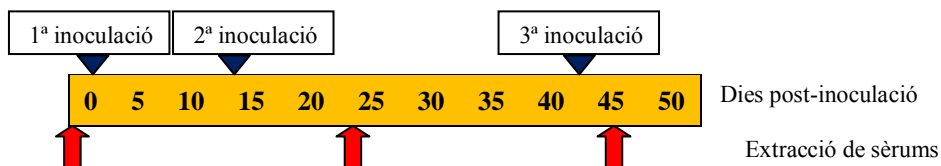


Figura 3.2. Pauta d'administració via intraperitoneal de les dosis de VLPs GI.4 i extracció de sèrums a ratolins Balb/c femella d'entre 6 i 10 setmanes d'edat.

3.3.2. Recollida de les mostres

Les mostres de sèrum s'obtingueren als 24 dies després de les dos primeres dosis i als dos dies del “*booster*”.

El sèrum es va obtenir per centrifugació a 3.000 rpm de la sang coagulada, obtinguda mitjançant punció maxilofacial dels ratolins i emmagatzemat a -30°C fins la seua utilització.

3.3.3. Determinació dels anticossos sèrics

La determinació d'anticossos sèrics es va realitzar mitjançant la tècnica d'enzimoinmunoassaig (ELISA).

Les plaques de poliestiré de 96 pouets se sensibilitzaren durant 2 h a 37°C amb 10 µg/ml de lisat que contenia les VLPs purificades, i també amb lisat de Sf9 sense infectar a la mateixa concentració, en tampó carbonat/bicarbonat 0'1M a pH 9'6. A continuació es guardaven a 4°C fins la seua utilització.

Per als llavats es va utilitzar PBS amb 0'5% de Tween-20 (PBS-T) i la determinació dels anticossos sèrics IgG es va realitzar diluint els sèrums dels ratolins (1/100, 1/250, 1/500, 1/1.000) en PBS-T amb 1% de BSA (PBS-BSA 1%). Per a detectar els anticossos s'utilitzaren anticossos anti-IgG de ratolí conjugats amb peroxidasa (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) a una dilució 1/2.000. Per últim, els ELISEs foren revelats mitjançant l'addició d'una solució d'o-fenilenediamina dihidroclorur (OPD, Sigma) i H₂O₂ i després d'una incubació de 10 min es va parar la reacció amb H₂SO₄ 3M. La lectura de l'absorbància es va determinar en l'espectrofotòmetre (Multiskan FC, Thermo Scientific) a 492 nm.

3.3.4. Producció d'hibridomes

El primer que s'ha de fer per a obtindre hibridomes és preparar les cèlules de mieloma Sp2/0-Ag14, és a dir, descongelar-les i conrear-les en medi DMEM 10% SBF a 37°C. La descongelació és igual que en el cas de les cèl·lules Caco-2. Una vegada creixcudes, es

procedeix amb el sacrifici del ratolí i obtenció dels seus esplenòcits. Cal tindre en compte que el dia abans de la fusió, s'han de preparar plaques de 96 pouets amb cèl·lules “feeder”, ja que aquestes faciliten el creixement dels possibles híbridomes.

Per a l'obtenció de cèl·lules “feeder”, es va preparar una solució de 8 ml de sacarosa molt freda i el ratolí es va sacrificar desnucant-lo. A continuació, es va submergir en un recipient que contenia etanol al 70% i es va procedir amb la dissecció, tallant la pell a nivell del diafragma. Tot seguit, es va introduir la xeringa amb la sacarosa dins de la cavitat peritoneal en la base de l'esternó i se li va injectar la solució, apretant suaument l'abdomen de 2 a 3 vegades. Després, s'intentà recuperar la màxima quantitat de solució possible dins la xeringa, es va passar a un tub corning de 50 ml i en la cabina, es van afegir 10 ml de medi HAT fred (hipoxantina 100 μM , aminopterina 0'4 μM , timidina 16 μM , SBF 20% (v/v) i aminoàcids no essencials 0'1 mM). El tub es va centrifugar a 100 x g durant 5 min (rotor 5.1 TJ25 Beckman) i el pellet es va resuspendre en 1 ml de medi HAT fred, determinant la viabilitat cel·lular amb el mètode d'exclusió del blau tripà per a obtindre una concentració d' 1×10^5 cèl/ml. Per últim, s'afegiren 100 μl d'aquesta suspensió cel·lular als 60 pouets interiors de la placa, els 36 perifèrics s'ompliren amb PBS i es va incubar o/n a 37°C en un incubador de CO₂ al 8%.

Al dia següent, es va realitzar la fusió, per a la qual cosa es va sacrificar el ratolí immunitzat escollit de la mateixa manera que en el cas de l'obtenció de les cèl·lules feeder, però en compte d'injectar-li la

solució de sacarosa se li va extraure la melsa. Tot just abans de sacrificar al ratolí, es van transferir 1×10^7 cèl·lules Sp2/0 de mieloma murí a un tub corning de 50 ml, calculant el percentatge de cèl·lules viables amb blau tripà.

La melsa es va traspasar a una placa Petri que contenia 3 ml de medi DMEM suplementat i en la cabina es va macerar amb un colador d'hacer inoxidable. A continuació, els eritròcits es van lisar amb 2 ml de solució de lisis (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, Na_2EDTA 1 mM, pH 7'3) i es va deixar 5 min en gel. Després es va centrifugar a 1.100 rpm durant 5 min, s'eliminà el sobrenadant, el pellet es va llavar amb medi DMEM s/s i, per últim, es va realitzar el recompte d'esplenòcits utilitzant blau tripà (aproximadament han d'haver 1×10^8 esplenòcits).

Mentrestant, es va fundir 1g de PEG 4000 (Merck) a 70°C , en un tub prèviament autoclavat, es va passar a 40°C i se li va afegir 1:1 de medi DMEM sense sèrum.

Una vegada tot preparat, es mesclaren les cèl·lules Sp2 i els esplenòcits en medi sense sèrum en el corning de 50 ml, es va centrifugar, s'eliminà el sobrenadant i amb colps suaus es va remoure el sediment. A continuació, se li va afegir de forma successiva les següents quantitats:

1er minut: 0'8 ml de PEG 50% amb pipeta d'1 ml

2n minut: 1 ml de DMEM s/s amb la mateixa pipeta

3r minut: 2 ml de DMEM

4t minut: 4 ml de DMEM

5é minut: 4 ml de DMEM

6é minut: 5 ml de DMEM

7é minut: 5 ml de DMEM

8é minut: 10 ml de DMEM

Tot seguit, es va centrifugar a 1.100 rpm durant 5 min, s'eliminà el sobrenadant, s'agregà el medi DMEM amb 20% de SBF/HAT que conté les cèl·lules “*feeder*”, i es va deixar incubant a 37°C en estufa de CO₂ durant 1 hora.

Per últim, passada l'hora d'incubació, la mescla es dispensava en les plaques de 96 pouets a raó de 100 µl/pouet en unes plaques i 200 µl/pouet en altres. Als 4 dies, s'afegiren 0'2 ml de medi HAT (dia 5) i al 7é dia, s'eliminaren 0'1 ml de medi i s'afegiren 0'1 ml de medi fresc, repetint cada 2-3 dies fins que el creixement dels hibridomes arribava al 10-50% de la superfície del pouet. Al cap de dos setmanes, es canviava el medi HAT per HT (Gibco).

Una vegada l'hibridoma proliferava i secretava l'anticòs d'interés es realitzava l'aïllament de cèl·lules del mateix per **dilució límit**, seguint el protocol descrit en el “*Current Protocols in Molecular Biology*” (Fuller et al., 2000). Bàsicament, es realitzaven dilucions seriades en una placa de 96 pouets, en medi HT, per a individualitzar una cèl·lula híbrida per pouet. Quan l'hibridoma creixia fins el 50% del pouet s'analitzava la presència de l'anticòs específic en qüestió en el sobrenadant del cultiu. Si era positiu, el clon

es congelava i s'expandia. Hi ha que tindre en compte que per a assegurar la monoclonalitat de l'hibridoma i la seua estabilitat, s'havien de clonar almenys de 2 a 3 vegades.

Per a l'expansió i creixement dels clons s'utilitzaven frascos T75 amb filtre (Corning) augmentant gradualment el volum de medi, és a dir, de la placa de 96 es passava a una de 24 pouets, després a una de 6, després a un frasc T25 i per últim a un T75. A banda, s'havia de vigilar diàriament la viabilitat cel·lular i la presència de contaminacions.

3.3.5. Selecció d'hibridomes productors d'AcMo anti-NoV per ELISA

La selecció dels hibridomes es va dur a terme mitjançant la tècnica d'ELISA, igual que en l'apartat 3.3.3, però en compte d'utilitzar els sèrums dels ratolins immunitzats, s'utilitzaren els sobrenadants dels diferents hibridomes produïts.

A banda de sensibilitzar la placa amb VLPs i lisats cel·lulars de Sf9, també es sensibilitzaren amb femtes procedents d'individus positius per a norovirus GII i femtes negatives, tant per a NoV com per a RV, com a controls negatius.

3.3.6. Caracterització per Western blot i ELISA de la reactivitat dels AcMo

La caracterització dels AcMo produïts s'ha dut a terme mitjançant la tècnica de **Western blot**, per a la qual cosa s'ha seguit el

mateix procediment que en l'apartat 3.2.6, amb alguns canvis. Com a anticòs primari s'utilitzaven els sobrenadants dels hibridomes o amb l'anticòs policlonal anti-NoV desenvolupat en conill (del Dr. Lennart Svensson), i com a anticòs secundari una mescla anti-IgG, anti-IgA i anti-IgM conjugats amb peroxidasa.

Per l'**ELISA**, les plaques de microtitulació es van sensibilitzar amb les diferents variants de VLPs (GI.1, GII.4-2006b, GII.4-v0 i GII.4-v2) i de partícules P (P-GI.1, P-GII.4-VA387 i P-GII.9, i domini P-GII.4-2007) de què es disposava, a una concentració de 2 µg/ml. A continuació, es van afegir els sobrenadants dels hibridomes (av0 i av2 del HPA) o els AcMo purificats (3C3G3 i anti-GI.1 cedit per l'empresa Certest Biotec S.L) a una dilució 1/1.000 i els diferents anticossos policlonals (sèrum de conill del Dr. Svensson i sèrum de conill del HPA) a una dilució 1/1.000 i 1/4.000, respectivament. La unió es va detectar amb un anticòs anti-IgG de ratolí (AcMo) o de conill (antisèrum) conjugat amb HRP (Santa Cruz Biotechnology), també a una dilució 1/2.000 com en el cas anterior, i la reacció es va revelar igual que en l'apartat 3.3.3.

Per altra part, es va utilitzar el kit *Mouse Monoclonal Antibody Isotyping* (Isostrip, Roche) per a determinar l'**isotip** de les immunoglobulines obtingudes. Es va realitzar una dilució 1:100 del sobrenadant i es van afegir 150 µl al tub de reacció, en el qual es va insertar la tira que proporciona el kit. Per últim, aproximadament als 5 min s'interpretaven els resultats.

3.3.7. Anàlisi de les seqüències d'aminoàcids de les diferents variants de GII.4

Les seqüències aminoacídiques corresponents al subdomini P2 de les VLPs de GII.4 es van alinear mitjançant el programa *Clustal X* (versió 2.1) (Thompson et al., 1997) amb la partícula P de la variant VA387, utilitzant aquesta última com a soca de referència. Les dades de la seqüència d'aminoàcids es van obtenir a partir de la seqüència nucleotídica utilitzant el programa *BioEdit* (Hall, 1999).

3.4. MOSTRES CLÍNIQUES

3.4.1. Mostres de femtes

Les mostres es van recollir del brot esporàdic de gastroenteritis per NoV en el recipient que s'utilitza per als anàlisis d'orina i es va conservar a 4°C fins la seua determinació.

3.4.2. Mostres de saliva

Les mostres de saliva es van recollir de 21 voluntaris adults sans (sense ingesta de medicació actual o recent), després de signar el consentiment informat per escrit, en tubs Corning de 20 ml. Per minimitzar els efectes del ritme circadià, les mostres de saliva es van recollir sistemàticament pel matí (de 8 a 10 h). A més, els participants van rebre instruccions de no fumar, menjar, beure, o raspallar-se les dents en les 2 h abans de la recollida de saliva.

A continuació, aquestes mostres s'aliquotaven en alíquotes d'1 ml i se centrifugaven a 10.000 x g durant 5 min per a eliminar el

material particulat, i possibles cèl·lules microbianes o de l'hoste. Després es bollien a 100°C (per a desnaturalitzar els possibles anticossos presents), es recollien els sobrenadants, es dividien en diverses alíquotes i s'emmagatzemaven a -80°C fins al seu ús.

Per al genotipat de les mostres i la detecció d'anticossos IgA específics de NoV, les salives se centrifugaven, s'aliquotaven i es congelaven directament a -80°C.

3.4.3. Mostres de sang i de sèrum

Les mostres de sèrum utilitzades en l'estudi de seroprevalença d'anticossos anti-NoVs procedien de la seroteca del Servei de Microbiologia de l'Hospital Clínic Universitari de València. Es van elegir un total de 443 mostres anonimitzades de sèrum d'individus sans dels anys 2009 a 2010. El rang d'edat va ser entre 7 mesos i 86 anys; el 54,2% dels pacients eren dones i el 45,8% eren homes i es van dividir en 10 grups d'edat de la següent manera: menors de 1 any (5 sèrums), entre les edats d'1 i 5 anys (34 sèrums), entre els 6 i els 10 anys (14 sèrums), entre els 11 i 20 anys (41 sèrums), entre els 21 i 30 anys (69 sèrums), entre els 31 i 40 anys (99 sèrums), entre els 41 i 50 anys (61 sèrums), entre els 51 i 59 anys (47 sèrums), entre els 60 i 69 anys (30 sèrums), i els majors de 70 anys (43 sèrums).

No hi va haver associació entre la recollida de les mostres i la presència o absència de gastroenteritis víriques conegudes recentment. Els sèrums es van emmagatzemar a -20°C abans del seu ús.

Per a l'estudi d'un brot natural de gastroenteritis per NoV en una família de 9 persones es van recollir els sèrums, dels individus de la família en qüestió amb el consentiment informat per escrit, als 14 dies (sèrums en fase aguda) i a l'any post-infecció (sèrums en fase convalescent).

La sang va ser estreta per personal qualificat amb xeringa i utilitzant tubs de tapó roig, que contenen agents coagulants de la sang. Les mostres es dixaren a 4°C o/n i es va recollir el sèrum format i es va centrifugar dues vegades a 3.000 rpm durant 5 min. El sèrum del sobrenadant es va aliquotar i es va guardar a -30°C.

Per altra part, també es van recollir unes gotetes de sang en un tub eppendorf per a la determinació del grup sanguini de cada individu.

3.5. DETERMINACIÓ DEL GENOTIP DE NOV

Una xicoteta mostra de massa de les femtes arreplegades en el brot de GEA (20%) es va resuspendre en PBS i l'ARN viral es va extraure amb Trizol LS (Invitrogen, Paisley, Scotland) segons les indicacions del fabricant. A continuació es va realitzar una RT-PCR amb el *primer NVp110* (Johansson et al., 2002) (Taula 7) i els gens de la polimerasa es van amplificar mitjançant PCR (termociclador TECHNE model TC-512) utilitzant els *primers JV12* (Fw) i *JV13* (Rev) (Vinjé & Koopmans, 1996) (Taula 8). Després de comprovar l'amplificació mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1% i tinció

Material i mètodes

amb RedSafe (Intron Biotechnology), les seqüències obtingudes més el primer JV12 s'enviaren al laboratori de Genòmica del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) de la Universitat de València.

NVp110 5'- AC[A/T/G]AT[C/T]TCATCATCATCACCATA -3'

JV12 (Fw) 5'- ATACCACTATGATGCAGATTA -3'

JV13 (Rev) 5'- TCATCATCACCATAGAAAAGAG -3'

El genotip de la variant de NoV es va determinar en base a l'anàlisi de la seqüència parcial del gen de la polimerasa i / o gen de la càpside. Els genotips van ser identificats i classificats usant l'eina de tipificació www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool basada en la similitud de les seqüències de soques de referència que representen els genotips coneguts.

Taula 7. Quantitats necessàries de reactius per a la RT-PCR de NoV.

RT-PCR de NoV		
ARN viral	9 µl	
Primer NVp110 10µM	1 µl	Pre-RT (desnaturalització): 65°C 5 min.
Tampó RT	6 µl	
DTT 0,1 mM	1'5 µl	RT:
dNTPs 10mM	1 µl	1 cicle de 50 min a 50°C
RNasin 40U/µl	0'25 µl	1 cicle de 15 min a 70°C
SuperScript III RT 200U/µl	0'2 µl	1 cicle de 2 min a 4°C
H₂O DEPC	11'05 µl	
TOTAL	20 µl	

Taula 8. Quantitats necessàries de reactius per a una reacció d'amplificació del gen de la càpside de NoV.

PCR amb l'enzim Taq polimerasa		
cADN	5 µl	
Tampó 10X	5 µl	Cicle inicial a 94°C 2 min.
MgCl₂ 50 mM	2 µl	35 cicles de:
dNTPs 10mM	0'5 µl	Desnaturalització a 94°C 1 min.
Primer Forward JV12	3 µl	Hibridació a 45°C 1 min.
Primer Reverse JV13	3 µl	Extensió a 72°C 1 min.
Taq polimerasa (Biotools)	0'4 µl	Cicle final d'extensió a 72°C 10 min.
H₂O DEPC	31'1 µl	
TOTAL	50 µl	

3.6. DETERMINACIÓ DEL GENOTIP SECRETOR (GEN *FUT2*)

L'estat secretor d'un individu ve determinat pel gen *FUT2* que codifica l'enzim α 1,2-fucosiltransferasa, és a dir, presència (secretor, SeSe o Sese) o absència (no secretor, sese) de l'antigen H o l'antigen Lewis^b (Le^b) en la saliva o altres secrecions mucoses. Per tant, per a determinar l'estat secretor es va amplificar un fragment d'aquest gen *FUT2* mitjançant PCR-RFLP descrita per Lindesmith i col. (2003) i Serpa i col. (2004), amb xicotetes modificacions.

L'ADN de les mostres de saliva es va extraure utilitzant el kit comercial *QIAmp DNA Mini Kit* (Qiagen, Alemanya) i es va seguir el protocol proporcionat pel fabricant de l'apartat "*Blood and Body Fluid*

Spin Protocol". Aquest ADN és el que s'utilitzà per a l'amplificació del gen FUT2 per PCR.

Els oligonucleòtids sintètics que es van utilitzar es mostren en la següent taula (Taula 9):

Taula 9. Seqüència dels oligonucleòtids sintètics utilitzats per a l'amplificació del gen secretor humà FUT2

Seqüència 5'-3'	Ubicació (nt)	Tm (°C)	Tamany amplificat (pb)	% GC
Fw:GAGGAATACCGCCACATCCCGGGGAGTAC	403-432	80'6		63'3
Rv:ATGGACCCCTACAAAGGTGCCCGGCCGGCT	568-597	85'4	194	66'7

La mescla dels reactius per a la reacció de PCR es detalla en la taula 10. Els productes de 194 parells de bases (pb) s'analitzaren mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 2% i tinció amb RedSafe (Intron Biotechnology), a 90 V durant 1 h. Les bandes es visualitzaren en un transil·luminador UV (GelPrinter TDI) i com a pes molecular s'utilitzà el 100 pb *plus DNA ladder* (Invitrogen).



Figura 3.3. Esquema del patró de bandes que s'obté després de la digestió enzimàtica dels fragments de PCR amb *Ava-II*.

Una vegada obtinguts els productes d'amplificació per PCR, aquests eren sotmesos a una digestió enzimàtica utilitzant *Ava-II* (Fermentas) com a enzim de restricció (Taula 11). La mescla s'incubava a 37°C durant 2'5 h i els fragments s'analitzaven en un gel d'agarosa al 2'5%. Si l'enzim no digereix el producte de PCR s'obté un sol fragment de 195 pb, definint a la persona com "no secretora" (sese); per contra, quan té lloc la digestió s'aprecien dos fragments en el cas del "secretor homozigot" (SeSe) (136 i 59 pb) i tres en el cas del "secretor heterozigot" (Sese) (195, 136 i 59 pb) (Fig. 3.3).

3.7. DETERMINACIÓ DEL GRUP SANGUINI ABO

La identificació dels diferents grups sanguinis A, B i O, es va determinar mitjançant la tècnica d'hemaglutinació utilitzant el kit ALBAclone® Monoclonal ABO Antisera (Alpha Laboratories) i seguint les instruccions del fabricant amb les mostres de sang fresca.

Taula 10. Quantitats necessàries de reactius per a una reacció d'amplificació del gen FUT2 per PCR.

PCR amb l'enzim Taq polimerasa		
ADNg	5 µl	
Tampó 10X	5 µl	Cicle inicial a 95°C 5 min.
MgCl₂ 50 mM	2'5 µl	35 cicles de:
dNTPs 10mM	1 µl	Desnaturalització a 94°C 30s
Primer Forward 10 µM	2 µl	Hibridació a 70°C 30s
Primer Reverse 10 µM	2 µl	Extensió a 72°C 1 min.
Taq polimerasa (Biotools)	0'5 µl	Cicle final d'extensió a 72°C 10 min.
H₂O DEPC	32 µl	
TOTAL	50 µl	

Taula 11. Quantitats necessàries de reactius per a la digestió dels fragments amplificats del gen FUT2.

Digestió amb l'enzim Ava II	
Producte de la PCR	10 µl
H ₂ O DEPC	18 µl
10X Buffer R	2 µl
Eco47I (Ava II)	1 µl
TOTAL	31 µl

3.8. ENZIMOIMMUNOASSAIGS (ELISA)

3.8.1. Determinació d'antígens Lewis

La presència d'HBGAs a la saliva es va determinar mitjançant la detecció dels antígens Lewis a, b, x i y (Le^a, Le^b, Le^x i Le^y) utilitzant les mostres de saliva tractades prèviament (Fig. 3.4).

Les plaques de microtitulació (Costar) es van sensibilitzar amb una dilució 1/1.000 de les mostres de saliva en tampó carbonat/bicarbonat pH 9'6 i es van incubar o/n a 4°C en atmosfera humida, cada mostra per duplicat per a cada antigen Le. Després es va bloquejar amb una solució de PBS que contenia 3% de seroalbúmina bovina (Sigma) (PBS-BSA 3%) a 37°C durant 30 min, i, a continuació, es va incubar durant 1 h a 37°C amb els diferents AcMo específics de cada antigen Le a una dilució 1/100 en PBS-BSA 1%: anti-Le^a BG-5, Le^b BG-6, Le^x BG-7 and Le^y BG-3 (Covance). Per últim, es va incubar amb una dilució 1/2.000 d'una mescla d'anticossos secundaris anti-IgG (Le^a i Le^b), anti-IgM (Le^x i Le^y) i

anti-IgA de ratolí conjugats amb peroxidasa de rave (“*horseradish peroxidase*”, HRP) (Sigma) 1 h a 37°C.

Després de cada pas, les plaques es llavaven 3 vegades amb 300 µl de PBS + 0’05% de Tween-20 (Sigma) (PBS-T 0’05%). La senyal es detectava mitjançant l’addició d’OPD Fast (Sigma), la reacció es parava per l’addició de 50 µl d’àcid sulfúric 3M (H₂SO₄) i l’absorbància es llegia a 492 nm (espectrofotòmetre Multiskan FC, Thermo Scientific).

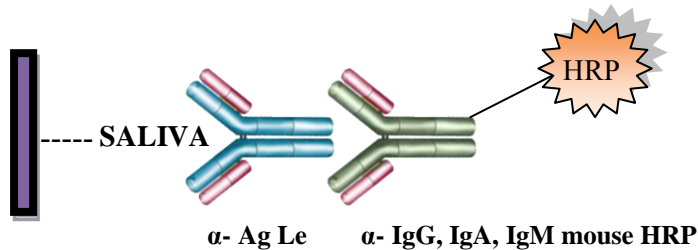


Figura 3.4. Esquema de l’ELISA de determinació dels antigens Lewis en mostres de saliva.

3.8.2. “*Binding*” de VLPs a saliva

Totes les variants tant de rVLPs (GI.1, GII.4-v0, GII.4-v2 i GII.4-2006b) com de partícules P (P-GI.1, P-GII.4, i P-GII.9, i el domini P-GII.4-2007) es van utilitzar per a analitzar els diferents patrons de “*binding*” a saliva que presenten (Fig. 3.5).

La sensibilització de les plaques es va dur a terme amb les mostres de saliva, prèviament centrifugades i desnaturalitzades, igual que en l’apartat anterior però a una dilució 1/500 i a 37°C o/n. Després del bloqueig amb PBS-BSA 3%, les plaques sensibilitzades

s'incubaren amb la rVLP o partícula P corresponent, segons el cas, durant 1'5 h a 37°C. El “*binding*” es va detectar amb l'anticòs policlonal desenvolupat en conill (del Dr. Lennart Svensson), excepte per a la variant de rVLP GI.1 on es va utilitzar un AcMo anti-GI.1 cedit per l'empresa Certest Biotec S.L, i posterior addició del conjugat amb HRP de l'anti-IgG de conill (detecció antisèrum policlonal) o de ratolí (AcMo) (Santa Cruz Biotechnology), a 37°C i durant 1 h en cada pas. La reactivitat es va mesurar com s'ha descrit abans.

3.8.3. “*Binding*” de VLPs i partícules P a mucina gàstrica porcina (PGM)

Les plaques de microtitulació es van sensibilitzar amb PGM a 10 o 50 µg/ml en tampó carbonat-bicarbonat (pH 9'6) a 37°C o/n. Les plaques es van llavar i es van bloquejar com s'ha descrit anteriorment, i es van incubar durant 1 h amb les VLPs o partícules P a 37°C. Després dels corresponents llavats, les plaques es van incubar amb els anticossos primaris i secundaris i es va mesurar la reactivitat com es descriu en els punts anteriors.

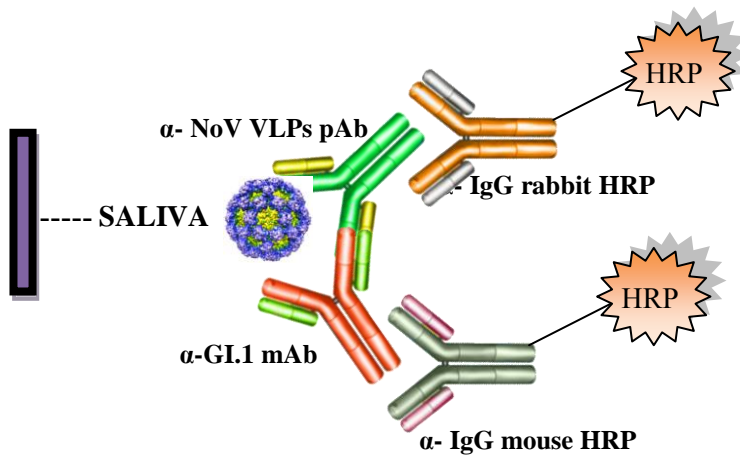


Figura 3.5. Esquema de l'ELISA de determinació del “binding” de les diferents VLPs a saliva.

3.8.4. Detecció d'anticossos IgA específics de NoV en mostres de saliva

Per a determinar la quantitat d'anticossos de classe IgA específics de NoV presents en les mostres de saliva dels individus afectats pel brot de GEA i altres salives control, les plaques de microtitulació es van sensibilitzar amb les 4 variants de VLPs de què es disposaven: GI.1 i GII.4-2006b a 10 µg/ml i GII.4-v0 i GII.4-v2 a 1 µg/ml, i es van incubar o/n a 4°C. Després del bloqueig amb PBS-BSA 3%, les plaques sensibilitzades s'incubaren amb dilucions seriades de les salives (de 1/20 fins a 1/160) durant 1'5 h a 37°C i la detecció es va dur a terme amb l'addició d'un anticòs secundari anti-IgA humana conjugat amb HRP (Sigma) a una dilució 1/4.000 durant 1 h a 37°C. El revelat es duia a terme com en els casos anteriors.

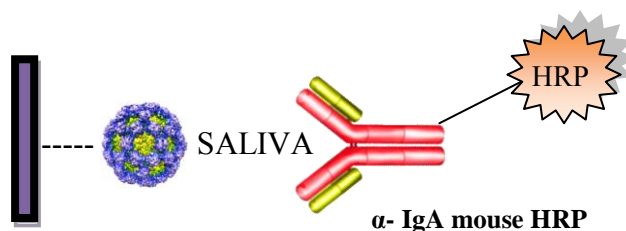


Figura 3.6. Esquema de l'ELISA de determinació d'anticossos de classe IgA específics de NoV en saliva.

3.8.5. Detecció d'anticossos IgG específics de NoV en mostres de sèrums

Per mesurar la seroreactivitat contra els NoV es va seguir un protocol descrit anteriorment amb algunes modificacions (Parker et al., 1994; Nurminen et al., 2011). La proteïna purificada P o les VLPs (preparades com es descriu anteriorment), a una concentració d'1 i 10 µg/ml, respectivament, en 0'1 M de tampó de carbonat/bicarbonat (pH 9'6), es van utilitzar per a sensibilitzar les plaques (100 µl/pouet), i es van incubar o/n a 4°C. Les diferents mostres de sèrum a diferents dilucions (1/100, 1/200, 1/500, 1/1.000 i 1/5.000) en PBS-BSA 1% s'afegien a la placa sensibilitzada i s'incubaven durant 1 h a 37°C. L'anticòs secundari anti-IgG humana conjugat amb HRP a una dilució 1/4.000 (Santa Cruz Biotechnology) s'incubava una altra hora a 37°C i el revelat es duia a terme com s'ha descrit en els casos anteriors. Entre cada incubació, sempre en atmosfera humida, la placa es llavava 3 vegades amb PBS-T 0'1%. Les mostres es consideraven positives quan el seu valor d'OD era tres vegades més alt que el valor de l'absorbància del control negatiu (pouets recoberts amb BSA a 10 µg/ml). El títol de cada mostra es va considerar la inversa de

l'última dilució que mostrava una reacció positiva. També es van calcular els títols mitjans geomètrics d'anticossos IgG sèrics per tal de realitzar comparacions entre els diferents grups d'edat.

En el cas dels assajos de titulació d'anticossos IgG anti-NoV amb els sèrums del brot de GEA, tant de la fase aguda com de la memòria, el procediment era igual que en el cas anterior però, amb xicotetes modificacions. La sensibilització de les plaques es va fer amb les diferents variants de VLPs (GI.1, GII.4-2006b, GII.4-v0 i GII.4-v2) i de partícules P (P-GI.1, P-GII.4-VA387 i P-GII.9) de què es disposava, a una concentració de 2 µg/ml. A continuació, s'afegien les dilucions seriades dels diferents sèrums desde 1/100 a 1/12.800 i es procedia de la mateixa forma que el cas anterior.

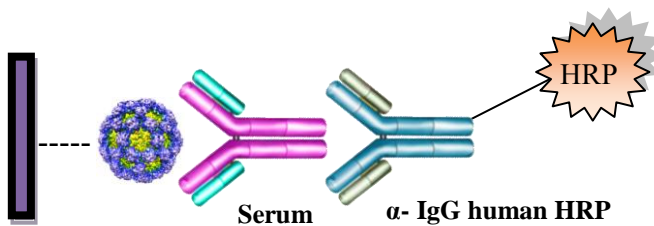


Figura 3.7. Esquema de l'ELISA de titulació d'anticossos sèrics de classe IgG específics de NoV en mostres de sèrums humans.

3.8.6. Assaigs de bloqueig

Es va seguir el mateix protocol d'EIA utilitzat per a mesurar la unió de les VLPs als HBGAs en mostres de saliva, amb l'addició d'una etapa d'incubació amb els diferents AcMo abans de l'addició de

les VLPs i/o la preincubació d'aquestes en presència dels AcMo anti-NoV específics analitzats.

Els **AcMo anti-antígens Le** es van afegir a la placa sensibilitzada amb les diferents salives (una placa amb saliva d'un individu Sese i altra d'un individu sese) a una dilució 1:10. Les VLPs de NoV (GI.1, GII.4-2006b, GII.4-v0 i GII.4-v2) es van afegir a 2-10 µg/ml dependent de la variant de VLP, i la seva detecció es va realitzar amb el sèrum policlonal de conill anti-NoV (Dr. Svensson) seguida de l'addició de l'anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat amb HRP diluït 1/10.000 (Bioss, EUA).

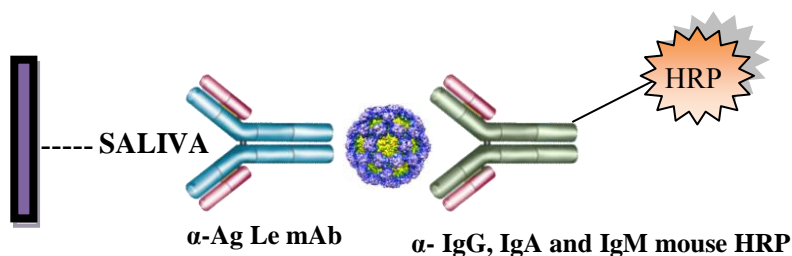


Figura 3.8. Esquema de l'assaig de bloqueig de les VLPs a mostres de saliva mitjançant els diferents AcMo anti-antígens Le (Le^a , Le^b , Le^x i Le^y).

La capacitat bloquejant dels **AcMo anti-NoVs** de la unió de les VLPs a la saliva va ser provada utilitzant dilucions en sèrie de 2 vegades de cada AcMo començant per 1/100 fins 1/3.200. Les VLPs (2 µg/ml en PBS) es van preincubar amb els anticossos estudiats, o sols amb PBS com a control negatiu, durant 1 h a 37°C. Els mix es van afegir a les plaques sensibilitzades amb saliva i es van incubar durant altra hora a 37°C. La unió de les VLPs es va determinar per incubació

amb anticossos anti-IgG de ratolí o de conill conjugats amb HRP (dilució 1/2.000, Santa Cruz Biotechnology), segons el cas, seguit del pas de l'addició del substrat de la peroxidasa, TMB.

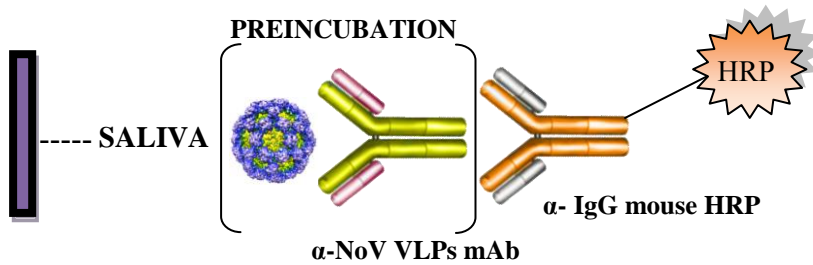


Figura 3.9. Esquema de l'assaig de bloqueig de les VLPs amb els AcMo anti-NoV, cada variant de VLP amb el seu AcMo homòleg, a mostres de saliva.

El **bloqueig de la unió a PGM** es va determinar utilitzant el format d'assaig descrit en el cas anterior però amb plaques de microtitulació sensibilitzades amb PGM (5 μ g/ml). L'esquema seguit és igual que el de la figura 3.9 però canviant la saliva per la PGM.

Per últim, la capacitat bloquejant dels **sèrums convalescents** de la fase aguda del brot de gastroenteritis aguda així com la de 15 **sèrums analitzats en l'estudi de seroprevalença**, es va estudiar de la mateixa forma que en el cas dels AcMo anti-NoV, però preincubant les VLPs (1 o 10 μ g/ml segons la variant) amb dilucions seriades dels sèrums començant també per 1/100 fins 1/3.200. La detecció es va realitzar amb l'antisèrum de conill (Dr. Svensson) a una dilució 1/1.000 seguida de l'anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat amb HRP a una dilució 1/2.000 i el revelat igual que en els casos anteriors. En aquest cas, l'esquema seguit és igual que el de la figura anterior

(Fig. 3.9) però fent la preincubació de les VLPs amb el sèrum corresponent i amb un pas addicional abans d'afegir l'anticòs secundari corresponent a l'antisèrum de conill.

El bloqueig de la unió de les VLPs pels anticossos monoclonals estudiats es va determinar mitjançant la comparació de la densitat òptica (OD_{450}) dels valors obtinguts en els pouets que contenen els reactius potencials de bloqueig vs. els pouets de control (sense els passos de bloqueig). Es va considerar que hi havia bloqueig quan el valor de la OD era menor del 50% de la OD del control positiu.

3.9. IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTA (IFI)

3.9.1. Titulació de baculovirus i de l'expressió de NoV

El protocol general seguit va ser el següent:

➤ Les cèl·lules Sf9 es van conrear sobre cobreobjectes redons (Marienfeld GmbH & Co. KG) en plaques de 24 pouets (Costar), a una concentració d' 1×10^6 cèl/ml (500 μ l/pouet) per a formar una monocapa confluent, que en el cas de les cèl·lules Sf9 era al cap de l'hora.

➤ La monocapa cel·lular es va infectar amb les dilucions del virus (10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5} per detectar l'antigen de baculovirus i 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} per detectar VP1 de NoV) en medi SF900 II i es va realitzar l'adsorció a 27°C durant una hora, agitant cada 10-15 min.

- Després de l'adsorció es va retirar l'inòcul i es va afegir el medi de manteniment (0'5 ml de SF900 II).
- El cultiu cel·lular infectat es va incubar en estufa durant un dia per a titular baculovirus i durant 2 dies per a veure l'expressió de les proteïnes recombinants de NoV.
- Una vegada transcorregut el temps d'incubació, les cèl·lules es van fixar amb metanol:acetona (1:1) en gel durant almenys 15 min i una vegada fixades es llavaren dues vegades amb PBS.
- A continuació, s'incubaren amb l'anticòs primari diluït en PBS-BSA 1% durant 1 h a 27°C (Taula 12). Al realitzar-se en parafilm, es col·loca una gota de 40 µl per cada cobreobjectes (si es realitzara en la placa s'haurien d'utilitzar 200 µl/pouet). La incubació s'ha de realitzar en ambient humit.
- Després, les cèl·lules es van rentar 3 vegades amb PBS i es van incubar amb l'anticòs primari: anti-IgG, específic de cada anticòs primari, marcat amb el fluorocrom desitjat (FITC en aquest cas) durant una hora a 27°C (Taula 12).
- Seguidament, es llavaren 5 vegades en PBS i es van tintar amb el colorant de contrast blau d'Evans, per reduir el soroll de fons i fer ressaltar la fluorescència, durant 10 min i es van llavar en PBS.
- Finalment, es va realitzar un muntatge en portaobjectes amb glicerol tamponat (Light Diagnostics).

Les lectures es realitzaren amb un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E600, i les imatges foren captades amb una càmera Nikon Coolpix 4500 amb un adaptador per a l'ocular.

Taula 12. Llistat dels anticossos i les corresponents dilucions necessàries per a la titulació de baculovirus i de norovirus mitjançant IFI.

Anticòs primari	Anticòs secundari
AcMo anti-baculovirus (mouse) (Sigma) 1/200	anti-IgG de ratolí FITC (Santa Cruz Biotechnology) 1/400
sèrum de conill anti-NoV (Dr. Svensson) o AcMo 3C3G3 1/200	anti-IgG de conill FITC (Santa Cruz Biotechnology) 1/400

3.9.2. Assaigs de “*binding*” de VLPs i partícules P a cèl·lules Caco-2

Les cèl·lules Caco-2 es van sembrar a 2×10^5 cèl·lules/ml en portaobjectes de cultius (8 camaretes de poliestiré per a cultiu de teixits en un portaobjectes de vidre tractat, BD Falcon) i es van cultivar durant 9-10 dies per a permetre la seua diferenciació cel·lular (D-Caco-2). Una vegada obtingudes les cèl·lules D-Caco-2 es van rentar dues vegades amb PBS-T 0,05% i es van incubar amb les VLPs (5 µg/ml) o les partícules P (10 µg/ml) en 200 µl de DMEM a 37°C durant 1 h, sota atmosfera humidificada. Després de llavar 3 vegades amb PBS-T 0,05%, les cèl·lules es van fixar amb metanol durant 15 min a temperatura ambient i després es va bloquejar amb PBS que contenia 1% de llet desnatada (PBS-llet 1%) durant 30 min a 37°C.

Les cèl·lules fixades es van incubar posteriorment a 37°C durant 1 h amb un anticòs IgG policlonal de conill anti-VLPs de NoV (HPA, Londres) a una dilució 1/4.000 en PBS o anti-His (H-15) (Santa Cruz Biotechnology) a 1/100 (només per a detectar les partícules P). Després de llavar les cèl·lules, es van incubar amb un anti-IgG de conill desenvolupat en cabra i conjugat amb FITC (Abcam) a 1/1.000 o un anti-IgG de ratolí per a la detecció de les partícules P a 1/2.000 (Santa Cruz Biotechnology) durant 1 h a 37°C. Finalment, els portaobjectes es van muntar amb 10% de glicerol en solució salina i les preparacions es van observar sota un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse 80i equipat amb una càmera digital i el controlador de la càmera Hamamatsu C4742 - 95.

3.9.3. Expressió d'antígens HBGA en la superfície de cèl·lules Caco-2

Aquesta IFI es va realitzar com s'ha descrit en l'apartat anterior, però amb xicotetes modificacions, per tal d'analitzar l'expressió d'antígens Lewis (utilitzant anticossos anti-Le^a BG-5, Le^b BG-6, Le^x BG-7 i Le^y BG-8, Covance) i H (AcMo contra els antígens histosanguinis H1 (O) i H2, Abcam). Els AcMo anti-antígens Lewis es van utilitzar diluïts a 1/100 i els anti-antígens H a 1/200. Per a detectar la unió, es va utilitzar un anticòs secundari anti-IgG de ratolí conjugat amb FITC (Santa Cruz Biotechnology) diluït 1/2.000 i es va observar com abans.

3.9.4. Assaigs de bloqueig del “*binding*” a cèl·lules Caco-2

Per a avaluar la capacitat dels anticossos específics **anti-HBGA** per bloquejar la unió de les VLPs a les cèl·lules D-Caco-2, les camaretes de cultiu es van incubar amb els anticossos específics anti-Le^y, anti-H1 o anti-H2 (com s’ha descrit per a l’assaig d’expressió dels HBGAs) abans de la incubació amb la VLP de NoV de la variant GII.4-v2.

Per tal d’estudiar la capacitat dels anticossos **anti-NoV** per bloquejar la unió de les VLPs també a cèl·lules D-Caco-2, les VLP es preincubaren amb el seu antisèrum homòleg utilitzant les mateixes condicions que en els assajos de bloqueig a saliva, però amb medi DMEM com a diluent.

El bloqueig del “*binding*” de les VLPs a les cèl·lules D-Caco-2 per **PGM** o **mostres de saliva** de diferents grups sanguinis ABO, es va realitzar mitjançant la preincubació de les VLPs de la variant GII.4-v2 durant 1 h a 37°C a una concentració de PGM de 0, 10 i 50 µg/ml o amb la saliva a una dilució 1/500. La resta del protocol és la mateixa que es descriu a la secció dels assajos de “*binding*”.

Les cèl·lules del control es van incubar amb tampó en lloc del mix AcMo/VLP, i les VLPs en absència d’AcMo, PGM o saliva es van utilitzar com a controls positius del “*binding*”.

L'especificitat de la fluorescència es va avaluar en els controls negatius mitjançant (1) l'omissió de l'etapa d'addició de les VLPs i (2) la substitució dels anticossos primaris per PBS-BSA 3%.

La immunofluorescència es va avaluar en una escala semiquantitativa mitjançant el càlcul del nombre de cèl·lules positives en cada cambra de la següent forma: 3 +, 80-100% de cèl·lules positives, 2 +, 40-80% de cèl·lules positives, 1 +, 20-40% de cèl·lules positives, (-), cèl·lules negatives.

3.10. DETERMINACIÓ DE L'EPÍTOP RECONEGUT PER L'AcMo 3C3G3 MITJANÇANT LA TÈCNICA DE “PHAGE DISPLAY”

El “*phage display*” (o presentació en fags) descriu una tècnica de selecció en el qual una biblioteca de diferents pèptids o proteïnes (random pèptids) s'expressa en l'exterior d'un virió del fag M13, en aquest cas. De manera que el fonament d'aquesta tècnica es basa en l'afinitat d'unió a una molècula diana donada (anticossos, enzims, receptors de superfície cel·lular, etc) per un procés de selecció *in vitro* denominat “*panning*”.

En la seva forma més simple, es porta a terme mitjançant la incubació de la biblioteca de pèptids presentats en fags en una placa recoberta amb la molècula diana, seguida de diversos llavats que eliminen el fag no unit i finalment, l'elució del fag unit específicament (Fig. 3.10A). El fag eluït s'amplifica i es realitzen diversos cicles

d'unió/amplificació addicionals per enriquir el “*pool*” a favor de les seqüències d'unió. Després de 3-4 rondes, els clons individuals es caracteritzen per seqüenciació d'ADN i ELISA.

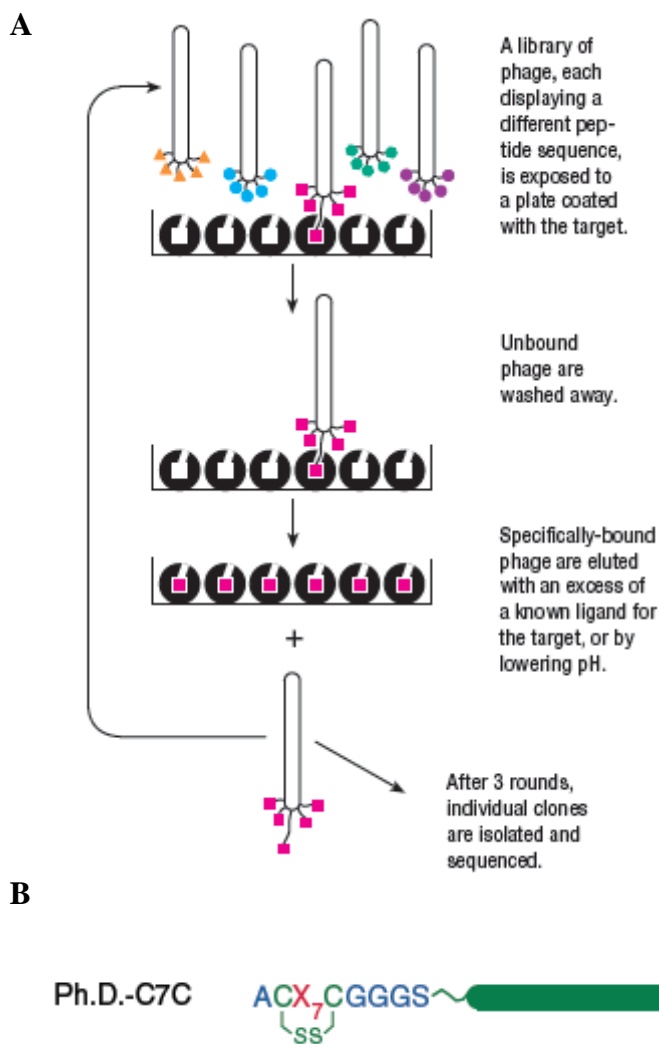


Figura 3.10. A) Esquema d'un exemple de “*panning*” amb una llibreria de pentapèptids presentats pel fag M13. B) Llibreria Ph.D.-C7C utilitzada on es mostra el segment aleatori i la seqüència d'unió (New England BioLabs).

En el nostre cas, s'ha utilitzat la llibreria **Ph.D.-C7C** (heptapèptids constrenyits) (New England BioLabs) que està flanquejada per un parell de residus de Cys que a l'oxidar-se formen un pont disulfur i la seqüència és presentada en forma de “*loops*” (Fig. 3.10B), ja que l'epítot que reconeix l'AcMo 3C3G3 és conformacional.

3.10.1. “Panning” de l'AcMo 3C3G3 directament a la placa de microtitulació de 96 pouets

El procediment seguit va ser el següent:

Dia 1

1. Preparar una solució de 100 µg/ml de l'AcMo en NaHCO₃ 0'1 M pH 8'6.
2. Afegir 150 µl d'aquesta solució a cada pouet i agitar diverses vegades fins que la superfície estiga completament banyada
3. Incubar durant la nit a 4°C amb agitació suau i en un recipient humidificat.

Dia 2

4. Inocular 10 ml de medi LB + tetraciclina (Tet) amb ER2738 (cultiu que s'utilitzarà per a la titulació en el pas 11 i es pot utilitzar en 5-10 h). També s'inocula un cultiu de 20 ml de LB en un matraç Erlenmeyer de 250 ml

per a dur a terme l'amplificació del fag eluït. Ambdós cultius s'incuben a 37°C amb agitació vigorosa. S'ha d'anar amb compte que el cultiu de 20 ml no creixca més enllà de la fase primerenca (OD_{600} 0'01-0'05).

5. Eliminar la solució de recobriment i girar la capa cap per avall sobre una tovallola de paper neta per eliminar la solució residual. Omplir cada pouet completament amb tampó de bloqueig ($NaHCO_3$ 0'1 M pH 8'6 amb 5 mg/ml de BSA). Incubar durant almenys 1 hora a 4°C.
6. Descartar la solució de bloqueig com en el pas anterior i llavar cada placa ràpidament 6 vegades amb TBST (TBS + 0'1% [v/v] de Tween-20). S'ha de treballar amb rapidesa per evitar la dessecació dels pouets.
7. Diluir una representació de 100 vegades la biblioteca (2×10^{11} pfu/ml) amb 100 μ l de TBST i agitar gentilment durant 45 min a t^a ambient.
8. Descartar els fags no units eliminant la solució i colpejant la placa cap per avall sobre una tovallola de paper neta.
9. Rentar els pouets 10 vegades amb TBST com en el pas 6 utilitzant una part neta de la tovallola de paper cada vegada i així evitar la contaminació creuada.

10. Eluir el fag unit amb 100 µl d'una solució 0'2 M de glicina-HCl (pH 2'2) + 1 mg/ml de BSA. Agitar durant 15 min com a màxim a T^a ambient i neutralitzar amb 15 µl/pouet amb una solució de Tris-HCl 1 M (pH 9'1).
11. Titular una xicoteta quantitat (aproximadament 10 µl i dilucions de 10⁻²-10⁻⁴) de l'eluit com es descriu en l'apartat 3.10.2.
12. Amplificar la resta de l'eluit mitjançant l'addició d'aquest al cultiu de 20 ml del punt 4 i incubar amb agitació vigorosa durant 4'5 hores a 37°C.
13. Transferir el cultiu a un tub de centrífuga i centrifugar durant 10 minuts a 12.000 g a 4°C (rotor A14). Transferir el sobrenadant a un tub nou i tornar a centrifugar (descartar el sediment).
14. Transferir el 80% de la part superior del sobrenadant a un tub nou i afegir a la mateixa 1/6 del volum de 20% PEG/2'5 M de NaCl. Deixar que el fag precipite a 4°C durant tota la nit.

Dia 3

15. Centrifugar el tub amb el fag precipitat a 12.000g durant 15 min a 4°C. Decantar i descartar el sobrenadant, tornar a centrifugar el tub breument, i retirar el

sobrenadant residual amb una pipeta. El fag deuria veure's com unaombra blanca precipitada en un dels costats del tub.

16. Resuspendre el sediment en 1 ml de TBS. Transferir la suspensió a un tub eppendorff i centrifugar a màxima velocitat (14.000 rpm) durant 5 min a 4°C per sedimentar les cèl·lules residuals.
17. Transferir el sobrenadant a un tub eppendorff nou i precipitar de nou mitjançant l'addició d'1/6 del volum amb 20% PEG/2'5 M de NaCl. Incubar en gel durant 45 min i centrifugar a 14.000 rpm durant 10 min a 4°C. Descartar el sobrenadant, tornar a centrifugar breument, i eliminar el sobrenadant residual amb una micropipeta.
18. Resuspendre el sediment en 200 µl de TBS i centrifugar durant 1 min per sedimentar qualsevol material insoluble restant. Transferir el sobrenadant a un tub nou. Aquest és **l'eluït amplificat**.
19. Titular l'eluït amplificat com es descriu en l'apartat 3.10.2 en plaques LB/IPTG/Xgal (dilucions de 10^{-8} a 10^{-11}). L'eluït es pot emmagatzemar durant un màxim de 3 setmanes a 4°C. Per a l'emmagatzematge a llarg termini, afegir un volum igual de glicerol estèril i emmagatzemar a -20°C.

20. Sensibilitzar altra placa de microtitulació per a la segona ronda seguint els passos anteriors de l'1-3.

Dies 4 i 5

21. Comptar el nombre de plaques blaves de les plaques de titulació del pas 19 i determinar el títol del fag, que hauria de ser de l'ordre de 10^{13} - 10^{14} pfu/ml. Utilitzar aquest paràmetre per a calcular el volum d'entrada corresponent al títol inicial per al pas 7. Si el títol del fag de l'eluït amplificat és massa baix, les següents rondes es poden dur a terme amb tan sols 10^9 pfu de fag d'entrada.
22. Dur a terme la 2^a ronda de selecció repetint els passos 4-18, utilitzant la quantitat calculada d'eluït amplificat de la 1^a ronda com a fag d'entrada.
23. Titular l'eluït amplificat resultant de la 2^a ronda en plaques LB/IPTG/Xgal (dilucions 10^{-4} - 10^{-7}).
24. Tornar a sensibilitzar per a la 3^a ronda.

Dia 6

25. Dur a terme una tercera ronda repetint els passos 4-10, utilitzant l'eluït amplificat de la 2^a ronda i un títol d'entrada equivalent al que es va utilitzar en la 1^a ronda (pas 7).

26. Titular la 3^a ronda sense amplificar l'eluït, com en el pas 11, en plaques LB/IPTG/Xgal (dilucions 10^{-2} - 10^{-6}). Les plaques d'aquesta titulació es poden utilitzar per a la seqüenciació, però s'han d'incubar a 37°C durant no més de 18 hores, ja que es podrien produir delecions. Una vegada incubades a 37°C, les plaques es poden emmagatzemar a 4°C d'1-3 dies, l'eluït restant durant almenys una setmana.
27. Per a la preparació dels diferents clons per a la seqüenciació o ELISA, preparar un cultiu o/n de 10 ml a partir d'una colònia d'ER2738 i seguir els passos de l'apartat 3.10.3.

3.10.2. Titulació del fag

Es va seguir el següent procediment:

1. Inocular 10 ml de LB amb una colònia de ER2738 i incubar amb agitació (~ 200 rpm) de 5 a 6 h (fins la fase semilogarítmica, OD₆₀₀ ~ 0,5).
2. Fondre el Top Agar al microones i dispensar 3 ml en tubs de cultiu estèrils (un tub per dilució del fag) i mantindre'ls a 45°C.
3. Precaentar, almenys durant un hora, una placa de LB/IPTG/Xgal per dilució del fag a 37°C fins que es vaja a utilitzar.

4. Preparar les dilucions seriades del fag (10x) en un volum final d'1 ml de LB.
5. Quan el cultiu del pas 1 arribe a la fase semilogarítmica, dispensar 200 µl en tubs eppendorf, un per a cada dilució del fag.
6. Per dur a terme la infecció, afegir 10 µl de cada dilució de fag a cada eppendorf amb el cultiu, vòrtex ràpidament i incubar a t^a ambient durant 1-5 min.
7. Transferir les cèl·lules infectades als tubs de cultiu que contenen el Top Agar a 45°C, dilució a dilució. Vòrtex breument i abocar **immediatament** la mescla en una placa LB/IPTG/Xgal precalentada. Inclinar suaument i girar la placa per difondre el Top Agar uniformement.
8. Dixar que les plaques es refreden durant 5 min, invertir i incubar o/n a 37°C.
9. Al dia següent, comptar el nombre de calves en aquelles plaques que tinguen aproximadament 100 calves. A continuació, multiplicar cada nombre pel factor de dilució per aconseguir el títol de fags en unitats formadores de calves (pfu) per 10 µl.

3.10.3. Amplificació de les calves per a seqüenciar

Per a poder seqüenciar i obtenir una seqüència consens és necessari amplificar el fag, bé de les calves individuals o del “*pool*” eluït, i obtenir així una quantitat suficient per a poder treballar.

1. Diluir un cultiu o/n de ER2738 1/100 en LB i dispensar 1 ml d'aquest cultiu diluït en tubs de cultiu, un per a cada clon a caracteritzar. De 10-20 clons de la 3^a ronda solen ser suficients per detectar una seqüència d'unió consens.
2. Utilitzar una pipeta Pasteur de cristall amb els extrems no sellats per tal de picar les calves blaves de les plaques de LB/IPTG/Xgal < d'1-3 dies d'edat, emmagatzemades a 4°C i amb < 100 calves, i transferir a un tub que conté el cultiu diluït. S'han d'elegir calves ben separades per tal d'assegurar que cada calva conté una única seqüència d'ADN.
3. Incubar els tubs a 37°C amb agitació durant 4'5-5 hores.
4. Transferir els cultius a tubs eppendorf i centrifugar a 14.000 rpm durant 30 seg. En aquest punt es pot seguir directament amb el protocol per a la seqüenciació (apartat següent 3.10.4) o bé passar el sobrenadant a un tub nou, tornar a centrifugar i transferir el 80% superior del sobrenadant a altre tub. Aquest és el stock de fag

amplificat i es pot guardar a 4°C fins que es vaja a utilitzar.

3.10.4. Purificació de l'ADN del fag

Després de la primera centrifugació de l'últim pas de l'apartat anterior, se segueixen els següents passos:

1. Transferir 500 µl del sobrenadant que conté el fag a un eppendorf nou.
2. Afegir 200 µl de 20% PEG/2'5 M NaCl, invertir diverses vegades i deixar reposar durant 15 minuts a t^a ambient.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durant 10 min a 4°C i descartar el sobrenadant. El pellet del fag podria no ser visible.
4. Tornar a centrifugar breument i eliminar qualsevol resta de sobrenadant amb una pipeta i amb molt de compte.
5. Resuspendre el sediment vigorosament en 100 µl de Buffer iodur (10 mM Tris-HCl pH 8'00, 1 mM EDTA i 4 M NaI). Afegir 250 µl d'etanol i incubar 15 min a t^a ambient.
6. Centrifugar a 14.000 rpm durant 10 min a 4°C i descartar el sobrenadant. Llavar el precipitat amb 0'5 ml d'etanol al 70% (emmagatzemat a -20°C), tornar a centrifugar, descartar el sobrenadant i assecar breument el pellet al buit (20 min a 45°C).

7. Resuspendre el precipitat en 30 µl de tampó TE i guardar a -20°C.
8. Quantificar el producte per electroforesi en gel d'agarosa a l'1% i seqüenciar.

3.10.5. Seqüenciació de l'ADN del fag i anàlisi de les seqüències

La PCR per a la seqüenciació de l'ADN dels diferents clons del fag obtinguts es va dur a terme utilitzant el kit *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems) i el primer 96 gIII (proporcionat pel kit del “*Phage Display*”), seguint les condicions de la taula 13.

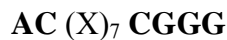
96 gIII 5'-^HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'

Per a la purificació de la PCR es va utilitzar el kit *Performa DTR Gel Filtration Cartridges* (EdgeBio), per a lo qual es van centrifugar les columnes necessàries a 750 x g durant 2 min i es van transferir als tubs d'1'5 ml proporcionats pel propi kit. A continuació, es va afegir la mostra a la columna, es va centrifugar 2 min igual que abans i aquest eluït és el que es va utilitzar per a la seqüenciació, la qual es va dur a terme en un seqüenciador ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Taula 13. Quantitats de reactius i condicions necessàries per a la reacció de PCR de marcatge de la BigDye.

PCR BigDye		
ADN_{fag}	2-4 µl	Cicle inicial a 96°C 1 min.
Tampó 5X	1'5 µl	36 cicles de:
Primer 96 gIII 100 pM	1'6 µl	Desnaturalització a 96°C 10s
BigDye (AB)	1 µl	Hibridació a 55°C 5s
H₂O DEPC	3'9-1'9 µl	Extensió a 60°C 4 min.
		Cicle final a 4°C
TOTAL	10 µl	

Els electroferogrames que s'obtingueren per a cada clon del fag es van analitzar amb el programa d'Applied Biosystems del propi seqüenciador i foren corregits manualment. Per a la traducció de les seqüències es va utilitzar el programa Expsy (<http://web.expasy.org/translate/>) i es va estudiar la seqüència insertada. Es consideraren seqüències vàlides aquelles que complien el següent esquema:



Una vegada obtingudes les seqüències vàlides de 7 aa es van introduir en el programa Pepitope per a la definició dels epítops conformacionals. Aquest programa implementa tres algorismes per al mapeig d'epítops: PepSurf, Mapitope i una combinació dels dos.

L'algoritme PepSurf (Mayrose et al., 2007) mapeja cadascun dels pèptids seleccionats per afinitat sobre la superfície de l'antigen,

buscant virtualment de forma eficient totes les possibles trajectòries 3D (és a dir, una seqüència veïna de residus sobre la superfície de l'estructura de l'antigen) que presenten una alta similitud amb les seqüències dels pèptids seleccionats. De manera que el resultat d'aliniacions més significatiu s'agrupa i es dedueix la ubicació de l'epítop. Per contra, l'algoritme Mapitope (Bublil et al., 2007) està basat en una aproximació computacional alternativa que detecta els determinants d'epítops compartits per tot el conjunt de pèptids.

Per tant, els requisits mínims per a poder utilitzar aquest programa són les seqüències del pèptid afins seleccionats en format FASTA i l'identificador en el PDB (“*Protein Data Bank*”) de l'antigen, obtenint-se una projecció de o dels epítops en l'estructura 3D de l'antigen en qüestió.

3.10.6. Programes de modelatge de proteïnes

El paquet de software YASARA (“*Yet Another Scientific Artificial Reality Application*”), desenvolupat des de 1993, és un programa de gràfics moleculars, modelatge i simulació útil per a manipular estructures proteïques (<http://yasara.com/>). La versió sencera no és d'accés lliure, però els autors creen una versió “*cut-down*” anomenada [YASARA View](#) que està disponible en la web de forma gratuïta.

Aquest programa de modelatge es va utilitzar tant per a ubicar l'epítop reconegut per l'AcMo 3C3G3 en l'estructura cristal·logràfica de la variant GII.4-VA387 de NoV, com per a estudiar la variació

aminoacídica en el subdomini P2 de la proteïna VP1 de NoV de diferents variants. L'estructura cristal·logràfica d'aquesta variant VA387 està identificada en el PDB amb la ID 2OBR (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2obr>) (Cao et al., 2007).

3.11. ANÀLISI ESTADÍSTIC

La comparació de la prevalença d'anticossos anti-NoV obtinguts en els diferents grups d'edat analitzats, en l'estudi de seroprevalença, es van dur a terme mitjançant la prova de chi-quadrat de Pearson. En canvi, el coeficient de correlació (r) es va utilitzar per a comparar els títols mitjans geomètrics d'anticossos davant tant les VLPs com el domini P de NoV en 30 mostres de sèrums representatives. Una $P < 0,05$ es va considerar estadísticaemnt significativa. Tots els anàlisis es realitzaren amb el software SPSS (Lead Technologies, Inc.).

Per contra, el nombre d'individus implicats en el brot de GEA era molt xicotet i no es va considerar realitzar un anàlisi estadístic dels resultats obtinguts en aquest estudi.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

RESULTATS I:

Estudi i caracterització d'AcMo front a NoV humans

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. ESTUDI DE L'ANTIGENICITAT DE LA PROTEÏNA DE LA CÀPSIDE VP1 DE NOROVIRUS HUMANS AMB ANTICOSSOS MONOCLONALS

L'estudi dels NoVs humans, com s'ha anat comentat al llarg d'aquesta tesi, no està exempt de dificultats, ja que fins al moment no s'ha aconseguit la seva replicació en cultius cel·lulars i el model animal que existeix és molt recent (Taube et al., 2013). Però en els últims anys s'han intensificat els estudis epidemiològics a nivell molecular d'aquests virus, que han confirmat la importància d'aquestes infeccions i la transcendència de la seva diversitat genètica. De manera que l'única opció que ens queda per a poder estudiar els NoVs a tots els nivells és mitjançant la producció tant de VLPs com de partícules P.

En aquest treball es va plantejar la producció de VLPs i també de partícules P de GII.4, ja que és el genotip predominant a nivell mundial (~80%) des de pràcticament l'any 1996. A banda, també ens proposarem la clonació i producció del genotip Norwalk (GI.1) per estudiar i comparar els diferents comportaments d'ambdós genogrups. Les VLPs de GII.4 també s'utilitzaren per a obtindre anticossos monoclonals (AcMo) i així poder caracteritzar la seua reactivitat i analitzar els epítops reconeguts per tal d'elucidar possibles epítops bloquejants.

4.1.1. Producció i amplificació de baculovirus recombinants que expressen la proteïna VP1 de la càpside de NoV

Les cèl·lules Sf9 infectades amb el baculovirus recombinant, expressant el gen ORF2 que codifica la proteïna de la càpside VP1 de NoV GII.4-2006b o GI.1 segons el cas, a una m.o.i de 0'1, es mantingueren 3 dies en cultiu i al tercer dia es va recollir el sobrenadant que és on es troben les partícules virals infeccioses. Per a determinar el títol viral dels mateixos es realitzava una IFI, on es podia apreciar una fluorescència ben definida per tot el contorn de la membrana cel·lular (Fig. 4.1). Aquests oscil·laven entre 10^7 - 10^8 uff/ml.

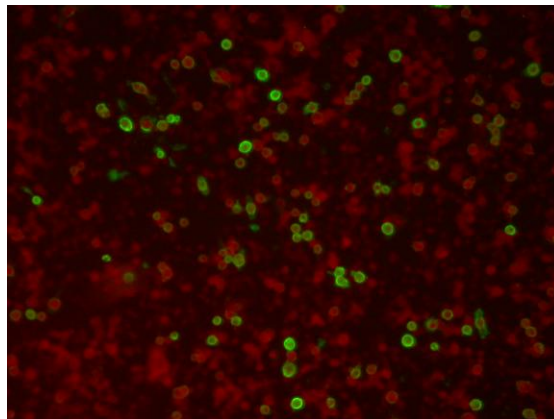


Figura 4.1. Assaig d'immunofluorescència indirecta en cèl·lules Sf9 per a comprovar l'expressió dels baculovirus recombinants. Es va utilitzar un anticòs anti-gp64 de baculovirus (proteïna que està present en la membrana d'aquests virus) seguit de la detecció amb un anticòs anti-IgG de ratolí conjugat amb FITC a una dilució 1/4.000.

4.1.2. Producció i purificació de VLPs i partícules P de NoV

a) VLPs

Per a les dues construccions de baculovirus utilitzades (GII.4-2006b i GI.1) les VLPs es van detectar als 6 dies post-infecció, tant en el lisat cel·lular com en el sobrenadant, mitjançant assaigs d'immunofluorescència, WB o ME.

La purificació es va dur a terme a través d'un matalàs de sacarosa al 40% i l'anàlisi del pellet resuspès en PBS-NaCl, mitjançant WB, va donar com a resultat una banda majoritària d'un tamany aproximat de 58 kDa (Fig. 4.2A), corresponent a la proteïna VP1 de la càpside de NoV. També es podien apreciar unes bandes més xicotetes d'intensitat similar que corresponien a productes de degradació o proteïnes productes d'un tall de la proteïna de 58 kDa (34 kDa).

Les imatges de microscòpia electrònica obtingudes confirmaren la morfologia icosaèdrica esperada i característica dels NoV (Fig. 4.2B), afirmant que l'estructura de les VLPs produïdes i purificades era l'adequada.

Per últim, mitjançant els assaigs d'immunofluorescència, es va poder confirmar que les VLPs obtingudes presentaven les mateixes propietats antigèniques que el virus natiu, ja que van ser reconegudes pel sèrum anti-NoV utilitzat proporcionant uns patrons de fluorescència ben definida a través de tota la superfície cel·lular (Fig. 4.2C).

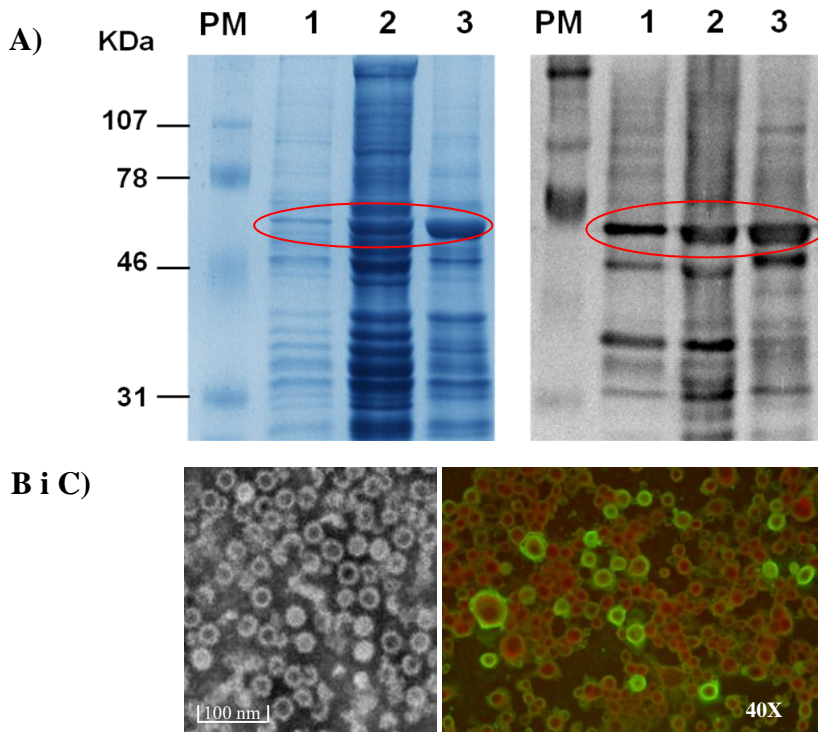


Figura 4.2. Anàlisi de l'expressió de la proteïna de la càpsida de NoV GII.4.
 A) Gel SDS-PAGE amb tinció blau de Coomassie (esquerra) i Western blot utilitzant un sèrum hiperimmune anti-NoV de conill (dreta). 1: sobrenadant de cultiu de cèl·lules Sf9 infectades amb baculovirus recombinant; 2: lisat de cèl·lules Sf9 infectades amb baculovirus recombinant i 3: VLPs semi-purificades a través d'un matalàs de sacarosa al 40%. Les bandes corresponents al tamany esperat de les VLPs (~58 kDa) estan redondejades amb un òval vermell. B) Imatge per microscòpia electrònica de les VLPs de norovirus després de la purificació a través del matalàs de sacarosa i tinció negativa amb àcid fosfotúngstic. C) Reconeixement de la proteïna VP1 de la càpsida de NoV expressada per baculovirus recombinant en cèl·lules Sf9 mitjançant immunofluorescència indirecta amb el sèrum anti-NoV de conill a una dilució 1/200.

b) Partícules P

En aquest treball totes les partícules P de NoV s'han expressat amb coles d'histidina (6x His) en l'extrem N- terminal, i així facilitar

la seua purificació utilitzant cromatografia d'afinitat. Els cromatogrames que es van obtindre per a les variants P-GI.1 i P-GII.4-VA387 es mostren en la figura 4.3. En tots els casos, per a l'elució es va utilitzar una concentració d'imidazol de 2M (excepte per al domini P-GII.4-2007 que es va utilitzar un gradient de concentració) i es podia apreciar un pic ben definit després de l'addició de l'imidazol que variava entre 250 i 600 mAu, segons la variant de partícula P que s'estava purificant. En termes de concentració, es traduïa en 1-2 mg de proteïna per a cada variant.

Una vegada purificades, les fraccions recollides es carregaven en un gel de poliacrilamida al 15% i s'analitzaven per a vore el grau de purificació de forma semiquantitativa (Fig. 4.4). Pràcticament en tots els casos s'observava una sola banda grossa corresponent a la partícula P i altres bandes més fines corresponents a possibles dímers.

La formació de les estructures moleculars pels dominis P de les variants GI.1, GII.4-VA387, GII.4-2007 i GII.9 purificades per FPLC també es van analitzar mitjançant microscòpia electrònica. Com es mostra en la figura 4.4, les partícules P revelaren una estructura en forma d'anell o de pentàgon de menys de 10 nm en tots els genotips, fet que era compatible amb la formació de partícules P. Aquestes partícules eren esfèriques amb un buit en l'interior. També s'apreciaven altres estructures que no mostraven aquesta morfologia, que serien compatibles amb la formació de dímers, majoritàriament per a la variant P-GII.4-2007 ja que no incloïa els residus de cisteïna que estabilitzen la formació de la partícula com a tal.

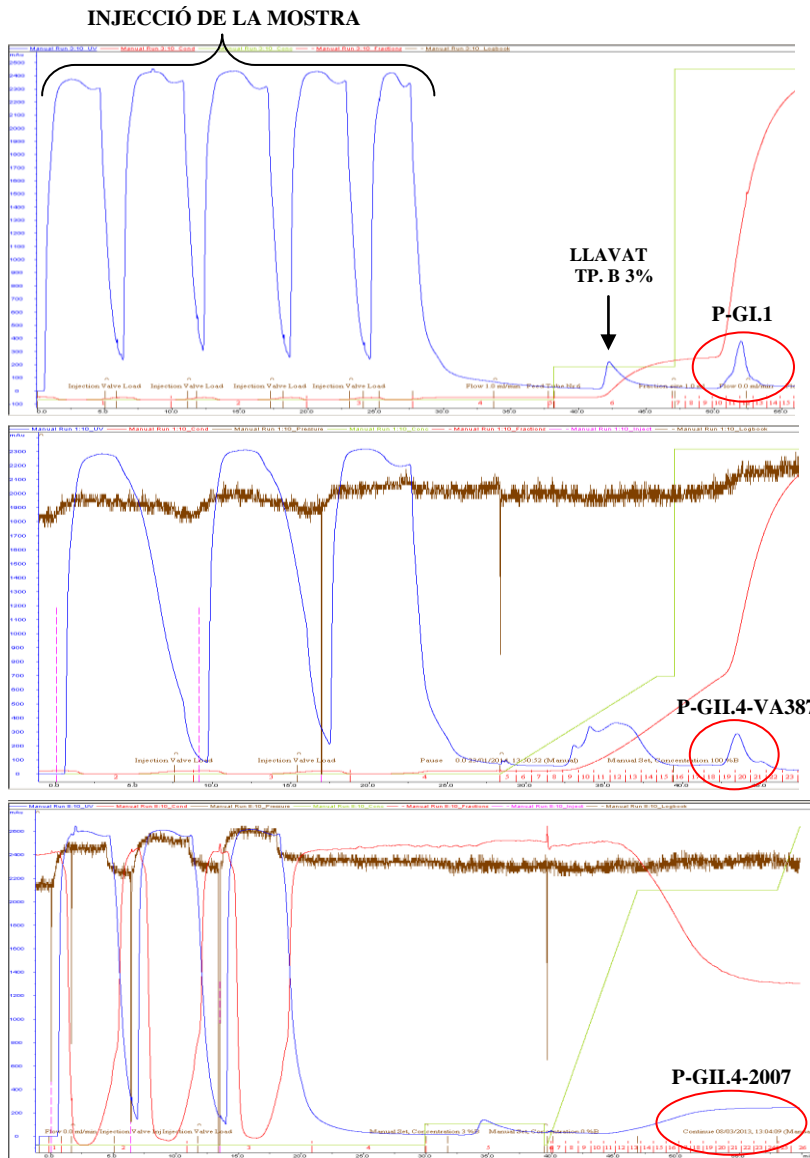


Figura 4.3. Cromatogrames de purificació de diferents partícules P en columnes de Ni-NTA, utilitzant l'equip de FPLC Äkta Prime. Els pics d'elució corresponents a les diferents partícules P estan redondejats amb un òval roig, així com els llavats amb tampó B (PBS amb 3% d'imidazol) indicats amb una fletxa i les injeccions del lisat cru (mostra) amb un claudàtor.

Per a assajar si aquests dominis, contingent l'etiqueta N-terminal, mantien les seues propietats biològiques i antigèniques, es va avaluar la seua capacitat per a ser reconegudes pels diferents anticossos dels que es disposava (AcMo i sèrum de conill) (apartat 4.1.4) i per mostres de diferents sèrums humans (resultats no mostrats).

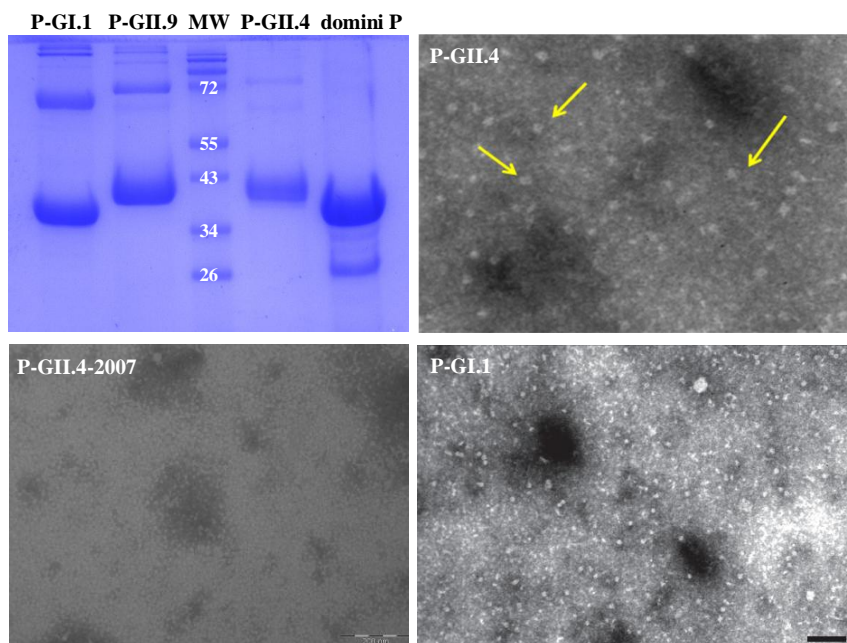


Figura 4.4. Anàlisi de les partícules P purificades mitjançant electroforesi SDS-PAGE i microscòpia electrònica. Els eluïts corresponents al pic d'elució de cada partícula P s'ajuntaren en una sola alíquota i es corregeren en un gel de poliacrilamida i posterior tinció amb blau de Coomassie (esquerra). Microfotografies amb tinció negativa de les variants P-GII.4-VA387, P-GII.4-2007 i P-GI.1. Les fletxes indiquen la típica estructura en forma d'anell.

4.1.3. Producció d'AcMo i d'un antisèrum front a VLPs de NoV

Els AcMo av0 i av2 es van obtenir al HPA de Colindale (Londres), utilitzant les variants GII.4-1999 i GII.4-2004, respectivament, tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.3 de *Material i Mètodes*. L'antisèrum, com ja s'ha comentat anteriorment, es va obtenir inoculant conills amb una barreja de VLPs GII.4-v0, GII.4-v2 i GII.3, també al HPA. Aquests anticossos foren cedits degut a una sèrie de col·laboracions que s'establiren entre el nostre grup d'investigació i el grup de la Dra. Miren Iturriza-Gómara (HPA, Colindale - University of Liverpool)

Per a l'obtenció de l'AcMo anti-2006b, es van inocular 3 ratolins femella Balb/c amb 20 µg/ml d'una dissolució de VLPs de la variant GII.4-2006b amb PBS, intraperitonealment. Mitjançant el format ELISA es va analitzar si havia tingut lloc una resposta immunitària específica d'anticossos front a NoV. A la figura 4.5a, es poden observar els nivells d'anticossos pre- i post-inoculació, observant-se un augment superior a 200 vegades en la reactivitat del sèrum immune davant les VLPs. Una vegada confirmada la resposta d'anticossos específics per a NoV es va procedir al sacrifici dels ratolins i a la producció dels hibridomes. Es van obtenir molts hibridomes, però de tots els produïts es va elegir el clon 3C3G3, ja que és el que presentava tant una reactivitat com una especificitat major (Fig. 4.5b).

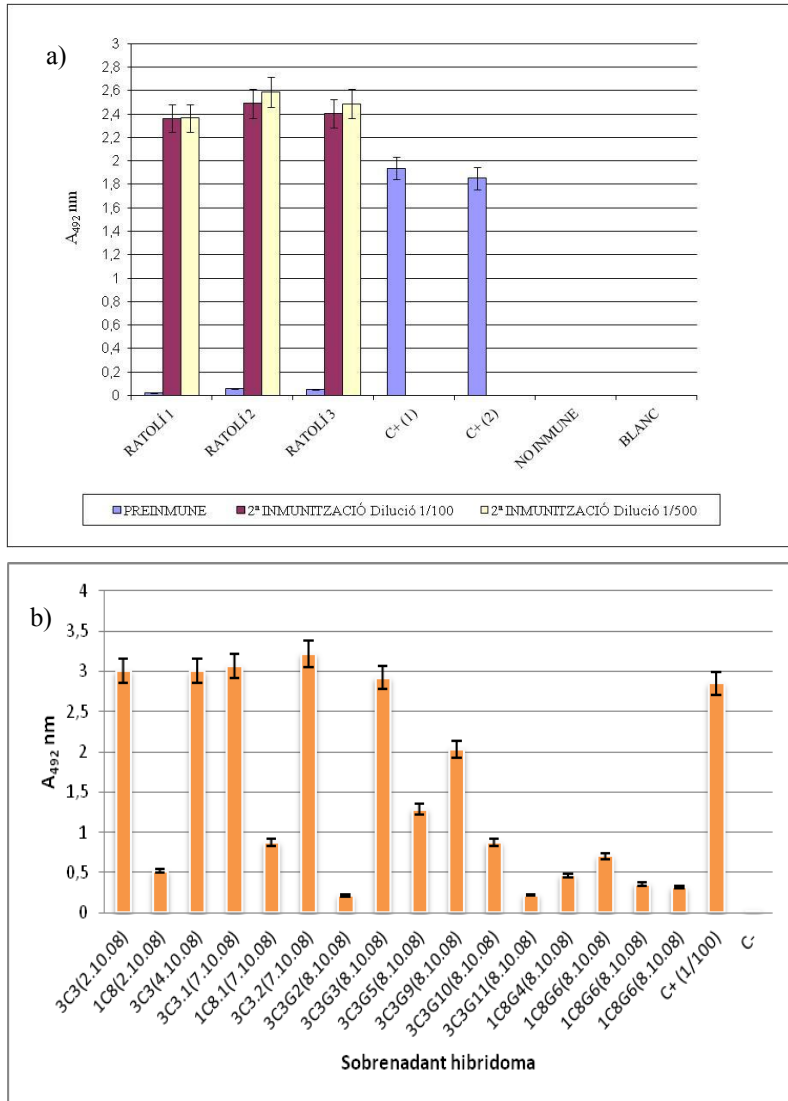


Figura 4.5. a) Assaig d'ELISA per a determinar la resposta immunitària després de les immunitzacions. La placa es va sensibilitzar amb VLPs a 10 µg/ml i es van analitzar els sèrums preimmunes i sèrums després de la 2ª immunització (dilucions 1/100 i 1/500) per comprovar si havien desenvolupat anticossos anti-NoV específics. **b) Anàlisi de diferents sobrenadants d'hibridomes mitjançant ELISA.** Es va analitzar la reactivitat davant les VLPs de GII.4 de diferents sobrenadants d'hibridomes per tal d'assegurar-se que estaven produint l'anticòs d'interès.

4.1.4. Caracterització dels AcMo i de l'antisèrum per ELISA i WB

Els AcMo, així com l'antisèrum, presentaren diferents patrons de reconeixement davant les VLPs i les partícules P analitzades.

Mitjançant assaigs d'ELISA, es va observar que l'antisèrum de conill del HPA reconeixia totes les variants de VLPs i partícules P amb l'excepció dels derivats de la variant de GI.1. L'AcMo av0 va reconèixer la seva VLP homòloga (GII.4-v0), així com la partícula P-GII.4-VA387. L'AcMo 3C3G3 va reconèixer també tant la seva variant de VLP homòloga com el domini P-GII.4-2007, i l'AcMo av2 va reconèixer tant la homòloga (GII.4-v2) com la variant GII.4-2006b. La partícula P-GI.1 no va ser reconeguda per cap dels anticossos analitzats (Fig. 4.6).

Per tal de trobar una possible explicació es va realitzar un estudi d'alineació de les seqüències aminoacídiques. Es va obtenir com a resultat que les seqüències múltiples d'alineació del subdomini P2 entre les diferents variants de GII.4 van mostrar un 80 - 98% d'identitat i un 85 - 96% de similitud (identitat + substitucions favorables), en comparació amb la variant GII.4-VA387 que es va utilitzar com la variant de referència (Fig. 4.7). Aquests anàlisis de la seqüència de la proteïna van predir diversos canvis dins o prop dels llocs antigènics descrits. En la variant GII.4-v0, sols es va observar una substitució aminoacídica (I300T) respecte a la variant de referència (97,88% d'identitat) prop del lloc A. En la resta de les variants s'apreciaren moltes més substitucions, algunes dins i altres

prop dels diferents epítops descrits (~81% d'identitat). Entre les variants GII.4-v2 i GII.4-2006b es van observar les següents substitucions: 2 substitucions (T296S, T298N) en el lloc A, 2 (P294T, R300I) prop del mateix lloc, R340G prop del lloc 1, T389I prop del lloc 2 i A395T en el lloc B. El lloc A i el lloc 1 eren exactament iguals entre les variants GII.4-2006b i P-GII.4-2007, i s'observaren només 4 substitucions: A294T (prop del lloc A), G340A (prop del lloc 1), S393N i T395A (lloc B).

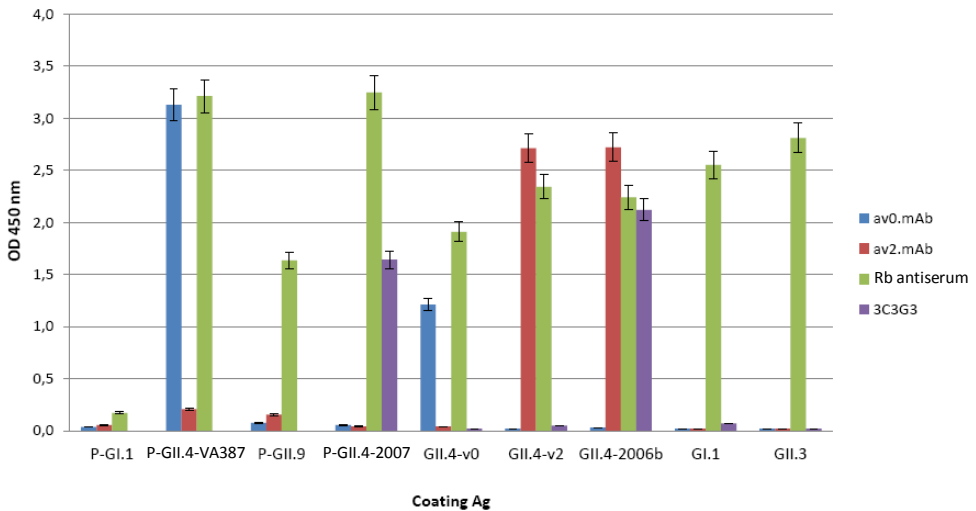


Figura 4.6. Caracterització dels patrons de reconeixement dels anticossos anti-NoV, tant dels AcMo com de l'antisèrum de conill, per ELISA. Les plaques de microtitulació es van sensibilitzar amb VLPs o partícules P, es van incubar primer amb l'AcMo o l'antisèrum del HPA i després la unió es va detectar mitjançant la incubació amb un anticòs anti-IgG de ratolí / conill conjugat amb HRP. La detecció de la reacció es va mesurar pel mètode colorimètric. Les barres d'error indiquen intervals de confiança del 95%.



Figura 4.7. Alineació de les seqüències d'aminoàcids de les diferents variants de VLPs i partícules P de GII.4. Les seqüències d'aminoàcids de les VLPs corresponents al subdomini P2 (blau) es van alinear amb la partícula P de la variant VA387, que es va utilitzar com a soca de referència, per comparar la seva homologia amb les altres variants. Els diferents quadres de colors indiquen els diferents epítops descrits anteriorment: lloc o epítop A (caixa vermella), lloc B o epítop D (blau), lloc 1 (verd) i el lloc 2 (morat) (Zakikhany et al., 2012). Les substitucions d'aminoàcids més importants estan marcats sota de cada columna amb asteriscs.

L'AcMo 3C3G3 també es va caracteritzar per WB. Es va analitzar la seua reactivitat front a les variants de VLPs GII.4-v0, GII.4-v2 i GII.4-2006b i front al domini P-GII.4-2007, ja que a la resta de variants de partícules P no les va reconèixer en el format d'ELISA. Tots els antígens es van utilitzar a la mateixa concentració per així poder comparar els resultats (1 µg/carrera). A la figura 4.8 es pot observar com l'AcMo va reconèixer tant les diferents variants de VLPs utilitzades com el dímer P.

La intensitat de les bandes per al cas de les VLPs va ser més o menys la mateixa, en canvi, la intensitat de la banda corresponent a la P-GII.4-2007 va ser molt més forta i es podien apreciar més bandes de diferents tamanys, que correspondrien al monòmer P i a possibles productes de degradació. A més, la banda que corresponia a les VLPs de la variant GII.4-2006b, apareixia desdoblada en dos.

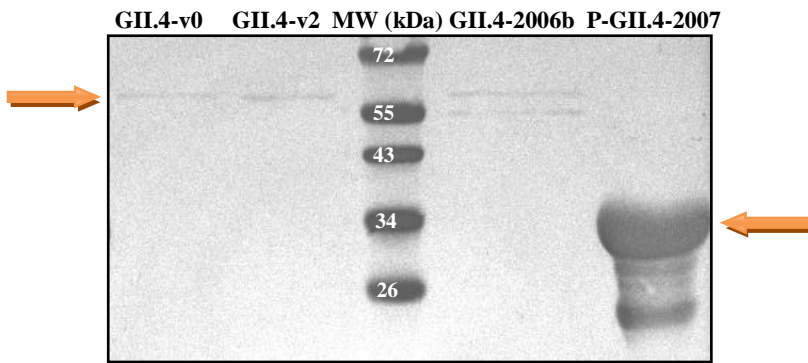


Figura 4.8. Caracterització de l'AcMo 3C3G3 mitjançant Western blot. Les diferents variants de VLPs es van correr en un gel de poliacrilamida al 10% i es van transferir a una membrana de PVDF. Després es va afegir l'AcMo 3C3G3 a una dilució 1/200 i la unió es va detectar amb un anticòs anti-IgG de ratolí conjugat amb HRP a una dilució 1/5.000. Finalment, la reacció es va revelar mitjançant el mètode colorimètric.

4.1.5. Determinació de l'epítot reconegut per l'AcMo 3C3G3 mitjançant “*phage display*”

La llibreria comercial de pèptids aleatoris que s'expressen en la superfície del bacteriòfag M13 (Ph.D.-7; New England Biolabs) es va utilitzar per a identificar l'epítot reconegut per l'AcMo 3C3G3 anti-NoV GII.4-2006b. Aquesta llibreria consta d'heptapèptids lineals aleatoris fusionats en l'extrem N-terminal de la proteïna minoritària de la càpside pIII.

Es dugueren a terme 3 rondes de selecció, on cada ronda de “*panning*” implicava els passos d’unió del fag a la placa sensibilitzada amb l’AcMo a una concentració de 100 µg/ml, l’eliminació d’aquells fags units amb una afinitat baixa mitjançant llavats amb TBS-T 0,1% i l’elució dels fags per una disminució dràstica del pH. Les suspensions de fag utilitzades estaven entorn al 10^9 - 10^{11} pfu/ml i després de cada ronda de selecció el nombre de fags eluïts es determinava per plaqueig. Després d’aquestes 3 rondes es van seleccionar un total de 14 clons de fags i es van analitzar per seqüenciació d’ADN. Les seqüències d’ADN obtingudes es van analitzar amb el programa proporcionat per Applied Biosystems versió 5.1.1 i traduïdes amb el programa Expasy tools.

D’aquests **14 clons**, sols es pogueren obtindre 5 seqüències vàlides i diferents de 7 pèptids (Taula 14) que, mitjançant el programa Pepitope, proporcionaren una **seqüència aminoacídica** consens de 11 aminoàcids utilitzant la seqüència del domini P de la variant **GII.4-VA387** com a patró (Fig. 4.9), la qual té una similitud amb la variant GII.4-2006b del 85’21%.

Taula 14. Resum dels pèptids aïllats reconeguts per l’AcMo 3C3G3.

CLON	SEQÜÈNCIA
3	THLPGKH
5	FNNNRQP
6	SNRTNTT
7	SKILAGT
10	NAGSYQM

L'epítop proporcionat pel programa Pepitope utilitzat va ser el següent, ja que dels 3 que proporcionava era el que presentava un "score" major (15'5):

**Pro245.Glu247.Ile389.Gln390.Gln396.Arg434.Gly442.Tyr443.
Pro444.Asn445.Asn447**

Aquest epítop està format per seqüències d'aminoàcids lineals i altres conformacionals. Dels 11 aminoàcids que formen la seqüència consens 3 es troben prop dels epítops B o D i del lloc 2 (I389, G390 i G396) i la P444 es troba ubicada dins del epítop conegut com a lloc 1 (Fig. 4.9).

A banda, també es realitzaren assaigs d'ELISA per a comprovar que, efectivament, l'AcMo reconeixia els pèptids que havia seleccionat (resultats no mostrats).

4.1.6. Evolució i anàlisi de la variació aminoacídica en el subdomini P2 de la proteïna VP1 de NoV de diferents variants

Per tal de comprendre un poc més l'impacte de les substitucions observades, principalment, en els llocs antigènics descrits prèviament, les seqüències de 5 variants de NoV GII.4 (1999, 2004, 2006b, 2010 i 2012), representants de les últimes epidèmies provocades per aquest agent viral, es van alinear i es van estudiar els seus models d'homologia utilitzant com a plantilla l'estructura cristal·lina del domini P de la variant VA387 de GII.4 (Cao et al., 2007).

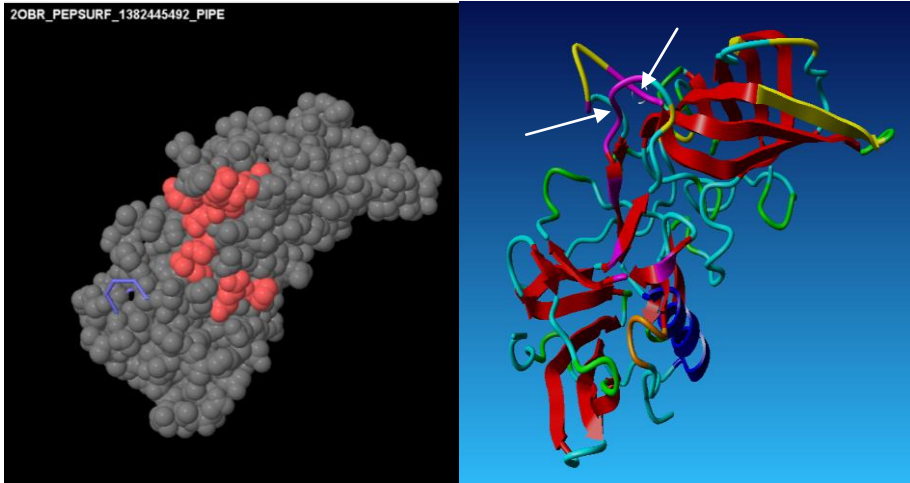


Figura 4.9. Model del domini P de la proteïna VP1 de norovirus on es mostren els residus aminoacídics reconeguts pel monoclonal 3C3G3 anti-NoV GIL4-2006b, identificats mitjançant la tècnica de “phage display”. La localització de l’epítoc conformacional en l’estructura cristal·lina de la proteïna VP1 de la variant VA387 (Cao et al., 2007), que s’ha utilitzat com a patró, s’ha obtés mitjançant el programa Yasara <http://www.yasara.org> (dreta) i el programa Pepitope <http://pepitope.tau.ac.il/> (esquerra). Aquest epítoc està format per 11 aminoàcids situats en el subdomini P2, remarcats en roig en la figura de l’esquerre i en fucsia en la de la dreta. En aquesta última figura també estan senyalats els epítocs descrits en la literatura en color groc. Els aminoàcids Gln390 (*site 2*) i Pro444 (*site 1*) que formen part de l’epítoc reconegut per l’AcMo 3C3G3 i coincideixen amb els epítocs descrits, segueixen de color fucsia i estan senyalats amb una fletxa de color blanc.

A la següent taula (Taula 15) es poden observar les diferents substitucions aminoacídiques que han tingut lloc al llarg del temps, en les diferents variants epidèmiques marcades amb diferents colors, en els llocs antigènics descrits.

Taula 15. Resum de la variació dels aminoàcids en els epítops A, D i E en el període comprès entre 1999 i 2012.

VLPs	Epítope A						Epítope D			Epítope E		
	294	296	297	298	368	372	393	394	395	407	412	413
VA387	A	S	H	D	T	N	N	-	N	N	T	G
GII.4-1999	A	S	H	D	T	N	N	-	N	N	T	G
GII.4-2004	P	T	R	T	A	D	S	T	A	D	N	I
GII.4-2006b	A	S	R	N	S	E	S	T	T	S	N	V
GII.4-2010	S	S	R	N	A	D	S	T	T	S	N	T
GII.4-2012	T	S	R	N	E	D	S	T	T	S	N	T

Totes les seqüències analitzades comparteixen un alt grau de similitud, encara que les variants VA387 i 1999 en aquests llocs concretament són exactament iguals. Aquestes dues variants són contemporànies i ambdues manquen de la inserció en la posició 393. En la variant 2004 té lloc un canvi radical, ja que tots els aminoàcids que formen aquests epítops han sigut substituïts per altres diferents. En la resta de variants, com es pot apreciar, alguns aminoàcids es mantenen i altres sofreixen canvis.

A banda, utilitzant el programa YASARA de “*protein modelling*”, es van analitzar els canvis aminoacídics en l’estructura cristal·lina de la variant VA387, obtinguent-se uns models de l’evolució temporal de les regions descrites com a possibles epítops determinants (Fig. 4.10).

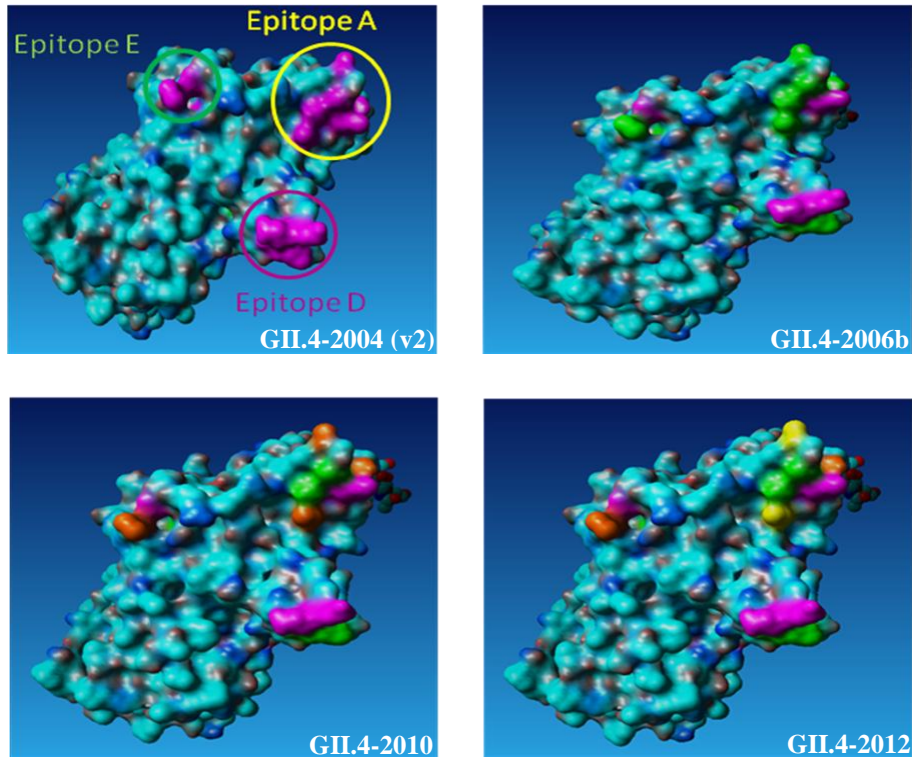


Figura 4.10. Estructura cristal·lina del domini P de la variant GII.4-VA387 de norovirus i l'evolució temporal de les substitucions aminoacídiques en les diferents variants emergents. La localització dels diferents epítops descrits estan marcats amb cercles de diferents colors: epítop E format pels residus 294, 296-298, 368 i 372 (verd), epítop A format pels residus 393-395 (groc) i epítop D pels residus 407, 412-413 (malva). Els canvis aminoacídics de les diferents variants es mostren per codi de colors: verd per als canvis produïts en la variant GII.4-2006b, taronja per a la GII.4-2010 (GII.4-New Orleans_2009) i groc per a la GII.4-2012.

DISCUSSIÓ

En el present treball s'han utilitzat baculovirus recombinants per a la producció de VLPs de NoV i bacteries *E. coli* per a la producció de les partícules P. Ambdues partícules proteïques s'han produït amb la finalitat d'obtenir diferents AcMo i antisèrums i així poder estudiar els llocs implicats en la unió d'anticossos, així com els epítops implicats en la unió virus-hoste. Aquests tipus d'estudis s'han vist dificultats per la manca d'un sistema de cultiu cel·lular o un model animal eficients, de manera que estudis del mapeig d'epítops no s'han pogut dur a terme utilitzant el propi virus infecciosos. En canvi, en els últims anys, s'ha avançat en l'intent d'aconseguir un cultiu eficient que proporcione antigen viral (Takanashi et al., 2014; Straub et al.; 2007; 2011; 2013) així com un model murí (Taube et al., 2013), que es podria dir que és en el camp on més s'ha avançat, on es puga estudiar el comportament del virus a tots els nivells: infecció, replicació, interacció virus-hoste, etc.

El genotip estudiat, GII.4, actualment és el més interessant, ja que els virus pertanyents a aquest genotip han estat predominant durant l'última dècada tant als Estats Units com a Europa i Oceania, provocant el 70-80% de tots els brots causats per NoV (Siebenga et al., 2009; Desai et al., 2012).

La producció de la proteïna de la càpside de NoV en cèl·lules d'insecte va donar com a resultat la formació de VLPs, les quals eren morfològicament similars als virus nadius. L'observació d'aquestes

VLPs purificades a través d'un matalàs de sacarosa al 40%, en el cas de la variant GII.4- 2006b, o a través d'un gradient de sacarosa per a les variants GII.4-v0 i GII.4-v2, sota el microscopi electrònic de transmissió, va revelar la presència de càpsides amb un diàmetre mitjà de 40 nm i estructures en forma d'espícules en la seua superfície. A banda, les seues propietats antigèniques també es comprovaren mitjançant les tècniques de WB, ELISA i IFI.

Pel que fa a la producció de les partícules P, es va seguir la mateixa línia per tal de comprovar la integritat d'aquestes tant estructural com funcionalment. Segons el tamany obtingut ens els anàlisis de SDS-PAGE i l'estructura en les observacions al microscopi electrònic, efectivament es tractava de partícules P, o aquelles de tamany menor, de dímers P. A més, es clonaren amb la seqüència rica en Cys en C-terminal, sense el “*hinge*”, a excepció del domini P-GII.4-2007, per a promoure la formació i augmentar l'estabilitat de les partícules. Per altra part, a banda de comprovar la seua capacitat per a ser reconegudes per diferents anticossos, tant per AcMo com pel sèrum de conill anti-NoV o sèrums de pacients convalsents per infeccions per NoV en format ELISA, la seua funcionalitat també es va comprovar per experiments de ressonància plasmònica de superfície (SPR de l'anglès “*surface plasmon resonance*”) (Rubio-del-Campo et al., 2014).

Les VLPs semi-purificades de la variant GII.4-2006b s'utilitzaren per a immunitzar ratolins Balb/c i obtindre AcMo anti-NoV. D'aquesta immunització es va obtindre l'AcMo 3C3G3 que és

el que es va utilitzar al llarg de tot l'estudi. A banda, en el HPA, es van immunitzar ratolins amb les seues variants GII.4-v0 i GII.4-v2 de VLPs i també obtingueren els corresponents AcMo av0 i av2. Aquests dos AcMo juntament amb el sèrum de conill també s'utilitzaren en l'estudi, fruit d'una col·laboració amb la Dra. Miren Iturriza-Gómara.

La caracterització dels diferents anticossos es va dur a terme mitjançant assaigs d'ELISA davant totes les VLPs i partícules P de les que es disposava. Els resultats obtinguts mostren que les partícules P són antigènicament comparables a les VLPs completes, i que l'AcMo produït específicament contra la variant GII.4-v0 reconeixia la partícula P homòloga (98% de similitud entre les de seqüències proteiques de les dues soques). Les seqüències proteiques de les diferents variants GII.4 de NoV es van alinear utilitzant el programa Clustal X. Com era d'esperar, la comparació de la seqüència corresponent al subdomini P2 de VA387, com a soca de referència, amb la resta de soques GII.4 va revelar que, encara que malgrat la similitud de seqüència, hi havien variacions substancials que s'observaren en les regions antigèniques descrites en estudis anteriors. Aquestes variacions podrien explicar les diferents reactivitats observades entre els AcMo anti-NoV utilitzats, donant suport a la hipòtesi que aquests llocs són importants i estan associats amb la variabilitat antigènica de NoV i, per tant, amb la dificultat d'induir una resposta immune de llarga durada. De manera que es pot dir que les partícules P posseeixen epítops específics de variant, a més d'almenys alguns dels epítops reactius entre genotips, com ho

demostra el reconeixement de les partícules P-GII.4 i P-GII.9 per part de l'antisèrum policlonal de conill.

D'altra banda, la capacitat d'aquest mateix antisèrum de reconèixer la variant GI.1 de VLPs no es va veure acompanyada del reconeixement de la partícula P-GI.1 homòloga. Aquest fet demostra, a més, que epítops reactius entre genogrups és probable que es troben al domini S, que reforçaria la recent identificació d'un AcMo que dona reacció creuada entre genogrups, el qual reconeix un epítop lineal putatiu mapejat dins del domini de la coberta interna S (Parra et al., 2013). No obstant això, després d'haver demostrat que els epítops específics de variant resideixen dins de la regió expressada en partícules P i dominis P2, com anteriorment s'ha suggerit a través de models *in silico* (Zakikhany et al., 2012), la recerca dels residus exactes que constitueixen aquests epítops és ara possible a través de l'enginyeria de les partícules P. Aquestes partícules, es produeixen i es manipulen amb facilitat en contrast amb les VLPs que són estructuralment més complexes i presenten molts reptes com a molècules eficaces per a un mapeig detallat dels possibles epítops.

L'AcMo 3C3G3 també es va caracteritzar per WB i, en aquest cas, sí que es va observar un reconeixement molt dèbil de les variants GII.4-v0 i GII.4-v2 que no s'havia observat en els assaigs d'ELISA. En aquest Western blot el desdoblament de la banda corresponent a la variant GII.4-2006b observat, podria ser degut a la presència de la forma completa de la VLP d'uns 58 kDa i a la forma d'un dels seus productes truncat per la part N-terminal amb un pes molecular

d'aproximadament 56 kDa. Aquest doble patró de les VLPs recombinants de NoV també s'ha observat en altres estudis, inclús en anàlisis de SDS-PAGE (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Jiang et al., 1992; Tan et al., 2004b).

La tècnica de “phage display” es va utilitzar amb èxit per a seleccionar l'epítop reconegut específicament per l'AcMo 3C3G3. Els pèptids de la llibreria utilitzats no tenien necessàriament l'homologia de seqüència amb l'antigen en qüestió, però tenien la suficient homologia conformacional per a induir una afinitat relativament alta de la unió de l'AcMo a aquests. L'epítop proporcionat per aquesta tècnica s'ha projectat sobre l'estructura cristal·logràfica de la variant GII.4-VA387, ja que l'estructura corresponent a la variant GII.4-2006b encara no s'ha resolt. Encara que aquestes dues variants presenten una homologia del 85%, existeixen algunes substitucions aminoacídiques, sobretot dins dels epítops descrits en la literatura, que podrien ser importants a l'hora d'obtindre l'epítop que realment estaria reconegut. De totes formes, el “suposat” epítop conté residus que es troben prop d'aquests llocs antigènics coneguts com epítop A, E i D (Siebenga et al., 2007; Lindesmith et al., 2008; Allen et al., 2008; Shanker et al., 2011; Debbink et al., 2012), indicant que es tracta de zones importants antigènica parlant. Per tant, es podria suposar que aquest AcMo serà capaç de bloquejar, sino completament almenys parcialment, la unió de les VLPs als seus receptors. Per exemple, l'epítop A s'ha descrit que és reconegut per sèrums policlonals humans i l'epítop D o lloc B (residus 393-395) és

especialment interessant ja que aquesta regió també podria alterar l'afinitat d'unió als HBGAs (Lindesmith et al., 2008; Debbink et al., 2012; de Rougemont et al., 2011). Aquests dos epítops es troben flanquejant la butxaca d'unió als HBGAs i les dades proporcionades fins la data suportarien la hipòtesi de què els canvis antigènics que es produeixen i proporcionen als NoV l'habilitat d'escapar al sistema immune de l'hoste, podria també conduir a canvis en l'afinitat als HBGAs, alterant els patrons de la població susceptible. Així doncs, en els models d'evolució temporal es pot observar que cada dos anys emergeix una variant nova, coincidint amb noves epidèmies per infeccions produïdes per NoV, que presenta canvis en aquells residus que formen part o es troben prop dels epítops descrits com a epítops bloquejants.

En aquest estudi, sols s'han colorejat els residus que han anat variant amb el temps dins la mateixa estructura cristal·logràfica, però no s'han realitzat els canvis d'aminoàcids propiament dits en el programa utilitzat. De manera que no se sap si afectarien a la forma de la superfície molecular o electrostàtica donant lloc a alteracions de les propietats antigèniques. Però un estudi realitzat per Allen i col. en el 2008 confirmaren que les mutacions, tant en el lloc A com en el B, resulten en canvis conformacionals que, efectivament, alteren les propietats antigèniques dels NoV, distingint-los de les altres variants circulants d'anys anteriors (Allen et al., 2008). Aquests autors postulen que els canvis produïts en aquestes posicions provoquen un canvi substancial en les propietats bioquímiques entre els residus dels

respectius llocs, que serien suficientment prominents per a ocultar o dificultar l'accés del lloc de reconeixement pels anticossos existents, permetent així que el virus pugui escapar a l'immunitat preexistent en l'hoste.

RESULTATS II:

**Diferent capacitat d'unió de les
VLPs i les partícules P**

4.2. LES VLPs I PARTÍCULES P DE NoV HUMANS DIFEREIXEN EN LA SEUA CAPACITAT D'UNIÓ A SALIVA I A CÈL·LULES INTESTINALS CACO-2, PERÒ CONTENEN EPÍTOPS ESPECÍFICS DE VARIANT

L'estudi dels NoV humans es veu obstaculitzat per la manca d'eficàcia en els sistemes de cultiu de cèl·lules *in vitro* o en models *in vivo*. No obstant això, les VLPs, que són com esferes de virus buides, i les partícules P de NoV, que són partícules subvirals compostes només pel domini protuberant (P) de la proteïna de la càpside, són bons substituïts per analitzar la seva antigenicitat i les interaccions virus-receptor.

Tots dos, tant les VLPs com les partícules P, es van utilitzar en el següent estudi per a analitzar el seu comportament d'unió front a diferents tipus de mostres de saliva, mucina gàstrica porcina i cèl·lules Caco-2, i els corresponents assaigs de bloqueig amb anticossos front als HBGAs i amb els AcMo anti-NoV produïts tant al nostre laboratori com al del HPA.

4.2.1. Distribució dels antígens Lewis, estat secretor i grup sanguini ABO entre els voluntaris analitzats.

El tipus d'antigen Lewis, l'estat secretor i el grup sanguini ABO de 22 donants de saliva es van determinar per a estudiar els patrons d'unió de les diferents variants de VLPs de les que disposavem. D'aquestes mostres, 8 corresponien al brot de gastroenteritis espontània en una sola família de 9 membres.

Entre els 22 voluntaris tipificats per ABO, 12 foren de tipus A, 5 de tipus B, 5 de tipus O i cap va ser del tipus AB. Pel que fa a l'estat secretor, de les 22 mostres de saliva 19 (86'4%) van resultar ser secretors, 5 (73'7 %) d'ells eren homozigots (SeSe) i 14 (26'3%) eren heterozigots (Sese), i 3 (13'6 %) eren no secretors (sese). Pel que fa a la tipificació dels antígens Le, 13 (59'1%) voluntaris SeSe presentaren clarament una OD₄₉₂ elevada per al tipus Le^b i Le^y, així com també per al tipus Le^a però amb una OD₄₉₂ molt més baixa, aproximadament la mitad. No obstant això, en individus sese, només es va detectar una OD₄₉₂ elevada per a Le^a i Le^x. A més, es va trobar un individu Lewis negatiu (Le^{a-}Le^{b-}), el qual sols presentaba una senyal intensa per a l'antigen Le^y. De manera que les mostres de saliva es van agrupar en quatre grups de patrons d'antígens Lewis diferents: Le^{a+ b+} / Le^{x- y+} (77'3%), Le^{a+ b+} / Le^{x+ y+} (4'5 %), Le^{a+ b-} / Le^{x+ y-} (13'6%) i Le^{a- b-} / Le^{x- y+} (4'5%).

Per tant, d'acord amb aquests resultats, es consideren individus secretors i Lewis positius si secreten Lewis a, Lewis b i Lewis y en la seva saliva i Lewis negatius sino secreten ni Lewis a ni b, i no secretors Lewis positius els individus que no expressen Le^b ni Le^y, però si Le^a i Le^x (Fig. 4.11 i Taula 16).

Taula 16. Llistat de les 22 mostres de saliva on s'especifica el sexe, l'edat, el tipus de grup sanguini ABO, l'estat secretor en base a l'anàlisi del gen *FUT2* i el fenotip Lewis. Les mostres dels individus implicats en el brot de GEA estan marcats amb un requadre morat.

MOSTRA	SEXE	EDAT	ABO TYPES	FUT2	Lewis histo-blood type
POP	D	63	A	Se+Se+	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
VIV	H	64	A	se-se-	Le ^{a+} Le ^{b-} / Le ^{x+} Le ^{y-}
MIO	D	39	A	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
MAC	H	37	A	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
AAI	D	8	A	se-se-	Le ^{a+} Le ^{b-} / Le ^{x+} Le ^{y-}
JIO	H	34	O	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
NCV	D	28	O	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
GVO	D	47	B	Se+Se+	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
JCM	H	49	O	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x+} Le ^{y+}
HCV	H	26	B	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
SEV	D	32	A	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
SCG	D	27	A	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
JFA	D	27		Se+Se+	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
TFB	D	27	O	Se+Se+	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
PKP	D		B	se-se-	Le ^{a+} Le ^{b-} / Le ^{x+} Le ^{y-}
JBG	H		B	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
MFJ	H	31	B	Se+Se+	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
MO	D	43	A	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
ELV	D	47	O	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
CH	D	48	A	Se+se-	Le ^{a-} Le ^{b-} / Le ^{x-} Le ^{y+}
JC	H	38	A	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}
ALB	H	30	O	Se+se-	Le ^{a+} Le ^{b+} / Le ^{x-} Le ^{y+}

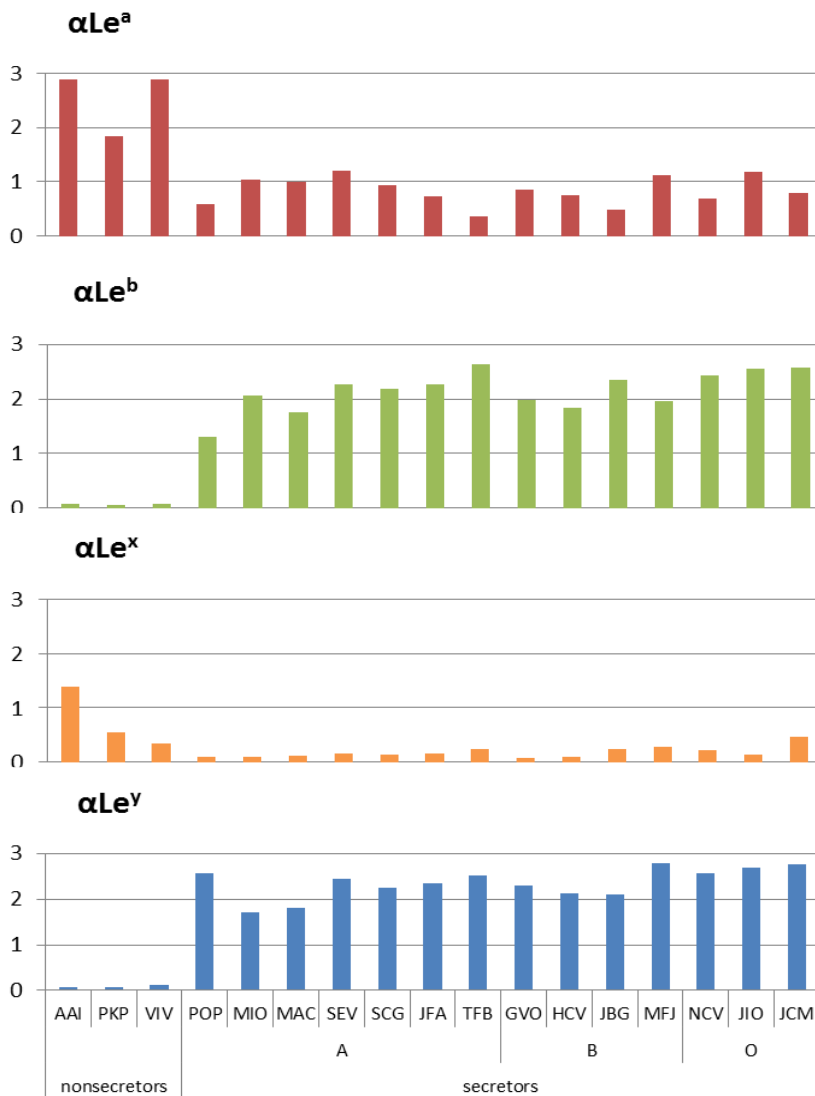


Figura 4.11. Fenotipat de les 22 mostres de saliva de voluntaris per ELISA. Les mostres de saliva es van utilitzar a una dilució 1/500 i es van assajar amb anticossos monoclonals front a antígens Le^a , Le^b , Le^x i Le^y . L'estat secretor (*FUT2*) i el grup sanguini ABO es mostren a la part inferior i cada AcMo anti-antígens Lewis es mostra a la part superior. Les mostres amb una OD < 0'20 (definit com 3xSD del valor dels controls negatius) es van considerar negatius.

4.2.2. Unió de VLPs de NoV a saliva: diferents genotips i genogrups mostren diferents patrons d'unió determinats pels HBGAs

Els assaigs d'unió a saliva es van dur a terme per a analitzar els patrons d'unió entre les VLPs i les partícules P de NoV a cada grup de saliva, dividint entre secretors i no secretors i tipus d'HBGA. Encara que el nombre de mostres analitzades no era massa gran, es va observar una clara separació comparant secretors front a no secretors en tots els casos. Es van analitzar quatre variants de VLPs i quatre de partícules P representants dels genogrups I i II: GI.1 (virus Norwalk), GII.4-2006b (Den Haag_2006b), GII.4-v0 (1999) i GII.4-v2 (Hunter_2004) de VLPs, i P-GI.1, P-GII.4 (VA387) i P-GII.9 de partícules P, i el domini P-GII.4-2007 (Apeldoorn_2007).

Els resultats del “*binding*” realitzats a 37°C indiquen que el GI i GII de NoV humans exhibeixen diferents patrons d'unió als HBGAs, principalment entre genogrups i en menor mesura dins d'un mateix genogrup (Fig. 4.12). Atenent al grup sanguini, GI.1 s'uneix de manera més eficient al tipus A i tipus O, mentre que GII.4-2006b uneix una mica millor al grup sanguini tipus B. Les variants GII.4-v0 i GII.4-v2 van revelar patrons d'unió similars, reconeguent els 3 tipus sanguinis A, B i O, observant-se una àmplia gamma de valors de densitat òptica ($OD = 0-2'5$) entre les 22 mostres de saliva analitzades (Fig. 4.12c i d), independentment del tipus de grup sanguini. Però cap variant de VLP es va unir a saliva d'individus no secretors (0 /3).

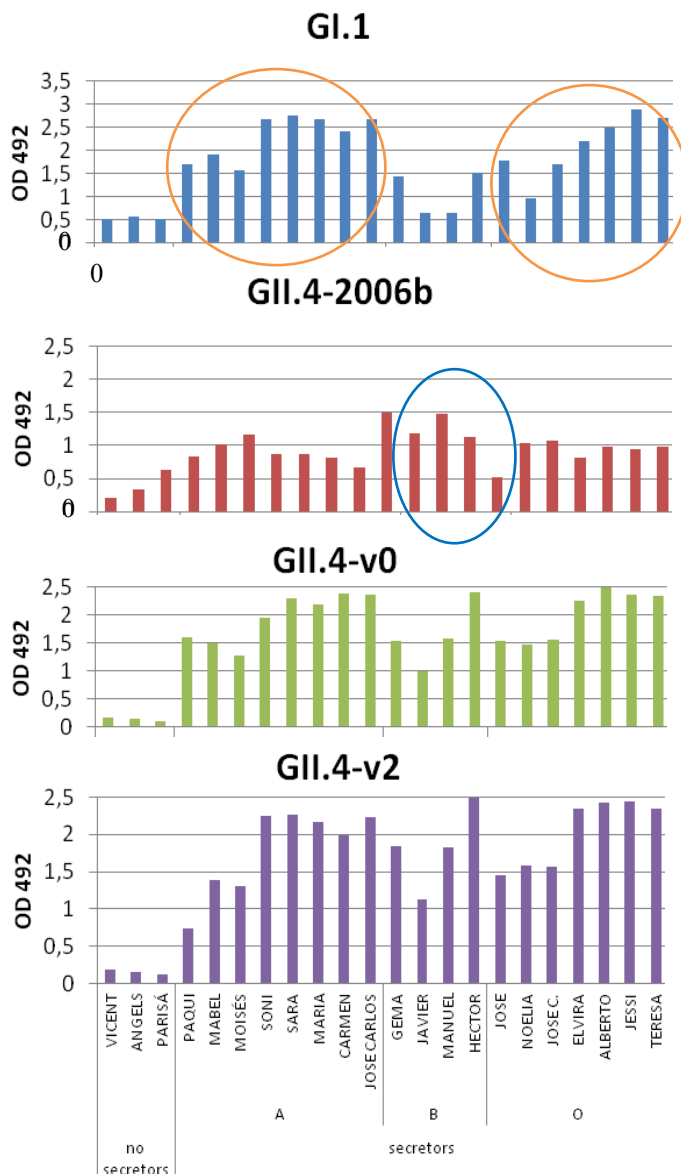


Figura 4.12. Patrons d'unió de les 4 variants de VLPs de NoV analitzades a les mostres de saliva de 22 voluntaris espanyols. Les plaques es van sensibilitzar amb una dilució 1/500 de la saliva dels diferents individus de diferent estat secretor, antigens Lewis i grup sanguini ABO, i es van incubar amb les diferents variants de VLPs (mostrat en cada gràfica). L'eix Y indica els valors de densitat òptica (OD_{492}) i l'eix X les mostres de saliva dels grups sanguinis A, B i O secretors i les salives de no secretors. En el cas de GI.1 i GII.4-2006b es remarquen els grups sanguinis que presentaren un major "binding".

Si s'analitza la unió en base al fenotip Lewis, pràcticament no s'aprecia diferència entre els diferents grups, les diferents VLPs utilitzades en aquest estudi reconeixen tant Le^b com Le^y, excepte per al cas de la saliva assignada com a individu secretor Lewis negatiu. Aquesta saliva no va ser capaç d'unir les VLPs de la variant GII.4-2006b.

D'altra banda, ninguna de les partícules P utilitzades en aquest estudi s'uniren a les mostres de saliva de cap grup sanguini ABO, en les mateixes condicions (dades no presentades).

4.2.3. La unió de les VLPs de NoV a saliva és inhibida mitjançant preincubació amb els AcMo específics anti-antígens Lewis humans i els AcMo anti-NoV

La incubació d'una placa sensibilitzada amb saliva d'un individu secretor heterozigot (Sese) i grup sanguini O amb una barreja d'anticossos anti-Le^y i anti-Le^x, va resultar en una reducció d'entre el 60 i el 75% en la unió de les diferents variants de VLPs de NoV (segons la variant utilitzada) quan es comparava amb els pouets no tractats, és a dir, amb els pouets sense el pas de preincubació amb els AcMo anti-HBGAs (Fig. 4.13). Per contra, no es va observar cap reducció de la unió quan es va utilitzar la mateixa combinació d'anticossos anti-Lewis en plaques sensibilitzades amb saliva d'individu no secretor (sese).

En canvi, quan s'utilitzava una combinació dels anticossos anti-Le^x i anti-Le^a, aquesta no era capaç de bloquejar la unió a saliva de secretor.

Només es va observar una inhibició (no significativa estadísticament) del 16% en la unió de la variant GII.4-2006b a mostres de saliva de no secretor.

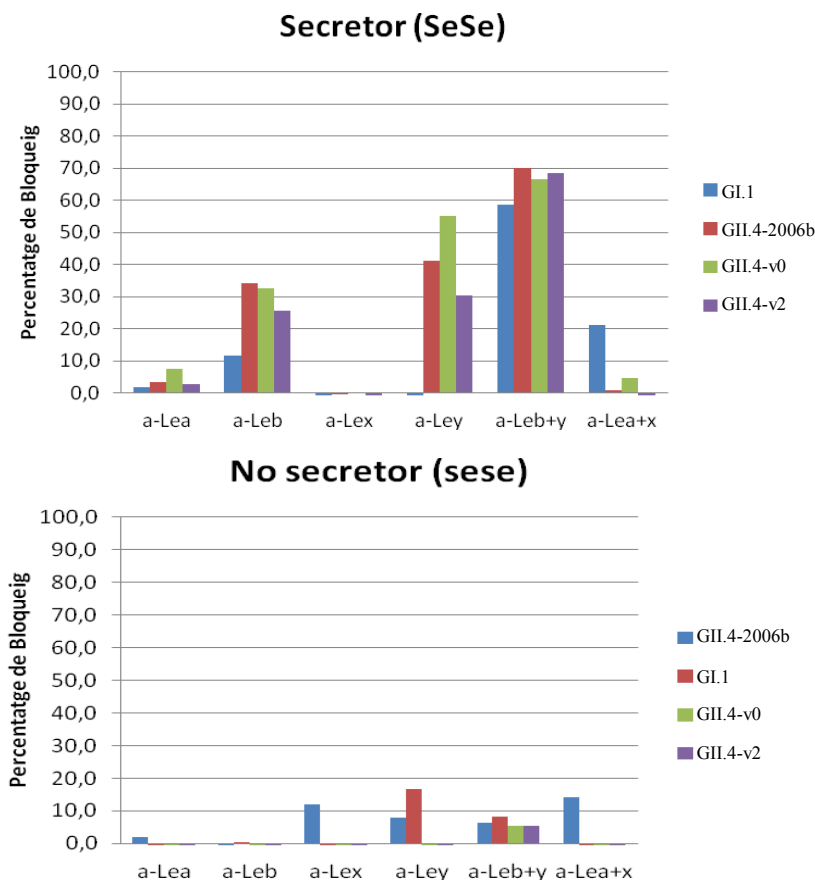


Figura 4.13. Percentatge de bloqueig de la unió de les diferents variants de VLPs de NoV a mostres de saliva d'un individu secretor i no secretor, respectivament. Les plaques se sensibilitzaven amb la saliva de secretor (grup sanguini O) o no secretor (grup sanguini A) a una dilució 1/500 i es preincubaven amb els AcMo anti-Ag Lewis: Le^a, Le^b, Le^x, Le^y o una combinació d'aquests, a una dilució 1/10. El bloqueig es determinava comparant la OD amb els pouets sense el pas de preincubació.

Per altra banda, tots els AcMo anti-NoV analitzats van impedir la unió de les VLPs a la saliva d'un individu secretor i de grup sanguini O, que és la que es va utilitzar per a aquests tipus d'assaig. S'observava una inhibició pràcticament del 100% quan s'utilitzaven els AcMo fins a una dilució 1/200, i en el cas de l'AcMo av0, fins i tot a dilucions molt més altes (1/3.200), el percentatge de bloqueig no baixava del 70%. En l'AcMo 3C3G3 també es va observar bloqueig de la unió a dilucions elevades, però el percentatge d'inhibició va ser molt menor (Fig. 4.14). Aquest bloqueig de la unió a saliva per part dels AcMo només es va observar quan s'utilitzaven les combinacions de VLP/AcMo homòlogues, i els controls d'assaig utilitzats demostraren clarament que aquests resultats eren altament específics.

4.2.4. Les VLPs de NoV, però no les partícules P, s'uneixen a mucina gàstrica porcina (PGM)

Totes les variants de VLPs utilitzades en aquest estudi (GII.4-v0, GII.4-v2 i GII.4-2006b) s'uniren a la PGM. La unió es va detectar amb el sèrum de conill (HPA) i també amb l'AcMo homòleg per a cada variant. Per altra banda, ninguna de les partícules P es va unir a la PGM, utilitzant les mateixes condicions, ja que no es va poder detectar cap senyal, ja fora amb l'anticòs anti-His o el sèrum que sí reconeix tant la P-GII.4-VA387, la P-GII.9 com el domini P-GII.4-2007 (Fig. 4.15).

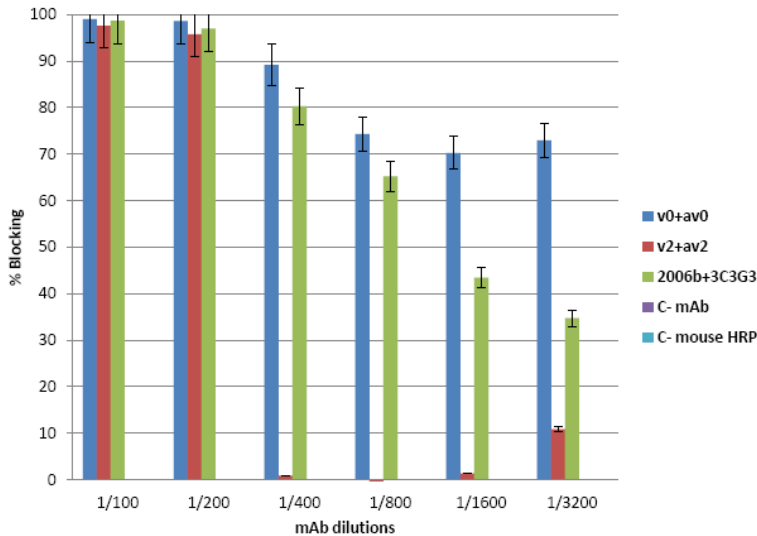


Figura 4.14. Bloqueig de la unió de les VLPs amb AcMo anti-NoV a mostres de saliva. La placa es va sensibilitzar amb saliva d'un individu secretor a 1/500. Cada variant de VLP es va preincubar amb el seu AcMo homòleg a 37°C abans d'afegir la mescla a la placa i es va detectar amb un anticòs anti-IgG de ratolí conjugat amb HRP. Totes les dilucions dels anticossos anti-NoV reduïren la unió, en comparació amb el control, de manera dependent de la concentració. Les barres d'error representen la desviació estàndard.

4.2.5. Totes les VLPs de NoV GII.4 analitzades, però no les partícules P, s'uneixen a cèl·lules Caco-2 diferenciades (D-Caco-2)

Les VLPs de les tres variants GII.4 es van unir a cèl·lules D-Caco-2. La unió no va ser uniforme a través de tota la preparació cel·lular, i les VLPs es van poder detectar només en certes cèl·lules o àrees de la monocapa cel·lular. Per contra, no es va poder detectar cap senyal amb qualsevol de les partícules P en les mateixes condicions (Fig. 4.16), a l'igual que en qualsevol dels controls negatius (sense VLPs o partícules P).

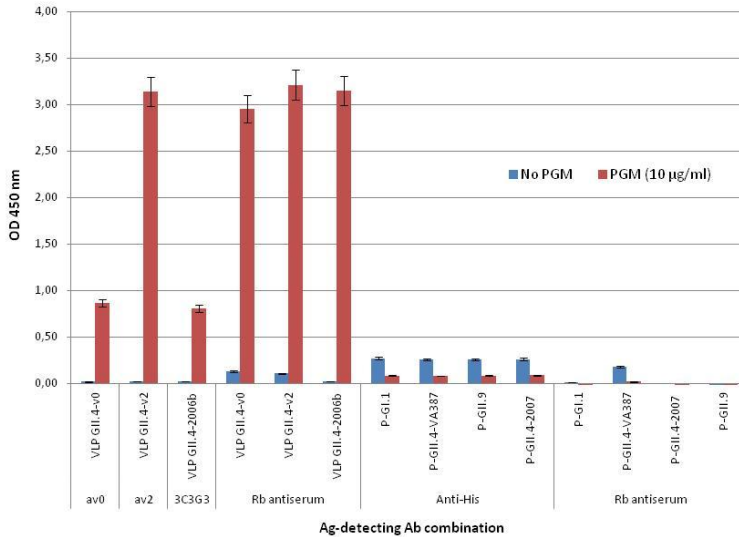


Figura 4.15. Unió de partícules P i VLPs a mucina gàstrica porcina (PGM). Les plaques de microtitulació sensibilitzades amb quantitats variables de PGM es van incubar amb les VLPs o les partícules P a 2 µg/ml durant 1 h i es van processar per a la detecció de la unió de les partícules virals mitjançant ELISA. Els assajos es realitzaren per duplicat i els valors mostrats corresponen a la mitja d'aquests. Les barres d'error indiquen intervals de confiança del 95%.

4.2.6. Els AcMo anti-Nov també bloquegen la unió de les VLPs a cèl·lules D-Caco-2

Els AcMo anti-NoV utilitzats en aquest estudi bloquejaren fortament la unió de les VLPs de NoV a la superfície de cèl·lules D-Caco-2, amb la mateixa especificitat variant-dependent que l'observada en els assaigs salivars. En concordància amb els assaigs d'ELISA, es va observar una reducció del 70-80% de la unió amb l'AcMo av2 (Fig. 4.17). L'activitat bloquejant de l'AcMo av0 va estar entorn el 80-90%, mentre que l'AcMo 3C3G3 també va bloquejar la interacció de les VLPs amb la monocapa cel·lular però no d'una forma tant clara com en els casos anteriors (dades no mostrades).

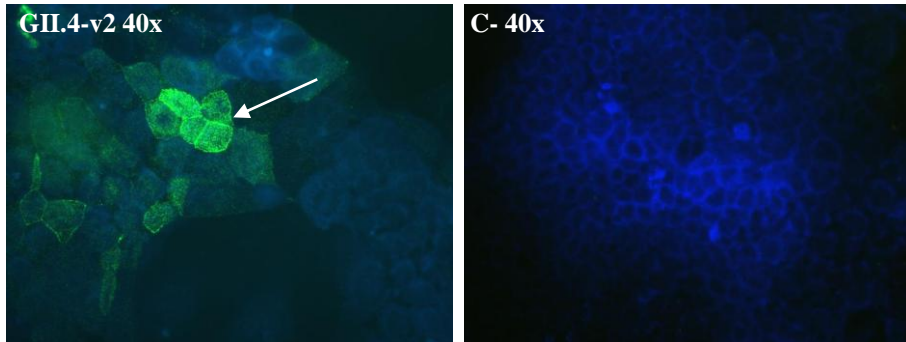


Figura 4.16. Anàlisi mitjançant microscòpia de fluorescència de la unió de VLPs de NoV de la variant GII.4-2004 (GII.4-v2) a cèl·lules diferenciades Caco-2. Imatges de microscòpia d'immunofluorescència representatives de cèl·lules D-Caco-2 en presència de 5 µg/ml de VLPs de la variant GII.4-v2 (esquerra). La unió de les VLPs es va realitzar mitjançant la incubació d'aquestes amb cèl·lules D-Caco-2 seguida de la detecció amb un anticòs policlonal anti-NoV com es descriu a l'apartat "Materials i mètodes". La fletxa indica la unió de les VLPs. Els controls negatius corresponen a cèl·lules D-Caco-2 incubades sense VLPs (dreta).

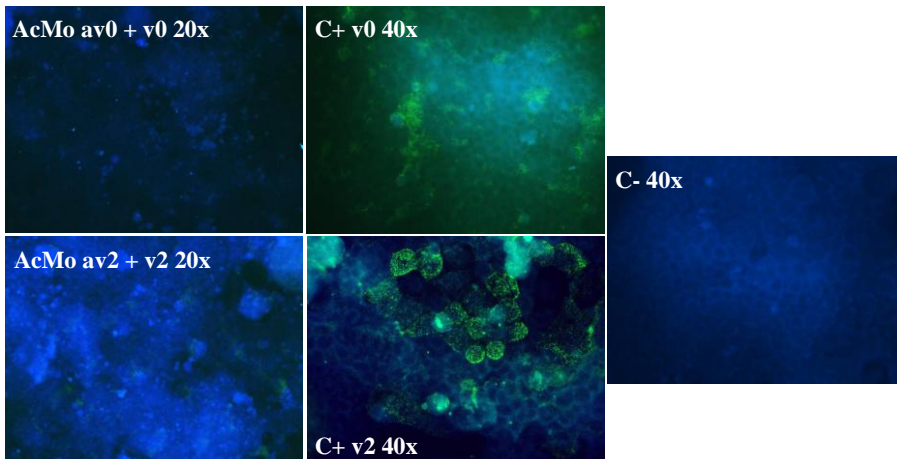


Figura 4.17. Bloqueig de la unió de VLPs de NoV a cèl·lules D-Caco-2 per AcMo anti-NoV. Les cèl·lules D-Caco-2 es van incubar amb VLPs preincubades anteriorment amb l'AcMo av0 (part superior) o amb l'av2 (part inferior) o sense preincubació com a control positiu. Les cèl·lules incubades amb PBS es van utilitzar com a control negatiu.

4.2.7. Diferents mostres de saliva i la PGM són capaces de reduir la unió de les VLPs a cèl·lules D-Caco-2

Per a aquests tipus d'assaigs, on es volia determinar la capacitat d'unió a cèl·lules D-Caco-2 en presència de PGM o mostres de saliva, només es va analitzar la variant de VLP GII.4-v2 (5 µg/ml). La preincubació amb saliva de grup sanguini tipus A va mostrar una reducció d'aproximadament el 70% en el nombre de cèl·lules amb VLPs unides (Fig. 4.18B). En canvi, la preincubació de les mateixes VLPs GII.4-v2 amb mostres de saliva de grup sanguini O o B mostraren una reducció del 40-50% (dades no mostrades).

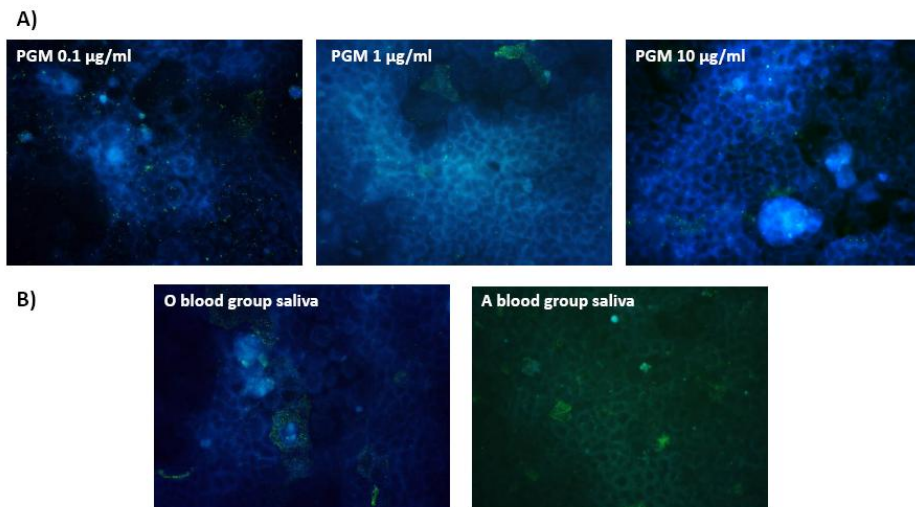


Figura 4.18. Bloqueig amb PGM i mostres de saliva. A) Les VLPs de NoV es preincubaren amb diferents concentracions de mucina gàstrica porcina (PGM) i després aquesta mescla es va afegir a cèl·lules D-Caco-2. Després d'1 h d'incubació, les cèl·lules es van fixar, es van incubar amb l'antisèrum de conill anti-NoV i es van detectar amb un anticòs anti-IgG de conill conjugat amb FITC. B) Es tracta del mateix experiment que l'anterior però preincubant les VLPs amb mostres de saliva de grup sanguini O (esquerra) o grup sanguini A (dreta).

Quan les VLP es van incubar amb diferents concentracions de PGM, es va observar que el bloqueig de la unió de les VLPs de NoV a les cèl·lules D-Caco-2 es produïa d'una manera dependent de la concentració. A una concentració de 10 µg/ml, la PGM va abolir completament la capacitat d'unió de les VLPs a cèl·lules D-Caco-2. Si s'utilitzava una concentració d'1 µg/ml sols s'observava una reducció del 50%, i cap efecte de bloqueig es va observar a una concentració de 0'1 µg/ml (Fig. 4.18A).

4.2.8. L'anàlisi de la diversitat dels HBGAs sobre la superfície de cèl·lules D-Caco-2 revela una alta expressió d'antígens H2, Le^y i Le^x

La majoria de les cèl·lules D-Caco-2 tenien un alt nivell d'expressió d'antigen H tipus 2 en les seues superfícies. A més, també es va observar una alta expressió d'antígens Le^y i Le^x, mentre que els antígens Le^b i H tipus 1 mostraven una expressió molt pobra (Fig. 4.19).

La disposició de la fluorescència corresponent a l'antigen H1 es podia observar com una espècie de fulla que cobria la superfície d'aquelles cèl·lules que l'expressaven, i es podria dir que el mateix ocorria amb l'antigen Le^b, encara que és difícil d'apreciar, però amb una intensitat de fluorescència més baixa. Per contra, en algunes cèl·lules de la figura 4.19e, s'observa perfectament que l'antigen H2 s'expressava al voltant de les cèl·lules, delimitant la superfície cel·lular.

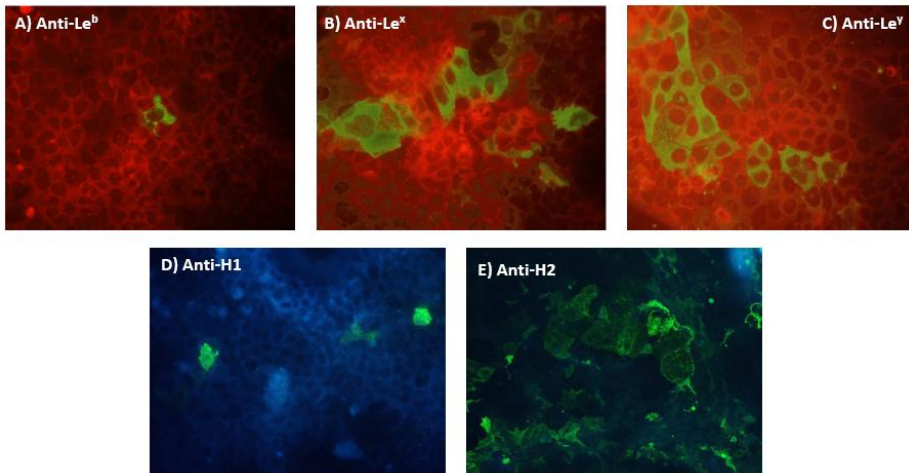


Figura 4.19. Superfície de la monocapa cel·lular Caco-2. Les cèl·lules Caco-2 es cultivaren en cambres de 8 pouets i es van fixar amb metanol. Els antígens Lewis i H van ser detectats per anticossos anti-Le^a (les imatges no es mostren), Le^b, Le^x, Le^y, H1 i H2, seguit d'un anticòs anti-IgG de ratolí marcat amb FITC (Santa Cruz Biotechnology). El citoplasma de les cèl·lules es va teyir amb blau d'Evans (fluorescència vermella). (A i D) Expressió molt feble tant de l'antigen Le^b com del H1 (puntuació de '+'), respectivament. (B i C) Expressió forta de Le^x i Le^y (puntuació '+ +'). (E) Expressió molt elevada de l'antigen H2 en la superfície cel·lular de les D-Caco-2.

4.2.8. Les VLPs de NoV s'uneixen a cèl·lules D-Caco-2 independentment de l'expressió dels HBGAs

Els anticossos anti-HBGAs utilitzats en aquest estudi (tant els anti-antígens Lewis com els anti-antígens H) no van afectar la unió de les VLPs de NoV analitzades a cèl·lules D-Caco-2. A més, l'expressió dels HBGAs no es correlacionava amb la unió de les VLPs, és a dir, no es va identificar cap co-localització entre ambdues (Fig. 4.20).

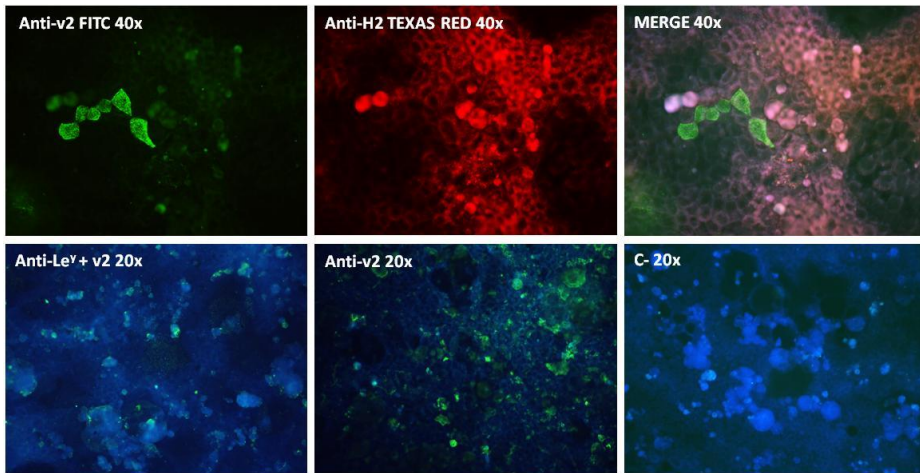


Figura 4.20. Anàlisi de la unió de VLPs de NoV a cèl·lules D-Caco-2 en base a l'expressió dels HBGAs en la seua superfície. Les VLPs de la variant GII.4-v2 es van afegir a les cèl·lules D-Caco-2 després de l'addició de l'anticòs anti-H2 (part superior) i anti-Le^y (part inferior), respectivament. Després d'1 h d'incubació a 37°C amb els anti-HBGAs, les cèl·lules es van fixar i es van incubar amb un anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat amb FITC (per detectar la unió de les VLPs) o anti-IgG ratolí conjugat amb Texas Red (per detectar els anticossos anti-HBGAs). No es van observar senyals fluorescents no específiques en el control negatiu. El nombre de cèl·lules fluorescents es va comptar en un total de 10 camps (20x).

DISCUSSION

Els HBGAs són hidrats de carboni neutres que estan presents en la superfície dels eritròcits i de les cèl·lules epitelials de la mucosa, o com oligosacàrids lliures en la llet, la saliva i els fluids intestinals d'individus secretors (Marionneau et al., 2001). Estudis previs han suggerit que els HBGAs és probable que exercisquen un important paper com a receptors cel·lulars per a la unió de virus (Tan i Jiang, 2005b; Huang et al., 2005), encara que el mecanisme molecular que el condueix a l'entrada dins la cèl·lula i la infecció com a tal, són fins ara desconeguts.

Els assaigs d'unió de NoV a mostres de saliva utilitzant el format EIA, en els últims anys, s'han convertit en una tècnica d'elecció per a l'estudi de les especificitats d'unió dels NoVs als HBGAs, ja que la saliva conté diferents perfils d'expressió d'HBGAs i és fàcil de recollir, i a més, els mètodes són relativament senzills i ràpids de dur a terme, obtiguent els resultats en un curt termini de temps. D'altra banda, les anàlisis que utilitzen HBGAs sintètics han demostrat ser un repte en termes de reproductibilitat, però també un poc problemàtics a causa de la falta de disponibilitat o dificultats per obtenir tals reactius. Però, com s'ha comentat anteriorment, en absència d'un sistema de cultiu cel·lular o un model animal adequat per a l'estudi dels NoV humans, les VLPs d'aquests i els assajos d'unió als HBGAs han contribuït significativament a la nostra comprensió de la susceptibilitat de l'hoste a la infecció per NoV, i també han permès el mapeig de les regions responsables de la

interacció entre els HBGAs i el subdomini P2 (Tan et al., 2011; Cao et al., 2007; Tan et al., 2003).

Si bé molts d'aquests estudis han comparat els resultats dels assajos d'unió a la saliva i a HBGAs sintètics, el present estudi, en addició, també compara els patrons de “*binding*” obtinguts en els casos anteriors amb la unió a la línia cel·lular intestinal humana Caco-2. Les cèl·lules polaritzades o D-Caco-2 també es coneixen per ser una eina útil per a l'estudi de la unió dels NoV, ja que tant els virus nadius com les VLPs s'uneixen i penetren en la superfície de la cèl·lula, malgrat la seva incapacitat per a dur a terme una infecció productiva (White et al., 1996; Tamura et al., 2000, 2004; Murakami et al., 2013).

En aquest estudi, s'han utilitzat cèl·lules Caco-2 per a comprendre les interaccions hoste-virus, ja que s'ha demostrat que poden diferenciar-se en cultiu en cèl·lules que contenen alta homologia amb els enteròcits madurs de l'epiteli intestinal (Pinto et al., 1983; Rousset, 1986). D'altra banda, expressen HBGAs en la seua superfície, com els antígens de tipus H o Lewis (Marionneau et al., 2002; Murakami et al., 2013; Amano & Oshima, 1999). També s'ha investigat la capacitat de les partícules P i de les VLPs d'interactuar amb la saliva i la PGM; i com els AcMo específics de cada variant, el sèrum de conill que reconeix varies variants (“cross reactivity”) i la mateixa PGM poden interferir amb la unió a les cèl·lules D-Caco-2 i/o als HBGAs salivals. Finalment, s'ha estudiat l'impacte que el bloqueig dels HBGAs mitjançant AcMo específics té en la unió de NoV, tant a la saliva com a cèl·lules D-Caco-2.

Per als assaigs de “*binding*” a saliva, totes les mostres es van caracteritzar prèviament, tant el seu genotip com el seu fenotip. Entre la població europea i la nord-americana (caucàsica), s’ha determinat que aproximadament el 80% de la gent és secretora, posseïnt un alel *FUT2* actiu, mentre que el 20% restant és no secretora (Le Pendu, 2004). Aquests percentatges són pareguts als que s’han obtingut en aquest estudi, per tant, el grup de salives estudiat es podria considerar com un grup representatiu de la majoria de la població europea. Un individu es considera no secretor, atenent al genotip, si conté una mutació en el gen *FUT2*, mentre que si s’estudia el fenotip, no ha d’expressar ni antigen Le^b ni Le^y però si Le^a i Le^x , tal i com s’indica als resultats obtinguts on els percentatges coincideixen completament (13’6% / 13’6%).

Una vegada caracteritzades totes les salives es va procedir a l’anàlisi del “*binding*” tant de les diferents variants de VLPs com de partícules P de les que es disposava. Totes les VLPs utilitzades mostraren unió a les salives d’individus secretors, independentment del grup sanguini o fenotip Lewis, mentre que no s’uniren a cap saliva de no secretor. A més, aquesta unió pot ser reduïda significativament amb l’ús d’anticossos anti-HBGA específics. En les mateixes condicions no es va observar unió quan s’utilitzaven partícules P, a l’igual que en la resta d’experiments com es discuteix més avant. Huang i col. (2005) describiren en el seu estudi que els NoV es podien agrupar en 4 grups segons el seu patró d’unió basat en l’estat secretor, el tipus ABO i els antigens Lewis de cada individu. Les variants que s’han utilitzat en aquest treball es poden agrupar dins de dos dels

patrons descrits: GI.1 en el grup en el qual reconeixen secretors de grup sanguini A i O, i la resta de variants (GII.4-v0, GII.4-v2 i GII.4-2006b) en el grup on reconeixen saliva de tots els secretors independentment del grup sanguini. Els patrons d'unió observats no són deguts a anticossos anti-NoV presents en les mostres de saliva, ja que aquests possibles anticossos podrien haver sigut inactivats al bullir les salives abans d'utilitzar-les. A més, els resultats obtinguts estan d'acord amb observacions prèvies d'altres treballs realitzats (Hutson et al., 2002). De manera que es pot dir que cada NoV té la seua pròpia especificitat d'hoste que depèn d'una combinació de l'estat secretor, grup sanguini i fenotip Lewis, encara que com sempre, dins de cada grup, existeixen algunes excepcions. Per exemple, en aquest cas, dos de les mostres de saliva agrupades dins del grup sanguini tipus B presenten una OD $\sim 1'5$ en l'assaig d'unió de les VLPs de GI.1, que de forma general no uneixen a aquest grup sanguini. Aquest fet podria ser conseqüència d'una quantitat residual d'antigen H en aquests individus.

La identificació d'epítops específics de variant entre NoVs GII.4 segueix sent crucial per entendre l'evasió immune i les epidèmies d'aquests virus, i això, al seu torn, també serà molt important per al disseny racional de possibles vacunes candidates. No obstant això, les partícules P no es van unir a la saliva, la PGM o les cèl·lules D-Caco-2, en contrast amb estudis anteriors en els quals demostren la unió de les partícules P a saliva (com s'ha comentat abans), així com a HBGAs sintètics, amb només la pèrdua d'unió a antígens tipus H

(Tamminen et al., 2012; Tan et al., 2004a). En aquest cas, sols s'observaren alguns focus fluorescents suggestius d'una unió feble del domini P-GII.4-2007 a cèl·lules Caco-2, però les imatges eren difícils d'interpretar, especialment en comparació amb les obtingudes per a les VLPs. Com ja està descrit en treballs anteriors, la interacció VLP-HBGA sol ser més estable que la interacció partícules P-HBGA (Cao et al., 2007). No es pot descartar que els enllaços febles entre les partícules P i la saliva, la PGM o les Caco-2 no suporten les condicions d'assaig utilitzades, però utilitzant les mateixes condicions i el mateix enfocament analític es va determinar amb èxit la unió de les VLPs a aquestes matrius. A més, les partícules P foren dissenyades per a què expressaren l'etiqueta rica en Cys, ja que està descrit que augmenta l'estabilitat de les mateixes (Tan & Jiang, 2005a), per tant, els resultats obtinguts són poc probable que siguin una conseqüència de la inestabilitat de les partícules P. Aquest fet suggereix que altres regions fora del domini P podrien jugar un paper important en la unió i l'estabilitat dels HBGAs amb el receptor cel·lular.

La unió de les VLPs a PGM i a la superfície de cèl·lules D-Caco-2, va ser abolida per la pre-incubació de les VLP amb antisèrums específics anti-NoV. Això significa que els AcMo anti-NoV específics de variant reconeixen epítops que estan directament involucrats o en la proximitat dels dominis responsables de la unió als lligands que contenen hidrats de carboni, i podrien representar epítops neutralitzants.

En conjunt, aquests resultats suggereixen que la combinació d'ambdós dominis, S i P, podrien ser necessaris per permetre la unió eficient de NoV als receptors cel·lulars, encara que els nostres resultats indiquen que els epítops específics de variant potencialment neutralitzants són propensos a residir al subdomini P2. Per tant, encara que l'ús potencial de les partícules P com a vacunes continua sent prometedor, ja que abasten el genotip i epítops específics de variant que són potencialment neutralitzants, el seu ús per a l'estudi de les interaccions hoste-NoV és probable que sigui limitat.

Recentment s'ha demostrat que la immunització amb partícules P, en comparació amb les VLPs, utilitzant el model murí, desencadena una resposta immune significativament diferent, com és una resposta Th2 parcial, anticossos d'avidesa inferiors, disminució de la capacitat de bloquejar la unió als HBGAs i la impossibilitat per encebar cèl·lules T per a la producció d'interferó- γ (Tan et al., 2004b). Tan i Jiang (2005a) posteriorment, van destacar que les propietats de la formació de partícules P, i, en particular, la inclusió d'una etiqueta que conté cisteïnes, són crucials per millorar la immunogenicitat, i que, per tant, cal continuar treballant per tal d'avaluar plenament el seu potencial com a vacunes. A més, les respostes immunes i les correlacions de protecció en els éssers humans són, fins ara, en gran mesura desconeguts. Una vacuna contra NoV podria estar enfocada a poblacions de risc, com la gent major, institucionalitzats, viatgers, etc, que consisteixen en individus pre-exposats, i dita immunització amb partícules P hauria de conduir a una estimulació de la memòria

immune front a NoV i proporcionar protecció que diferiria de les respostes immunes i de la protecció conferida a un subjecte no immune (“naïve”). El fet de que les partícules P no s’uneixen o s’uneixen dèbilment als HBGAs o receptors cel·lulars poden no suposar un repte fonamental per a una vacuna no recombinant, com ara les ja proposades per a NoVs, sempre que provoquen una resposta immune apropiada en l’hoste.

Els experiments realitzats amb les cèl·lules D-Caco-2 van demostrar clarament que les VLPs s’unien a certes subpoblacions de cèl·lules, i que la PGM i els anticossos anti-NoV abolien la unió a les mateixes. La inhibició de la unió de VLPs per PGM havia sigut observada anteriorment amb altres variants de VLPs per Tian i col. (2005). Les mostres de saliva també reduïren la unió de les VLPs a les cèl·lules D-Caco-2, però no l’aboliren, i s’observaren diferències en la capacitat de bloqueig en funció del tipus de grup sanguini. En assaigs realitzats per Tan i col. (2003) demostraren una completa supressió de la unió de les VLPs als antígens A, B i H en assajos d’unió a saliva utilitzant VLPs mutades en el motiu RGD. Seria interessant confirmar aquests resultats utilitzant cèl·lules Caco-2. L’ús d’AcMo específics anti-HBGA per localitzar el tipus d’HBGAs que s’expressen en la superfície de les cèl·lules D-Caco-2 va mostrar una expressió generalitzada dels antígens H2 i Le^y, i una expressió més difusa o agrupada d’H1, Le^b i Le^x. Aquestes observacions són similars a les reportades recentment per Murakami i col. (2013), i contrasten amb altres estudis que informen d’una expressió alta d’antígens tipus H1

(Amano & Oshima, 1999). No obstant això, les cèl·lules Caco-2 són una població heterogènia de cèl·lules i l'expressió de les característiques tant morfològiques com funcionals depenen del grau de diferenciació, el que podria explicar els diferents resultats observats en relació amb l'expressió dels antígens HBGAs, fent difícil la comparació dels resultats obtinguts pels diferents laboratoris.

El bloqueig dels HBGAs en la superfície de les cèl·lules D-Caco-2 amb AcMo específics no va afectar la unió de les VLPs, a més, no es va observar, per immunofluorescència, cap co-localització entre els HBGAs i les VLPs. Aquests resultats, per tant, suggereixen que la unió a cèl·lules Caco-2 està mediada per altres receptors diferents dels HBGAs, d'acord també amb els últims resultats obtinguts per Murakami i col. (2013). Alguns virus requereixen interaccions amb més d'una molècula de la superfície cel·lular per iniciar el seu cicle de replicació, com ara el virus de l'herpes boví (Li et al., 1995), i l'adenovirus (Wickham et al., 1993). A més, algunes soques de NoV, com per exemple la GII.4-2002, no s'uneixen de manera eficient a qualsevol HBGA, que suggereix que poden estar utilitzant altres tipus de carbohidrats (Bok et al., 2009; Lindesmith et al., 2008), com ara sucres carregats negativament com fa el calicivirus felí (FCV) (Stuart & Brown, 2007) o el NoV murí (MNV) (Taube et al., 2009). Específicament, FCV s'uneix a un residu d'àcid siàlic amb un enllaç 2-6, però utilitza la molècula d'adhesió d'unió 1 (JAM-1) per a la internalització en les cèl·lules hoste (Makino et al., 2006). El NoV murí, per contra, s'uneix a un gangliòsid GD1a present a la

superfície de macròfags murins (Taube et al., 2009). En suport a aquestes hipòtesis, alguns estudis han demostrat la unió de NoV GII a heparan sulfat carregat negativament (Tamura et al., 2004) i a antigens sialil Le^x (Rydell et al., 2009). Altres estudis han demostrat que l'associació HBGA no és suficient per a superar el fracàs de la propagació d'aquests virus *in vitro*. Per exemple, línies cel·lulars que expressen HBGAs són resistents a la infecció (Duizer et al., 2004) i la transfecció de *FUT2* en cèl·lules no facilita la infecció per NoVs (Guix et al., 2007).

Els assaigs d'unió de les VLPs a cèl·lules D-Caco-2 es van realitzar a 37°C, per representar les condicions fisiològiques amb més precisió. En estudis previs s'havia realitzat a 4°C per evitar la internalització, la qual es va informar que es produïa en el 5-7 % de les cèl·lules quan la incubació tenia lloc a 37°C (Tamura et al., 2000); però el treball recent de Murakami i col. (2013) va descriure una internalització similar, fins i tot, quan la incubació es realitzava a 4°C. A més, cal reconèixer que l'expressió i el paper potencial d'altres HBGAs ací no investigats, com els antigens H3 i H4, han de ser estudiats més a fons.

En conclusió, els resultats obtinguts en aquest estudi donen suport a la noció de que els HBGAs és poc probable que actuen com els principals o els únics receptors per a dur a terme la unió a les cèl·lules i la posterior infecció. La incapacitat de les partícules P, en les quals s'han mapejat les butxaques d'unió als HBGAs (Tan et al., 2003), d'unir-se a cèl·lules Caco-2 o PGM, i la manca de

col·localització entre els HBGAs i les VLPs en les cèl·lules D-Caco-2 proporcionen més evidència de què, mentre que els HBGAs poden funcionar com a molècules d'unió per als NoV, altres molècules que encara no s'han identificat podrien conduir la infecció. Per tant, els assaigs d'unió a cèl·lules D-Caco-2 poden ser més adequats per a l'estudi *in vitro* de la unió dels NoVs i de les interaccions virus-hoste que els assaigs salivals, els quals podrien estar considerant sols les interaccions HBGA-NoV, així com també per proporcionar un substitut més fiable per als assaigs de neutralització. Mentre que les partícules P sembla que tinguen una menor capacitat d'unir-se als lligands dels NoV, la demostració que posseeixen epítops importants de genotip i epítops específics de variant, recolza el seu potencial com a molècules candidates per a una possible vacuna. El fet que les partícules P podrien induir respostes d'anticossos específics de variant, juntament amb la facilitat relativa amb què es poden produir, fa possible la generació de vacunes candidates, que consistiria en un "còctel" de múltiples partícules P que contindrien les permutacions apropiades d'epítops representant les múltiples variants, i així poder proporcionar una protecció amb una reactivitat creuada contra un ampli espectre de soques de NoV. Aquests candidats a vacuna podrien ser produïts més ràpida i econòmicament en comparació amb les dificultats de la producció de múltiples VLPs, permetent, en cas de ser necessari, canvis de composició de la vacuna.

RESULTATS III:
Estudi de seroprevalença
de NoV humans

4.3. SEROPREVALENCIA D'ANTICOSSOS ESPECÍFICS ANTI-NOV GII.4 EN VALÈNCIA

Els NoV del genotip GII.4 són la principal causa dels brots de GEA a tot el món, així com una causa freqüent d'episodis esporàdics. En estudis realitzats al nostre laboratori, analitzant la prevalença dels diferents genotips de NoVs com la causa de brots i casos esporàdics de gastroenteritis aguda a la regió de València, Espanya, durant un període de quatre anys (2008-11), es van detectar NoVs en 42 dels 55 (76'3 %) brots i en 26 dels 332 (7'8%) casos esporàdics de GEA. Les variants del genogrup GII eren les predominants tant en els brots com en els casos esporàdics. Les variants observades foren GII.4-Yerseke_2006a, GII.4-Den Haag_2006b, GII.4-Apeldoorn_2007 i GII.4-New Orleans_2009, sent aquesta última la variant més detectada (40%) (Fernández-Jiménez et al., 2011).

De manera que el domini P recombinant de NoV GII.4-2007 produïda durant aquesta tesi doctoral es va utilitzar com a antigen per als assaigs d'ELISA i així poder estudiar la prevalença d'anticossos IgG anti-NoV GII.4 en la ciutat de València i els seus voltants. Les VLPs de la variant GII.4-2006b també es van utilitzar com a antigens per a comparar la seroreactivitat.

4.3.1. Producció del domini P de la proteïna de la càpside de NoV GII.4-2007

El domini P de VP1 es va produir com una proteïna recombinant amb coles d'histidina (6xHis) en *E. coli* donant ~2 mg de proteïna per

litre de medi de cultiu. El polipèptid P produït es va analitzar per SDS-PAGE on s'observava una sola banda principal de proteïna de ~36 kDa (monòmer de la proteïna) i una banda de 72 kDa corresponent als dímers P (Fig. 4.1), identificats també per Western blot utilitzant un sèrum específic hiperimmune de conill contra les VLPs de NoV (resultats no mostrats).

Aquest polipèptid és el que es va utilitzar per a investigar, mitjançant EIA, la prevalença d'anticossos anti-NoV GII.4 en les mostres de sèrum procedents de l'Hospital Clínic Universitari de València.

4.3.2. Detecció d'anticossos anti-NoV GII.4, utilitzant VLPs i el domini P, mitjançant EIA

De les 434 mostres de sèrum, 429 (98'8%) van ser positives per a anticossos contra el domini P. A més, els títols d'anticossos IgG en 30 de les mostres dels sèrums utilitzats, es van analitzar tant front a les VLPs de NoV com front al domini P per tal de comparar els resultats i comprovar que realment la reactivitat observada era específica i no es tractava de cap artefacte.

La majoria de les mostres van mostrar seroreactivitats molt similars contra els dos antígens utilitzats (VLPs i domini P), excepte unes poques mostres que van presentar títols majors davant les VLPs que davant del domini P. Aquesta comparació va mostrar resultats reproduïbles amb un coeficient de correlació de $r = 0'607$ (Fig. 4.21).

El reconeixement del domini P per part de la majoria de sèrums analitzats confirma que aquesta regió de la proteïna de la càpside de NoV és immunodominant i produeix anticossos anti-NoV de classe IgG.

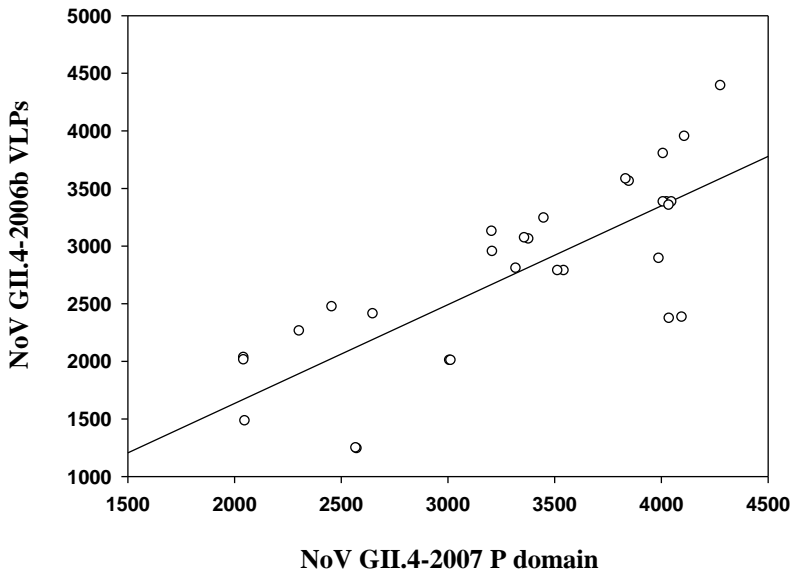


Figura 4.21. Comparació dels títols mitjans geomètrics d'anticossos anti-NoV GII.4 front a les VLPs i el domini P en 30 mostres de sèrum representatives. Cada cercle representa una mostra de sèrum, i la línia representa el resultat dels anàlisis de regressió lineal. El coeficient de correlació (r) es va determinar mitjançant l'ús del programa SigmaPlot (SigmaPlot versió 10.0, systat Software Inc, Point Richmond, CA, EUA).

4.3.3. Prevalença d'anticossos IgG contra NoV associada a l'edat

Les mostres de sèrum es van dividir en deu grups d'edat. En el seu conjunt, la prevalença d'anticossos IgG contra NoV GII.4 observada va ser molt alta (98'8%), el que confirma una alta freqüència d'infeccions per NoV d'aquest genotip en la població.

Aquesta seroprevalença d'anticossos IgG anti-NoV GII.4 variant 2007 es mostra a la taula 17 per grups d'edat. Els nens <1 any d'edat mostraren uns nivells del 60% (3/5), presentant els títols més baixos. No obstant això, la petita grandària de la mostra d'aquest grup d'edat no va permetre extreure conclusions. Els nivells d'anticossos van disminuir del 97'1% (33/34) en el grup d'edat d'1-5 anys al 85'7% (12/14) en el grup d'edat de 6 a 10 anys, amb els títols més baixos. Després de l'edat de 10 anys, s'observava que la seroprevalença augmentava amb l'edat i arribava a ser màxima (100%) en tots els grups d'edat (Taula 17).

Taula 17. Prevalença associada a l'edat d'anticossos IgG contra NoV GII.4. Els títols d'anticossos específics del domini P-GII.4-2007 es van determinar mitjançant ELISA.

Grup d'edat	Nº de mostres de sèrum	Nº de sèrums amb anticossos IgG anti-NoV	% de sèrums amb anticossos IgG anti-NoV
<1	5	3	60
1-5	34	33	97'1
6-10	14	12	85'7
11-20	41	41	100
21-30	69	69	100
31-40	99	99	100
41-50	61	61	100
51-59	48	48	100
60-69	27	26	96'3
>70	36	36	100
Total	434	428	98'6

La diferència en la prevalença d'anticossos va ser significant estadísticament quan es comparaven persones menors i majors de 30 anys (prova de Pearson chi-quadrat, $p < 0'05$).

També es va observar que els nivells d'anticossos augmentaven gradualment amb l'edat, aconseguint el títol més alt en individus d'entre els 41 i 50 anys (Fig. 4.22).

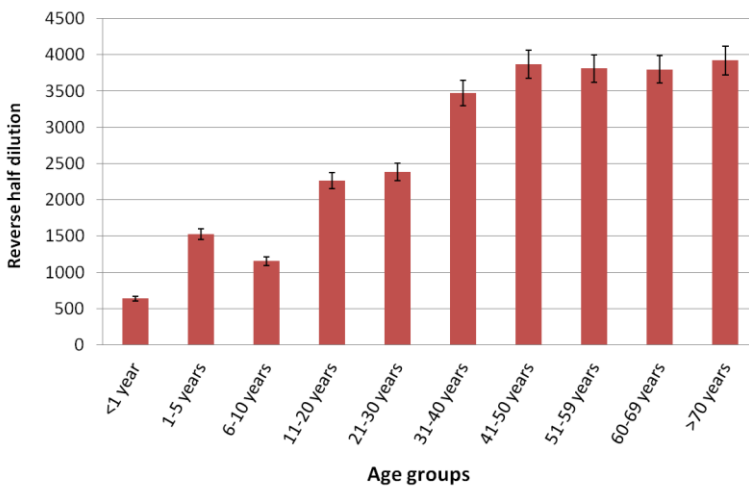


Figura 4.22. Distribució segons l'edat dels títols d'anticossos IgG contra el polipèptid P de la proteïna de la càpsida de NoV GIL.4 en sèrums humans recollits des de 2009 fins 2010. Les barres d'error indiquen intervals de confiança del 95%.

4.3.4. Bloqueig de la unió de NoV a saliva

La capacitat de bloqueig d'un subgrup de 15 mostres de sèrum també es va estudiar. Les 15 mostres elegides presentaven anticossos anti-NoV detectats mitjançant l'assaig d'ELISA anterior, però només tres de les mostres van ser capaces de bloquejar la unió de les VLPs a saliva i a títols baixos (1/100, 1/200 i 1/400, respectivament).

DISCUSSIÓ

Els NoVs són reconeguts com un dels agents etiològics més importants de diarrea no bacteriana en molts països desenvolupats, així com en països en vies de desenvolupament (Green, 2007). En aquest estudi, s'han utilitzat el domini P expressat en *E. coli* i les VLPs expressades en baculovirus de NoV GII.4 per a la detecció d'anticossos mitjançant EIA en sèrums humans.

Els primers estudis serològics relacionats amb la resposta immune que es desencadena davant d'una infecció per NoV es van dur a terme utilitzant partícules víriques obtingudes a partir del material fecal de voluntaris adults infectats (Blacklow et al., 1979; Gary et al., 1987; Gray et al., 1993). La producció de VLPs com a nova font d'antígens per a analitzar la resposta d'anticossos contra diferents genogrups i genotips va fer molt més assequibles aquests tipus d'estudis amb NoV.

En aquest cas en particular, es va investigar la prevalença d'anticossos contra NoV en una població seleccionada a València. Els nostres resultats mostren que gairebé el 100% dels adults tenien anticossos contra NoV GII.4, tant davant les VLPs com del domini P. Estudis anteriors utilitzant sols VLPs recombinants van mostrar també nivells alts d'anticossos específics de NoV en diferents poblacions i àrees geogràfiques. Per exemple, en els primers estudis de seroprevalença amb voluntaris humans, es van detectar anticossos en sèrum front a l'agent Norwalk en aproximadament el 50% dels adults a Massachusetts (Blacklow et al., 1979) i en més del 80% a Texas

(Gary et al., 1987). A Kuwait, es va observar una seroreactivitat del 100% davant rNV entre les persones majors de 11 anys d'edat (Dimitrov et al., 1997). La seroprevalença en diferents regions d'Anglaterra va ser d'entre el 63 i el 73% (Gray et al., 1993; Parker et al., 1994), mentre que la prevalença va ser del 72% entre els beduïns d'Àrabia Saudita i el 94 % entre els aborígens d'Austràlia (Parker et al., 1994). Estudis més recents també mostren que hi ha una adquisició, a edats temperanes, d'anticossos específics front a NoV de GII.4 i una elevada prevalença (fins 90-100%) en la població general (Jing et al., 2000; Dai et al., 2004; Peasey et al., 2004; Nurminen et al., 2011). De manera que els nostres resultats són consistents amb les dades anteriors.

Diferents estudis realitzats per Tan i Jiang, demostren que l'addició de cisteïnes en qualsevol dels dos extrems del domini P estabilitza la formació de partícules P, el més probable mitjançant l'enfortiment de la interacció entre dímers P, principalment per la formació d'enllaços disulfur entre aquests dímers P (Tan et al., 2008). En la construcció que s'ha utilitzat en aquest estudi no s'han inclòs aquests residus de cisteïna, però la producció i formació dels dímers P es va confirmar per Western blot utilitzant el sèrum hiperimmune de conill anti-NoV i per microscòpia electrònica. En altres estudis, els residus de cisteïna tampoc es van incloure per a la producció de partícules P, i es van obtenir bons resultats utilitzant només dímers P (Choi et al., 2008; Hansman et al., 2011; Shanker et al., 2011; Han et al., 2013).

Per a confirmar l'especificitat dels anticossos contra el domini P de NoV mitjançant EIA, es van analitzar en paral·lel 30 mostres de sèrum contra VLPs de NoV GII.4-2006b i el domini P-GII.4-2007. La reactivitat observada va ser major quan es van utilitzar les VLPs, comparant els títols mitjans geomètrics d'ambdós antigens. Al tractar-se de variants diferents, encara que siguin del mateix genogrup, els resultats són difícilment comparables deguda a l'alta variabilitat que existeix d'una variant a altra, sobretot en els llocs antigènics descrits (Zakikhany et al., 2012). Aquesta diferència es podria explicar atenent a diversos factors. Per exemple, d'acord amb l'estructura cristal·logràfica de raigs X del virus Norwalk, la partícula de calicivirus es compon de 180 molècules de proteïna de la càpside acoblats en 90 dímers (Prasad et al., 1999). Aquests dímers presenten una part protuberant formada pel domini P i una part interna pel domini S, presentant una morfologia pràcticament idèntica al virus natiu. Mentre que el domini P utilitzat, és un polipèptid format únicament pel subdomini P2 i part del P1, mancant de parts estructurals que podrien ser importants a l'hora de presentar la zona antigènica i que supondrien una major avidesa per part dels anticossos. La diferent estructura de les VLPs comparada amb el domini P també podria ser una possible explicació de la major reactivitat davant les VLPs.

Aquest estudi sobre la seroprevalença d'anticossos IgG contra NoV GII.4 a València, demostra que aquestes infeccions són molt freqüents i es produeixen a edats molt tempranes. La prevalença dels

anticossos IgG en nens entre les edats de < 1 i 10 anys va variar entre el 60-97% i augmentava fins al 100% a l'edat d'11 anys. Pel que fa als anticossos presents en els lactants < 1 any presumiblement són d'origen matern, encara que el nombre de mostres en aquest grup d'edat era massa baixa per a analitzar la possible significació estadística. Es va observar un augment en els nens d'entre 1 i 5 anys, seguit d'un lleuger descens i després un nou augment de fins al 100% com el valor final en tots els grups d'edat adulta. Aquesta variació podria ser deguda al diferent estil de vida al que van adaptant-se els nens a mesura que van creixent. Entre 1 i 5 anys comencen a anar a les guarderies i als 10-14 comencen a tindre les primeres relacions entre els diferents sexes, cosa que augmenta la probabilitat de contagi.

La majoria dels estudis previs van examinar la prevalença d'anticossos davant el virus Norwalk (GI.1), tant en nens com en adults, ja que aquest genotip va ser predominant en la dècada de 1970 (Blacklow et al., 1979; Gary et al., 1987; Gray et al., 1993; Dimitrov et al., 1997). Mentre que a mitjans de la dècada de 1990 el genotip GII.4 de NoV va ser reconegut com la principal causa de brots de gastroenteritis (Siebenga et al., 2007). Per aquesta raó sols es realitzaren assaigs front a aquest genotip.

De forma lògica, és raonable pensar que no totes les persones es van infectar amb la mateixa variant de NoV utilitzat en el immunoassaig, el que suggereix que alguns determinants antigènics en el domini P podrien estar conservats en diferents variants del genotip GII.4 amb diferents patrons d'unió al receptor (Jiang et al., 1996).

Nurminen i col. en l'any 2011 van informar de reactivitat creuada entre els genotips GII.4 i GII.12. Altres estudis han donat suport a què la resposta serològica davant de variants d'un mateix genogrup reaccionen amb més força del que fan front a les variants de diferents genogrups (Lindesmith et al., 2010).

En resum es pot dir, que en aquest estudi s'ha demostrat que els nens adquireixen anticossos front a NoV GII.4 a una edat molt temprana (el que suggereix una alta freqüència d'infecció primària en els nens petits), que hi ha una alta seroprevalença en la població estudiada, aconseguint el 100% des dels 11 anys, i que aquest nivell de seroprevalença és similar als reportats en altres països (Gray et al., 1993; Dimitrov et al., 1997; Farkas et al., 2000; Jing, 2000; Nurminen et al., 2011).

Aquests resultats suggereixen que el genotip GII.4 circula a València, com es mostra en els resultats de genotipat durant el període d'estudi realitzat (Fernández-Jiménez et al., 2011). L'alta prevalença d'anticossos en la població adulta pot reflectir reinfeccions amb NoV antigènica relacionats amb la variant GII.4-2006b i GII.4-2007. Quan es va assajar el bloqueig de la capacitat d'unió de les VLPs de NoV a la saliva, només el 20% de les mostres (3/15) van ser capaces de bloquejar aquesta unió a títols baixos (1/100-1/400). Aquest resultat està en concordança amb estudis previs que també demostren que la presència d'anticossos anti-NoV, no bloquejants, no es correlaciona amb la protecció de la infecció (Parrino et al., 1977; Johnson et al., 1990; Reeck et al., 2010).

Tot i l'alta prevalença d'anticossos IgG en sèrum per a NoV GII.4 en els diferents grups d'edat, aquests virus encara infecten la població susceptible. Fins ara, la correlació de protecció immunitària davant les infeccions per NoV és poc coneguda, i la presència d'anticossos en sèrum per al virus Norwalk no es correlaciona amb la resistència a la malaltia (Baron et al., 1984), tot i que la immunitat adquirida pot tenir un paper en la protecció a nivell de la mucosa (Lindesmith et al., 2003). També s'ha demostrat que la “*herd immunity*” (immunitat de rebany o col·lectiva) és una força impulsora per a l'evolució GII.4 en la població humana, i pot existir que els patrons complexos de la protecció creuada entre els diferents genotips de NoV (Cannon et al., 2009). Per tant, calen més esforços per aclarir els mecanismes immunes que indueixen protecció contra les infeccions per NoV per tal de dissenyar i desenvolupar possibles vacunes potencials.

RESULTATS IV:

**Diferent susceptibilitat a les
infeccions per NoV**

4.4. DIFERENT SUSCEPTIBILITAT A LES INFECCIONS PER NOROVIRUS SEGONS ELS PATRONS D'HBGAs ESPECÍFICS MITJANÇANT L'ESTUDI D'UN BROT NATURAL DE GEA

En gener de l'any 2012 va tindre lloc un brot de GEA, provocat per NoV, dins d'una família formada per 9 membres. D'aquests, 6 estagueren en contacte amb la font d'infecció, però sols 3 presentaren els símptomes típics d'una infecció per NoV (diarrees, vòmits, dolors abdominals, febra i malestar general). De manera que va ser una bona ocasió per a poder estudiar la diferent susceptibilitat que presenten les persones davant aquest tipus d'infeccions víriques. Un dels membres era un nadó de 6 mesos i es va excloure de l'estudi. Es van recollir mostres de femta de dos de les persones afectades, per tal de determinar la variant de NoV que havia produït la infecció, i una d'un dels individus que no mostraren cap símptoma per tal de determinar si també havien sigut infectats, però no havien desenvolupat els símptomes, o simplement no s'havien infectat. A banda, també s'arreglaren mostres de saliva de quasi tots els membres de la família (i 16 mostres més de salives d'individus sans per tal de fer una comparació), i mostres de sèrum als 14 dies (sèrum convalescent) i un any (sèrum memòria) post-infecció per tal d'analitzar i estudiar el títol d'anticossos IgG específics de NoV i, analitzar la capacitat bloquejant dels mateixos.

4.4.1. El brot de GEA va ser causat per la variant GII.4-2010 de NoV

Durant el mes de gener del 2010, tres dels membres d'una família (3/9, 33'3%) de València mostraren els típics símptomes d'una GEA per NoV a les 24 h d'estar en contacte amb la persona portadora, de manera que es tractava d'un brot de NoV transmés pel consum d'algun aliment contaminat (no identificat) i després propagat pel contacte persona-persona. Aquesta transmissió es va veure facilitada per ser una finca familiar de 3 pisos on habitava dita família. Els símptomes més comuns van ser diarrea i vòmits amb febra superior als 38°C. La duració d'aquests va ser d'aproximadament 48 h i un dels afectats va tindre que acudir a urgències per deshidratació.

Els anàlisis de RT-PCR de les mostres de femta recollides (n=3), dos d'individus simptomàtics i altra d'un asimptomàtic, revelaren que el brot estava causat per un NoV de GII.4, concretament la variant GII.4-New Orleans_2009 (GII.4-2010). A més, com no es va detectar cap altre virus entèric (rotavirus o adenovirus) o bactèria enteropatògena en les mostres analitzades, es va poder concloure que, efectivament, l'agent etiològic d'aquest brot va ser NoV.

4.4.2. Els individus no secretors (sese) no presentaren símptomes davant la infecció per NoV GII.4-2010

El genotipat (gen *FUT2*, que determina l'estat secretor) i fenotipat (tipus d'antígens Le expressats) de les mostres de saliva recollides es va realitzar en un estudi anterior (apartat 4.2 de *Resultats*).

Atenent a l'estat secretor, el 25% (2/8) dels membres d'aquesta família eren secretors homozigots (SeSe), el 50% (4/8) secretors heterozigots i la resta, 25% (2/8), no secretors. Els individus secretors presentaven un fenotip d'antígens Lewis $Le^{a+}Le^{b+}/Le^{x-}Le^{y+}$ i els no secretors, el fenotip típic de no secretor, $Le^{a+}Le^{b-}/Le^{x+}Le^{y-}$. Dels 3 individus que presentaren símptomes, dos eren secretors homozigots i de grup sanguini tipus A, i l'altre era heterozigot (Sese) de grup sanguini O. L'individu no secretor, a pesar d'estar infectat, com ho va demostrar la presència de NoV present en la femta recollida, no va presentar cap símptoma. La resta de secretors, excepte un (JIO), no va estar en contacte amb la font d'infecció. A la taula 16 s'especifica l'estat secretor, el grup sanguini i el fenotip d'antígens Lewis de cada individu de la família afectada remarcats en un quadre roig.

4.4.3 Els nivells d'anticossos IgA, tant en mostres de saliva com de sèrum, en individus secretors i no secretors, no mostren diferències significatives.

La resposta d'anticossos IgA salivars als 4 antígens utilitzats (VLPs de GII.4-2006b, GII.4-1999, GII.4-2004 i GI.1) va ser positiva en totes les mostres de saliva, encara que existia una xicoteta diferència entre els nivells d'IgA secretora entre els dos grups analitzats: secretors i no secretors. Els valors d'OD a una dilució 1/20 foren entre 0'5 i 1'5 en tots els casos, excepte per a 2 dels 10 secretors i per a un dels no secretors que mostraren de forma significativa nivells un poc més alts. En canvi, a dilucions més elevades (1:160,

OD < 0.5) no s'apreciava cap diferència entre aquests nivells d'IgA entre secretors i no secretors (Fig. 4.23).

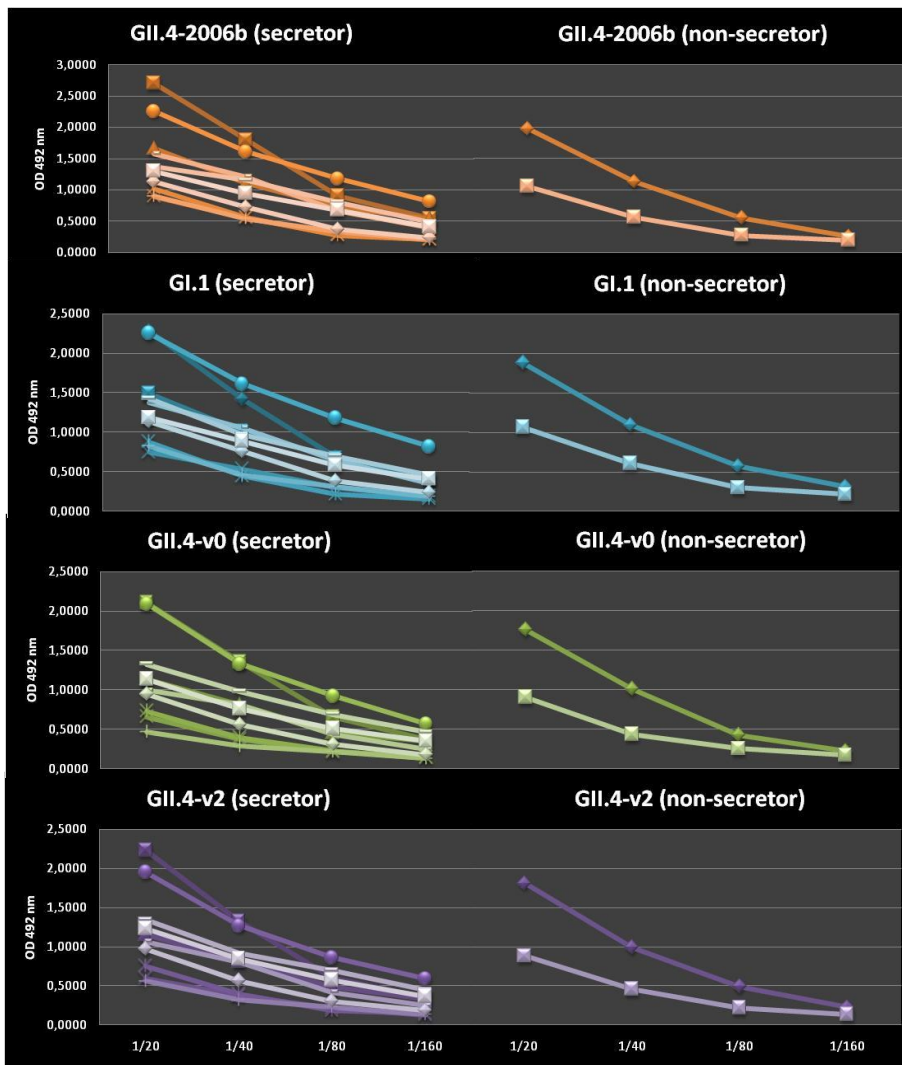


Figura 4.23. Nivells específics d'anticossos de classe IgA contra 4 variants diferents de VLPs de NoV (GI.1, GII.4-2006b, GII.4-v0 i GII.4-v2) presents en mostres de saliva de 9 individus secretors i 2 no secretors, mitjançant assaigs d'ELISA. Les plaques se sensibilitzaren amb dilucions seriades de les salives (1/20 - 1/160).

De les 12 mostres de saliva incloses en aquest assaig, el 75% (9/12) estaven implicades en el brot de GEA i, d'aquests, 3 presentaren els nivells d'IgA salivar més elevats. A més, un d'ells pertanyent al grup de no secretors, indicant que aquests individus també són susceptibles a les infeccions per NoV, però no manifesten els símptomes clínics que caracteritzen l'enfermetat.

4.4.4. Titulació dels sèrums convalescents del brot de GEA als 14 dies i a l'any post-infecció

Els sèrums recollits als 14 dies post-infecció es consideraren sèrums convalescents i els recollits a l'any sèrums memòria. Durant l'any de diferència de recollida d'aquests no es va reportar cap episodi de GEA més, sols un dels membres va mostrar un quadre de gastroenteritis, però no es va estudiar l'etiologia. Dels 9 membres de la família afectada es recolliren un total de 5 sèrums i es compararen amb altre sèrum d'un pacient convalescent per un cas esporàdic d'infecció per NoV, que es va utilitzar com a control positiu. D'aquests 5 dos corresponien a 2 dels 3 secretors que mostraren símptomes (POP i NCV), un al no secretor (VIV) infectat però sense manifestació dels símptomes, un a un dels secretors que va estar en contacte amb el virus però no es va infectar (JIO) i l'altre a un individu secretor homozigot que es va utilitzar com a control negatiu.

Al laboratori no es disposava de la variant de VLP causant del brot de GEA en aquesta família (GII.4-2010), de manera que es va analitzar la reactivitat davant les VLPs i partícules P de què es disposaven: VLPs de GI.1, GII.4-2006b, GII.4-1999 i GII.4-2004, i

P-GII.4-VA387, P-GI.1 i domini P-GII.4-2007. Encara que per tal de simplificar l'anàlisi sols es mostren les dades obtingudes amb la variant de VLPs GII.4-2006b, que presenta un percentatge d'homologia amb la variant 2010 del 93,66%.

Dels sèrums convalescents analitzats, tots presentaven títols d'anticossos superiors a 100 per a la variant GII.4 utilitzada, però s'observava una clara diferència entre els sèrums de secretors i el sèrum de no secretor (Fig. 4.24 i Taula 18). Els títols d'anticossos IgG anti-NoV eren de 12.800 i els més elevats del grup d'anàlisi per a les dos persones infectades que presentaren símptomes, tant en el sèrum convalescent (14 dies) com en el sèrum memòria (1 any), independentment de si eren homo o heterozigotes per a la mutació del gen *FUT2* (marcades amb un arretisc). La resta d'individus secretors (incloent el control negatiu) presentaven títols molt menors, que correspondrien probablement a infeccions anteriors per NoV del mateix o de diferent genotip. Un d'ells, a l'any, va augmentar lleugerament el seu títol, degut possiblement a un nou episodi de GEA durant l'any d'estudi, com s'ha comentat anteriorment. El sèrum del no secretor no va experimentar cap variació a pesar d'estar en contacte amb el virus, presentant el títol més baix, pràcticament inexistent, inclús comparant-lo amb el control negatiu.

Per a la resta de variants el comportament era similar en la majoria dels casos. Tots els sèrums presentaren títols d'anticossos elevats per a les variants de GII.4 i títols pràcticament inexistent per a GI.1, excepte en el sèrum d'un dels secretors (JIO) que ocorria el

contrari, títols molt baixos per a GII.4 i relativament elevats per a GI.1.

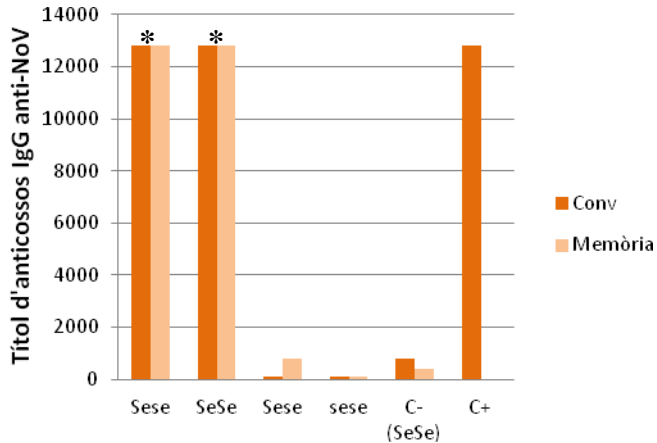


Figura 4.24. Títol d'anticossos IgG anti-NoV d'un brot de GEA entre membres d'una mateixa família (n=5). Es van recollir els sèrums de 4 membres afectats d'un brot de GEA (i d'un altre individu que no havia estat afectat pel brot per tal d'utilitzar-lo com a control negatiu) als 14 dies i a l'any post-infecció, es va sensibilitzar una placa d'ELISA amb la variant GII.4-2006b de NoV i es va determinar el títol d'anticossos, atenent a l'estat secretor (Sese o SeSe) o no secretor (sese). Els dos membres infectats que presentaren símptomes estan marcats amb un asterisc. El control positiu correspon a un sèrum convalescent d'altre brot independent.

4.4.5. Bloqueig de la unió de les VLPs i partícules P a saliva mitjançant els sèrums convalescents

Les salives de tots els individus secretors, però no dels no secretors, uniren totes les variants de VLPs que es van utilitzar en l'estudi, mentre que no es va observar cap unió quan es van utilitzar les diferents variants de partícules P tal i com s'ha demostrat en l'apartat 4.2 de *Resultats*. De manera que es va analitzar la capacitat de bloqueig, tant dels sèrums convalescents com dels sèrums

memòria, de la unió sols de les VLPs a saliva d'un individu secretor i de grup sanguini O, encara que com en el cas anterior sols es mostren els resultats obtinguts amb la variant GII.4-2006b.

Com era d'esperar, els sèrums de persones secretores foren capaços de bloquejar la unió als receptors presents en la saliva de forma eficient, arribant-se quasi a un 70% en alguns dels casos (Fig. 4.25). Aquest percentatge de bloqueig més elevat es va aconseguir amb el sèrum d'un dels secretors que no havia estat afectat pel brot (és el que es va utilitzar com a control negatiu) i contenia un títol d'anticossos IgG anti-NoV relativament baix, si es compara amb el títol de les persones que presentaren símptomes (800 / 12800). En canvi no es va poder observar cap signe de bloqueig utilitzant el sèrum de la persona no secretora. Per altra banda, es va obtenir una altra dada curiosa, ja que tampoc es va aconseguir bloquejar la unió de les VLPs a la saliva utilitzant un dels sèrums de secretors, marcat amb un requadre taronja en la figura 4.25. Els resultats amb els sèrums memòria no es mostren ja que pràcticament es va obtenir el mateix percentatge de bloqueig que amb els corresponents sèrums convalescents.

Per a la resta de variants, també es va observar bloqueig, inclús un percentatge més elevat en el cas de la variant GII.4-v2, excepte per a GI.1, a pesar de que un dels sèrums presentava un títol d'anticossos elevat per a aquesta variant (resultats no mostrats).

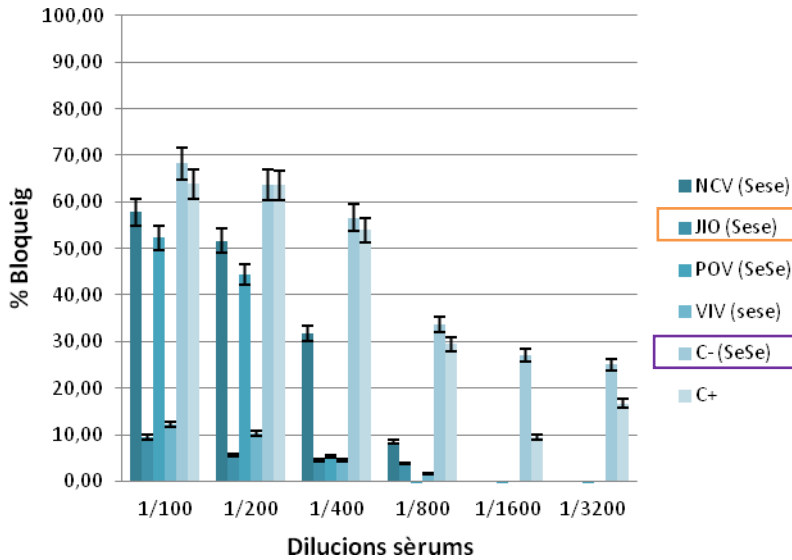


Figura 4.25. Bloqueig de la unió de les VLPs GII.4-2006b a saliva de secretor mitjançant sèrums convalescents (14 dies post-infecció) d'un brot per NoV. A la figura es representa el percentatge de bloqueig de cada sèrum, secretors (SeSe i Sese) i no secretor (sese), que s'ha obtingut en cada dilució de sèrum utilitzada. L'assaig de bloqueig es va realitzar mitjançant la tècnica ELISA sensibilitzant la placa amb saliva i preincubant les VLPs amb les diferents dilucions dels sèrums. El sèrum de secretor (JIO) que no va ser capaç de bloquejar aquesta unió està remarcat amb un requadre taronja, i el sèrum que va presentar el percentatge de bloqueig més alt (C-), que és el que es va utilitzar com a control negatiu en l'assaig anterior de titulació, amb un requadre morat.

En la taula 18 es poden observar tots els resultats obtinguts al laboratori després de l'anàlisi de les mostres de sèrums i de femta recollides en el brot de GEA provocat per un NoV de genotip GII.4.

Resultats IV

Taula 18. Resultats obtinguts amb les mostres recollides després d'un brot per NoV GII.4.

Individu	RT-PCR NoV	Títol IgG sèrica post-infecció		% Bloqueig
		14 dies	1 any	14 dies
NCV (Sese)	Positiva	12800	12800	57,78
POV (SeSe)	Positiva	12800	12800	52,25
JIO (Sese)	-	100	800	9,50
VIV (sese)	Positiva	100	100	12,25
C- (SeSe)	-	800	400	68,25

DISCUSSIÓ

Els NoV de GII.4 són els principals causants de brots de GEA en el món sencer, emergint noves variants antigèniques cada 2 anys aproximadament, seguint un mecanisme paregut al de l'evolució del virus de la grip A (Koelle et al., 2006; Lindesmith et al., 2008; Bull et al., 2010;).

En aquest estudi s'ha descrit un brot provocat per NoV de GII.4, concretament per la variant New Orleans_2009 (GII.4-2010), que ha afectat a una mateixa família formada per 9 membres, dels quals uns s'han infectat i altres no, i dels que s'han infectat, uns han desenvolupat els símptomes típics per una GEA i altres no. De manera que es van realitzar assaigs, tant amb les salives com amb els sèrums recollits dels diferents membres de la família, per a intentar estimar la resposta que tenia lloc després d'una infecció natural per NoV en humans, en contrast amb la majoria d'estudis anteriors que utilitzen voluntaris que són infectats amb diferents dosis de virus, aïllats a partir de filtrats d'excrements d'individus infectats (Parrino et al., 1977; Johnson et al., 1990; Reeck et al., 2010). A més, també es va estudiar la relació antigènica dels sèrums convalescents entre les diferents variants GII.4 i GI.1 de les que es disposava al laboratori, per tal de comparar les diferències d'antigenicitat mitjançant ELISA, i dur a terme assaigs de neutralització.

Els assaigs es van realitzar amb la variant de VLPs de NoV de GII.4-2006b que mostra un 93,66% d'homologia amb la variant

causant del brot, ja que no es disposava d'aquestes VLPs. Aquesta variant GII.4-2006b, com s'ha comprovat en l'apartat de resultats 4.2.2, s'inclou dins del grup que depèn de l'estat secretor, unint-se a saliva de tots els secretors independentment del grup sanguini ABO o del fenotip Lewis, disposant així d'una àmplia especificitat de receptors (Huang et al., 2003). Atenent als resultats obtinguts, on sols els membres secretors que han estat en contacte directe amb el virus han desenvolupat l'enfermetat i mostrat els símptomes, es podria dir que la variant GII.4-2010 segueix el mateix patró que la variant GII.4-2006b i també es podria classificar dins del mateix grup.

Els NoV són virus entèrics, per tant, al tractar-se d'un virus gastrointestinal, la seua via d'entrada principal és l'oral, sent la primera barrera de protecció de què disposen els humans la immunitat de les mucoses. L'anàlisi dels nivells d'anticossos IgA salivars mostraren que, a dilucions baixes, existia un augment en aquells individus que havien estat infectats, tant en les dos persones secretores com en la no secretora. Aquest fet indica que l'individu no secretor també es va infectar, com també es va corroborar per la detecció de NoV en els seus excrements, però com s'ha demostrat en altres estudis no arriben a desenvolupar l'enfermetat (Rockx et al., 2005; Lindesmith et al., 2005). Tot i que la presència d'anticossos IgA específics són un bon indicador de protecció per a diversos virus que infecten mucoses (Morokutti et al., 2014; Lappalainen et al., 2014), no sembla que aquí ho siga per als NoVs, degut a l'elevada variabilitat antigènica que presenten aquests virus i a l'aparició de variants que escapen a la

neutralització produïda per aquests anticossos (Lindesmith et al., 2003, 2005).

Tots els membres infectats per aquesta variant de NoV, però no els membres no infectats, van produir una resposta d'IgG sérica anti-NoV molt notable, el que indica que la infecció, no només l'exposició, és essencial per a l'activació d'una resposta d'IgG anti-NoV GII.4 en sèrum, tal i com es va descriure per a la variant Norwalk (GI.1) (Lindesmith et al., 2003). A més, aquesta IgG induïda durant la infecció va ser capaç de reaccionar de forma creuada amb altres variants de GII però no de GI, recolzant conclusions anteriors d'estudis previs (Jiang et al., 1995; Noel et al., 1997).

L'estudi del títol d'anticossos sèrics anti-NoV tipus IgG va mostrar que les persones secretores infectades presentaren els títols més elevats, tant en la fase convalescent com en la fase memòria, en contrast amb la persona no secretora, que significativament presentava un títol molt baix o pràcticament inexistent. Aquests títols, com era d'esperar, es correlacionaren amb elevats percentatges de bloqueig de la unió de les VLPs de NoV a saliva, en el cas dels secretors, o de cap signe de bloqueig en el cas del no secretor. Resultats que estan d'acord amb estudis anteriors com per exemple el realitzat per Frenck i col. en el 2012 (Frenck et al., 2012). En aquest estudi, els autors mostren una seroconversió de fins 4 vegades major 30 dies després de la inoculació del virus, tant en el títol d'anticossos IgG específics de NoV com en la capacitat de bloqueig dels mateixos.

Dels 5 sèrums analitzats, comptant el control negatiu, 4 corresponien a secretors i sols un a no secretor, i dels secretors dos s'infectaren i manifestaren l'enfermetat. D'aquests dos individus, un era secretor homozigot i l'altre heterozigot, i no es va trobar cap diferència ni en el títol d'anticossos ni en la reactivitat ni en la prevalència. Aquest fet suggereix que sols la presència d'una còpia funcional del gen *FUT2* és suficient per a què l'individu siga susceptible a infectar-se per NoV GII.4. Dita observació està en concordància amb dades obtingudes a partir d'infeccions clíniques que han demostrat que tant individus homo com heterozigots són susceptibles a virus que s'engloben dins del grup que depenen de l'estat secretor (Thorven et al., 2005).

Els dos sèrums de secretors restants mostraren un comportament diferent a la resta i a la vegada cridaner. El que es va utilitzar com a control negatiu va presentar un títol d'anticossos relativament baix en comparació al títol dels secretors infectats, en canvi, va ser el sèrum que va presentar un percentatge de bloqueig més elevat. Una possible explicació podria ser que al sensibilitzar la placa amb les VLPs, aquestes canviaren un poc la seua conformació, i al tractar-se de reactivitat creuada entre genotips, els anticossos específics de NoV no serien capaços de reconèixer-les. Mentre que en la preincubació, a l'estar en dissolució no hi hauria cap modificació de la partícula i el reconeixement no es voria afectat. L'altre sèrum va presentar títols d'anticossos baixos per a les variants de NoV de GII.4, però relativament elevats per a GI.1 i, a pesar d'açò, no es va observar cap

bloqueig en ninguna de les variants utilitzades. De forma ideal, els experiments haurien d'haver-se fet amb la VLP corresponent a la mateixa variant de NoV, de manera que els resultats obtinguts amb aquest individu es degueren a què no es van produir anticossos amb capacitat de reactivitat creuada. A més, encara que es tracte d'un secretor positiu, no va desenvolupar els símptomes de la malaltia, per tant, la seva exposició al virus va ser menor i la resposta immune més baixa com si d'un secretor negatiu es tractés. Aquest individu es troba dins de la població descrita com a "susceptible" i és estrany que no s'infectara després del brot, fet que suggereix que una resposta immune de memòria o algun altre factor no identificat també podria oferir protecció davant la infecció per NoV. Com s'ha discutit en apartats anteriors, aquests resultats també reforcen la idea de què els HBGAs no siguin els únics receptors dels NoV, i si bé per a algunes variants són necessaris perquè es produeixi la infecció, no són suficients perquè la mateixa tinga lloc.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts al llarg de l'estudi, es poden extraure les següents conclusions:

1. El sistema d'expressió de baculovirus recombinants en cèl·lules d'insecte Sf9 i l'expressió de proteïnes recombinants en bacteries *E. coli* dona lloc a la producció de VLPs i partícules P de NoV, respectivament, que mantenen tant les característiques estructurals com funcionals de les proteïnes natives.

2. L'AcMo 3C3G3 obtingut de un ratolí immunitzat amb les VLPs de NoV GII.4-2006b reconeix tant les VLPs de la variant inoculada com el domini P de la variant GII.4-2007 en ELISA, mentre que també reconeix les variants GII.4-v0 (GII.4-1999) i GII.4-v2 (GII.4-2004) en Western blot.

3. L'AcMo 3C3G3 anti-NoV reconeix un epítop conformacional format per 11 aminoàcids situats en el subdomini P2 de la proteïna VP1 de la càpside de NoV, prop dels llocs antigènics prèviament descrits.

4. L'AcMo av0 (desenvolupat front a la variant GII.4-1999) reconeix tant les VLPs de la variant homòloga com les partícules P de la variant GII.4-VA387 (97,88% d'identitat), corroborant que les partícules P són antigènicament comparables a les VLPs completes.

5. El reconeixement de les partícules P-GII.4-VA387 i de la P-GII.9 però no de la P-GI.1, per part del antisèrum de conill desenvolupat a la *Health Protection Agency* (HPA, Colindale), demostra que aquestes, a banda de posseir epítops específics de variant, també contenen epítops reactius entre genotips, però no entre genogrups.

6. Els diferents genotips i genogrups de NoV mostren diferents patrons d'unió a saliva determinats pels antígens histosanguinis (HBGAs), l'estat secretor i el grup sanguini ABO.

7. Els AcMo anti-NoV utilitzats són capaços de bloquejar la unió de les VLPs, de forma dependent de la concentració, tant a saliva com a PGM i a cèl·lules D-Caco-2.

8. Els AcMo específics anti-HBGAs humans utilitzats bloquegen la unió de les VLPs a saliva. En canvi, en les cèl·lules D-Caco-2, no afecten aquesta unió ni s'observa cap co-localització entre els HBGAs i les VLPs, suggerint que en la unió també participen altres receptors diferents dels HBGAs.

9. L'elevada prevalença d'anticossos IgG sèrics en la població de València indica que les infeccions/reinfeccions per NoV de genotip GII.4 són molt freqüents i es produeixen a edats molt temperanes.

10. La infecció natural per NoV provoca una resposta immune humoral constituïda per anticossos sèrics de classe IgG capaços de bloquejar la unió de diferents genotips de VLPs de NoV a saliva.

11. Els nivells d'anticossos IgA anti-NoV, tant en mostres de saliva com de sèrum, en individus secretors i no secretors, no mostraren diferències durant un brot familiar de 9 individus.

6. CONCLUSIONS (English)

6. CONCLUSIONS

The following conclusions have been drawn from the present study:

1. The expression of recombinant NoV capsid protein by baculoviruses in Sf9 insect cells and by *E. coli*, gives rise to the production of NoV VLPs and P particles, respectively, which maintain both the structural and functional features of the native proteins.

2. Monoclonal antibody 3C3G3 obtained immunizing mice with NoV VLPs GII.4-2006b variant, recognizes by ELISA the inoculated VLPs and the GII.4-2007 P domain, and also by Western blot the GII.4-v0 (GII.4-1999) and the GII.4-v2 (GII.4-2004) variants.

3. The anti-NoV mAb 3C3G3 recognizes a conformational epitope consisting of 11 amino acids located within the P2 subdomain of the NoV VP1 capsid protein, close to the antigenic region previously described.

4. The av0 mAb (developed against GII.4-1999 variant) recognizes both the homologous VLP variant and the GII.4 VA387 variant P particle (with a 97.88% identity), confirming that the P particles are antigenically similar to the complete VLPs.

5. P-GII.4-VA387 and P-GII.9 particles, but not P-GI.1, are recognized by the rabbit antiserum developed in the Health Protection Agency (HPA, Colindale), demonstrating that P particles contain, in

Conclusions

addition to variant-specific epitopes, inter-genotype-specific epitopes, but not cross-reactive genogroup-specific epitopes.

6. Various NoV genotypes and genogroups show different saliva binding patterns determined by histo-blood group antigens (HBGAs), the secretor status and the ABO blood group.

7. The anti-NoV mAbs assayed are able to block VLP binding to saliva, in a concentration-dependent manner, as well as to PGM and D-Caco-2 cells.

8. The human specific anti-HBGA mAbs block the VLP binding to saliva. In contrast, they do not affect their binding to D-Caco-2 cells. HBGAs and VLPs do not co-localized by immunofluorescence assays, suggesting that VLP binding to receptors other than HBGAs is feasible.

9. The high prevalence of serum IgG antibodies in the Valencian population suggests that infections / reinfections by NoV GII.4 genotype are very common and occur at very early ages.

10. NoV natural infection elicits a humoral immune response consisting of serum IgG antibodies capable of blocking the binding of different NoV genotype VLPs to saliva.

11. The NoV-specific-IgA antibody levels, in both saliva and serum, were similar among secretor and non-secretor individuals involved in a domestic norovirus outbreak.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- Adler JL and Zickl R. (1969). Winter vomiting disease. *J. Infect. Dis.* 119(6):668-73.
- Agus SG, Dolin R, Wyatt RG, Tousimis AJ, and Northrup RS. (1973). Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Ann. Intern. Med.* 79(1):18-25.
- Agus SG, Falchuk ZM, Sessoms CS, Wyatt RG, and Dolin R. (1974). Increased jejunal IgA synthesis in vitro during acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Am. J. Dig. Dis.* 19(2):127-31.
- Allen DJ, Gray JJ, Gallimore CI, Xerry J, and Iturriza-Gómara M. (2008). Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS One* 3(1):e1485.
- Allen DJ, Noad R, Samuel D, Gray JJ, Roy P, and Iturriza-Gómara M. (2009). Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding. *Viol. J.* 6:150.
- Amano J, and Oshima M. (1999). Expression of the H type 1 blood group antigen during enterocytic differentiation of Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 274(30):21209-16.
- Amar CF, East CL, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, and McLaughlin J. (2007). Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993–1996). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26(5):311-23.

- Arana A, Montes M, Piñeiro LD, Gomariz M, Zapico MS, Cilla G, and Pérez-Trallero E. (2013). Human norovirus in Gipuzkoa. From Minerva variant in 2009 to Sydney variant in 2012. Comunicació P-196 en el XII Congrés Nacional de Virologia, Burgos 2013.
- Atmar RL and Estes MK. (2001). Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:15-37, CP1, CP2.
- Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH and Graham DY. (2008). Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg. Infect. Dis.* 14(10):1553-57.
- Ball JM, Hardy ME, Atmar RL, Conner ME, and Estes MK. (1998). Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J. Virol.* 72:1345-53.
- Ball JM, Graham DY, Opekun AR, Gilger MA, Guerrero RA, and Estes MK. (1999). Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase 1 study. *Gastroenterology* 117:40-48.
- Baric RS, Yount B, Lindesmith L, Harrington PR, Greene SR, Tseng FC, Davis N, Johnston RE, Lklapper DG, and Moe CL. (2002). Expression and self-assembly of Norwalk virus capsid protein from venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J. Virol.* 76:3023-30.
- Baron RC, Greenberg HB, Cukor G, and Blacklow NR. (1984). Serological responses among teenagers after natural exposure to Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* 150(4):531-34.
- Beards GM, Brown DW, Green J, and Flewett TH. (1986). Preliminary characterisation of torovirus-like particles of

- humans: comparison with Berne virus of horses and Breda virus of calves. *J. Med. Virol.* 20(1):67-78.
- Becker KM, Moe CL, Southwick KL, and MacCormack JN. (2000). Transmission of Norwalk virus during football game. *N. Engl. J. Med.* 343(17):1223-27.
- Beller M, Ellis A, Lee SH, Drebot MA, Jenkerson SA, Funk E, Sobsey MD, Simmons OD, Monroe SS, Ando T, Noel J, Petric M, Middaugh JP, and Spika JS. (1997). Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. *JAMA* 278(7):563-68.
- Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang K, McPhie P, and Green KY. (2008). Nucleotidylation of the VPg protein of a human norovirus by its proteinase-polymerase precursor protein. *Virology* 374:33-49.
- Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, and Whittaker GR. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4(6):1011-33.
- Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BVV, and Estes MK. (2002). Structural requirements for the assembly of Norwalk-like particles. *J. Virol.* 76:4044-55.
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, and Estes MK. (2003). The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: a Novel Function for the VP2 Protein. *J. Virol.* 77:11603-15.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, and Ruck BJ. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral enteritis. *Lancet* 2(7841):1281-83.
- Blacklow NR, Cukor G, Bedigian MK, Echeverria P, Greenberg HB, Schreiber DS, and Trier JS. (1979). Immune response and

- prevalence of antibody to Norwalk enteritis virus as determined by radioimmunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 10(6):903-9.
- Blanton LH, Adams SH, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA, Glass RI, and Monroe SS. (2006). Epidemiologic and molecular trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J. Infect. Dis.* 193(3):413-21.
- Boga JA, Melon S, Nicieza I, De Diego I, Villar M, Parra F, et al. (2004). Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in Asturias, Spain, and genotyping and characterization of norovirus strains involved. *J. Clin. Microbiol.* 42(6):2668-74.
- Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, Mitra T, Sosnovtsev SV, Kapikian AZ, and Green KY. (2009). Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J. Virol.* 83(22):11890-901.
- Bosch A. (1998). Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int. Microbiol.* 1(3):191-6.
- Bosch A, Pinto R, and Abad FX. (2006). Survival and transport in the environment. En "*Viruses in Food*". 1st ed. (Goyal, S. M., ed.). New York: Springer; 151-87.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, and Black RE. (2005). WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 365(9465):1147-52.
- Bu W, Mamedova A, Tan M, Xia M, Jiang X, and Hegde RS. (2008). Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus. *J. Virol.* 82(11):5340-7.
- Bublil EM, Freund NT, Mayrose I, Penn O, Roitburd-Berman A, Rubinstein ND, Pupko T, and Gershoni JM. (2007). Stepwise

- prediction of conformational discontinuous B-cell epitopes using the Mapitope algorithm. *Proteins* 68(1):294-304.
- Bucardo F, Lindgren PE, Svensson L, and Nordgren J. (2011). Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. *PLoS One* 6(10):e25962.
- Buesa J, Collado B, López-Andújar P, Abu-Mallouh R, Rodríguez Díaz J, García Díaz A, Prat J, Guix S, Llovet T, Prats G, and Bosch A. (2002). Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40(8):2854-59.
- Buesa J, Montava R, Abu-Mallouh R, Fos M, Ribes JM, Bartolomé R, Vanaclocha H, Torner N, and Domínguez A. (2008). Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *J. Med. Virol.* 80(7):1288-95.
- Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, and White PA. (2006). Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44(2):327-33.
- Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, and White PA. (2010). Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog.* 6(3):e1000831.
- Burroughs JN, and Brown F. (1978). Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J. Gen. Virol.* 41:443-46.
- Butot S, Putallaz T, and Sánchez G. (2008). Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *Int. J. Food Microbiol.* 126(1-2):30-5.

Bibliografía

- Butot S, Putallaz T, Amoroso R, and Sánchez G. (2009). Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(12):4155-61.
- Cannon JL, Lindesmith LC, Donaldson EF, Saxe L, Baric RS, and Vinjé J. (2009). Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J. Virol.* 83(11):5363-74.
- Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, Zhang Z, Zhang Xuejun C, Jiang X, Li X, and Rao Z. (2007). Structural Basis for the Recognition of Blood Group Trisaccharides by Norovirus. *J. Virol.* 81:5949-57.
- Carruyo GM, Mateu G, Martínez LC, Pujol FH, Nates SV, Liprandi F, and Ludert JE. (2008). Molecular characterization of porcine picobirnaviruses and development of a specific reverse transcription-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 46(7):2402-5.
- Cascio A, Bosco M, Giammanco A, Ferraro D, and Arista S. (1996). Identification of picobirnavirus from feces of Italian children suffering from acute diarrhea. *Eur. J. Epidemiol.* 12:545-47
- Caul EO, Paver WK, and Clarke SK. (1975). Letter: Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis. *Lancet* 1(7917):1192.
- Centers for Disease Control and Prevention and National Center for Health Statistics. (1999). National Nursing Home Survey. Selected years (1973-1999). Disponible en URL: <<http://www.cdc.gov/nchs/data/nnhsd>>.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2005). Norovirus outbreak among evacuees from hurricane Katrina-Houston, Texas, September 2005. *MMWR* 54(40):1016-18.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2007). Norovirus activity--United States, 2006--2007. *MMWR* 56:842-46.

- Centers for Disease Control and Prevention. (2009). Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States. *MMWR* 58:609-15.
- Chachu KA, LoBue AD, Strong DW, Baric RS, and Virgin HW. (2008). Immune mechanisms responsible for vaccination against and clearance of mucosal and lymphatic norovirus infection. *PLoS Pathog.* 4(12):e1000236.
- Chadwick PR, Beards G, Brown D, Caul EO, Cheesbrough J, Clarke I, et al. (2000). Management of hospital outbreaks of gastroenteritis due to small roundstructured viruses. *J. Hosp. Infect.* 45(1):1-10.
- Chakravarty S, Hutson AM, Estes MK, and Prasad BV. (2005). Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J. Virol.* 79:554-68.
- Chandra R. (1997). Picobirnavirus, a novel group of undescribed viruses of mammals and birds: a minireview. *Acta Virol.* 41(1):59-62.
- Chen R, Neill JD, Noel JS, Hutson AM, Glass RI, Estes MK, and Prasad BV. (2004). Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J. Virol.* 78(12):6469-79.
- Chen R, Neill JD, Estes MK, and Prasad BV. (2006). X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(21):8048-53.
- Choi JM, Hutson AM, Estes MK, and Prasad BV. (2008). Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105(27):9175-80.

- Cliver DO, Matsui SM, and Casteel M. (2006). Infections with viruses and prions. En “*Foodborne infections and intoxications*”. 3rd ed. (Rienmann, H. P., Cliver, D. O., eds). Amsterdam: Elsevier; 367-448.
- Cowden JM. (2002). Foodborne infectious risks: do we need a wide system of data collection and survey? The lessons learned from the study of infectious intestinal disease in England. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 50(1):89-92.
- Coyne KP, Jones BR, Kipar A, Chantrey J, Porter CJ, Barber PJ, Dawson S, Gaskell RM, and Radford AD. (2006). Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet. Rec.* 158(16):544-50.
- Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, and Estes MK. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 68:5945-52.
- Cukor G, Nowak NA, and Blacklow NR. (1982). Immunoglobulin M responses to the Norwalk virus of gastroenteritis. *Infect. Immun.* 37(2):463-68.
- da Silva AK, Le Saux JC, Parnaudeau S, Pommepey M, Elimelech M, and Le Guyader FS. (2007). Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(24):7891-97.
- Dale GE, Schönfeld HJ, Langen H, and Stieger M. (1994). Increased solubility of trimethoprim-resistant type S1 DHFR from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* cells overproducing the chaperonins GroEL and GroES. *Protein Eng.* 7(7):925-31.
- Dai YC, Nie J, Zhang XF, Li ZF, Bai Y, Zeng ZR, Yu SY, Farkas T, and Jiang X. (2004). Seroprevalence of antibodies against

- noroviruses among students in a Chinese military medical university. *J. Clin. Microbiol.* 42(10):4615-19.
- Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, and Hardy ME. (2003) The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* 22:2852-59.
- Daughenbaugh K, Wobus C, and Hardy M. (2006) VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Viol. J.* 3:33.
- de Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, and Cattoli G. (2011) Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect. Genet. Evol.* 11(7):1529-44.
- de Rougemont A, Ruvoen-Clouet N, Simon B, Estienney M, Elie-Caille C, Aho S, Pothier P, Le Pendu J, Boireau W, and Belliot G. (2011). Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J. Virol.* 85(9):4057-70.
- Debbink K, Donaldson EF, Lindesmith LC, and Baric RS. (2012). Genetic mapping of a highly variable norovirus GII.4 blockade epitope: potential role in escape from human herd immunity. *J. Virol.* 86:1214-26.
- Debbink K, Lindesmith LC, and Baric RS. (2014). The state of norovirus vaccines. *Clin. Infect. Dis.* [Epub ahead of print]
- Desai R, Hembree CD, Handel A, Matthews JE, Dickey BW, McDonald S, Hall AJ, Parashar UD, Leon JS, and Lopman B. (2012). Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review. *Clin. Infect. Dis.* 55(2):189-93.

- di Martino B, and Marsilio F. (2010). Feline calicivirus VP2 is involved in the self-assembly of the capsid protein into virus-like particles. *Res. Vet. Sci.* 89(2):279-81.
- Dimitrov DH, Dashti SA, Ball JM, Bishbishi E, Alsaied K, Jiang X, and Estes MK. (1997). Prevalence of antibodies to human caliciviruses (HuCVs) in Kuwait established by ELISA using baculovirus-expressed capsid antigens representing two genogroups of HuCVs. *J. Med. Virol.* 51(2):115-18.
- Dolin R, Levy AG, Wyatt RG, Thornhill TS, and Gardner JD. (1975). Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. *Am. J. Med.* 59:761-68.
- Dong J, Dong L, Méndez E, and Tao Y. (2011). Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(31):12681-86.
- Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, and Koopmans M. (2004). Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8):4538-43.
- Estes MK, and Cohen J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev* 53(4):410-49.
- Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger M, Pacheco SS, and Graham DY. (2000). Norwalk virus vaccines: Challenges and progress. *J. Infect. Dis.* 181 Suppl. 2:S367-S373.
- Estes M, and Kapikian A. (2007). Rotaviruses. *In Fields Virology*, 5th edn. Edited by Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins; 1917-74.
- Ettayebi K, and Hardy ME. (2003). Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-

- A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Virol.* 77:11790-97.
- Evans MR, Meldrum R, Lane W, Gardner D, Ribeiro CD, Gallimore CI, and Westmoreland D. (2002). An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall. *Epidemiol. Infect.* 129(2):355-60.
- Fang H, Tan M, Xia M, Wang L, and Jiang X. (2013). Norovirus P particle efficiently elicits innate, humoral and cellular immunity. *PLoS One* 8(4):e63269.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, and Glass RI. (1998). Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* 178(6):1571-78.
- Farkas T, Jiang X, Guerrero ML, Zhong W, Wilton N, Berke T, Matson DO, Pickering LK, Ruiz-Palacios G. (2000). Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCVs) in Mexican children. *J. Med. Virol.* 62(2):217-23.
- Farkas T, Sestak K, Wei C, and Jiang X. (2008). Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J. Virol.* 82(11):5408-16.
- Fernández-Jiménez M, Carmona-Vicente N, Ribes-Fernández JM, and Buesa J. (2011). Norovirus genotypes causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Eastern Spain. Comunicació P063 en el "15th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology" (ESCV), Madeira 2011.
- Fernández-Vega V, Sosnovtsev SV, Belliot G, King AD, Mitra T, Gorbalenya A, and Green KY. (2004). Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the golgi complex in transfected cells. *J. Virol.* 78:4827-37.

- Flewett TH, Bryden AS, and Davies H. (1973). Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2(7844):1497.
- Frenck R, Bernstein DI, Xia M, Huang P, Zhong W, Parker S, Dickey M, McNeal M, and Jiang X. (2012). Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans. *J. Infect. Dis.* 206(9):1386-93.
- Friesema IH, Vennema H, Heijne JC, de Jager CM, Teunis PF, van der Linde R, Duizer E, and van Duynhoven YT. (2009). Differences in clinical presentation between norovirus genotypes in nursing homes. *J. Clin. Virol.* 46(4):341-44.
- Fuentes C, Guix S, Pérez-Rodríguez FJ, Fuster N, Carol M, Pintó RM, and Bosch A. (2014). Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water. *Food Microbiol.* 40:55-63.
- Fukushi S, Kojima S, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N, Katayama K, and Kageyama T. (2004). Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of norovirus. *J. Virol.* 78:3889-96.
- Fuller SA, Takahashi M, and Hurrell JGR. (1988). "Current Protocols in Molecular Biology". Ed. Wiley J. & Sons.
- Gallimore CL, Appleton H, Lewis D, Green J, and Brown DW. (1995). Detection and characterization of bisegmented double stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human fecal specimens. *J. Med. Virol.* 45:135-40
- Gallimore CI, Cubitt D, du Plessis N, and Gray JJ. (2004). Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 42(5):2271-74.

- Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Iturriza-Gomara M, and Gray JJ. (2006). Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J. Clin. Microbiol.* 44:395-99.
- Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Xerry J, Adigwe J, and Gray JJ. (2007). Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants. *Arch. Virol.* 152(7):1295-303.
- Gary GW, Anderson LJ, Keswick BH, Johnson PC, DuPont HL, Stine SE, and Bartlett AV. (1987). Norwalk virus antigen and antibody response in an adult volunteer study. *J. Clin. Microbiol.* 25(10):2001-3.
- Giordano MO, Martinez LC, Rinaldi D et al. (1999). Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV infected patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 15:1427-32
- Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, and Monroe SS. (2000). The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J. Infect.Dis.* 181(Suppl. 2):S254-61.
- Glass RI, Bresee J, Jiang B, Gentsch J, Ando T, Fankhauser R, Noel J, Parashar U, Rosen B, and Monroe SS. (2001). Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found Symp.* 238:5-19 (discussion 19-25).
- Glass RI, Parashar UD, and Estes MK. (2009). Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 361(18):1776-85.
- Goller JL, Dimitriadis A, Tan A, Kelly H, and Marshall JA. (2004). Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. *J. Hosp. Infect.* 58(4):286-91.

- Goodgame R. (2006). Norovirus gastroenteritis. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 8:401-8.
- Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberté JF, and Roberts L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep.* 6(10):968-72.
- Gordon I, Ingraham HS, and Korns RF. (1947). Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J. Exp. Med.* 86(5):409-22.
- Gray JJ, Jiang X, Morgan-Capner P, Desselberger U, and Estes MK. (1993). Prevalence of antibodies to Norwalk virus in England: detection by enzyme-linked immunosorbent assay using baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen. *J. Clin. Microbiol.* 31(4):1022-25.
- Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, and Brown DW. (1995). Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 47:392-98.
- Green KY, Kapikian AZ, Valdesuso J, Sosnovtsev S, Treanor JJ, and Lew JF. (1997). Expression and self-assembly of recombinant capsid protein from the antigenically distinct Hawaii human calicivirus. *J. Clin. Microbiol.* 35:1909-14.
- Green J, Hensilwood K, Gallimore CI, Brown DGW, and Lees N. (1998). A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small-round structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 1:858-63.
- Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. (2000). Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis.* 181(Suppl. 2):S322-30.

- Green KY, Chanock R, and Kapikian AZ. (2001). Human Caliciviruses. In *Fields Virology*, Edts Knipe DM et Howley PM, Griffin DE Raven Publishers, pp 841-74.
- Green KY. (2007). Caliciviridae: The Noroviruses. *Fields Virology*; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 949-79.
- Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, Wyatt RG, McAuliffe VJ, Kapikian AZ, and Chanock RM. (1981). Proteins of Norwalk virus. *J. Virol.* 37(3): 994-99.
- Guerrero RA, Ball JM, Krater SS, Pacheco SE, Clements JD, Estes MK. (2001). Recombinant Norwalk virus-like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses. *J. Virol.* 75:9713-22.
- Guix S, Anasaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL, and Estes MK. (2007). Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J. Virol.* 81:12238-48.
- Hall TA. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene SA, Ferguson J, Henao OL, Vinjé J, Lopman BA, Parashar UD, and Widdowson MA. (2011). Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. *Emerg. Infect. Dis.* 17(8):1381-88.
- Hamano M, Kuzuya M, Fujii R, Ogura H, and Yamada M. (2005). Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by noroviruses in Okayama, Japan. *J. Med. Virol.* 77(2):282-89.
- Han, MG, Smiley JR, Thomas C, and Saif LJ. (2004). Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among

- BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J. Clin. Microbiol.* 42:5214-24.
- Han MG, Cheetham S, Azevedo M, Thomas C, and Saif LJ. (2006). Immune responses to bovine norovirus-like particles with various adjuvants and analysis of protection in gnotobiotic calves. *Vaccine* 24(3):317-26.
- Han L, Kitov PI, Kitova EN, Tan M, Wang L, Xia M, Jiang X, and Klassen JS. (2013). Affinities of recombinant norovirus P dimers for human blood group antigens. *Glycobiology* 23(3):276-85.
- Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N. (2007). Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev. Med. Virol.* 17(2):133-41.
- Hansman GS, Biertümpfel C, Georgiev I, McLellan JS, Chen L, Zhou T, Katayama K, and Kwong PD. (2011). Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *J. Virol.* 85(13):6687-701.
- Hansman GS, Taylor DW, McLellan JS, Smith TJ, Georgiev I, Tame JR, Park SY, Yamazaki M, Gondaira F, Miki M, Katayama K, Murata K, Kwong PD. (2012). Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J. Virol.* 86(7):3635-46.
- Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, and Baric RS. (2002). Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J. Virol.* 76(23):12335-43.

- Harris JP, Edmunds WJ, Pebody R, Brown DW, and Lopman BA. (2008). Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales. *Emerg. Infect. Dis.* 14(10):1546-52.
- Hedberg CW, and Osterholm MT. (1993). Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 6(3):199-210.
- Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, and Nakagomi O. (2013). Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J. Clin. Virol.* 56(3):185-93.
- Holm L, and Sander C. (1993). The Z score between the P2 subdomain and the EF-Tu domain was 3.5. *J. Mol. Biol.* 233: 123.
- Hu Z, Tian X, Zhai Y, Xu W, Zheng D, and Sun F. (2010). Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus. *Protein Cell.* 1(1):48-58.
- Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, Ruvoën-Clouet N, Morrow AL, Altaye M, Pickering LK, Newburg DS, LePendu J, and Jiang X. (2003). Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J. Infect. Dis.* 188(1):19-31.
- Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, Morrow AL, and Jiang X. (2005). Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J. Virol.* 79(11):6714-22.

- Humphrey TJ, Cruickshank JG, and Cubitt WD. (1984). An outbreak of calicivirus associated gastroenteritis in an elderly persons home. A possible zoonosis? *J. Hyg. (Lond)*. 93(2):293-99.
- Hurley KE, Pesavento PA, Pedersen NC, Poland AM, Wilson E, and Foley JE. (2004). An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224(2):241-49.
- Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, and Estes MK. (2002). Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J. Infect. Dis.* 185:1335-37.
- Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK. (2003). Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to histo-blood group antigens. *J Virol* 77(1):405-15.
- Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. (2004). Norovirus disease: Changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol.* 12:279-87.
- Jayaram H, Estes MK, and Prasad BV. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res.* 101(1):67-81.
- Jiang X, Graham DY, Wang KN, and Estes MK. (1990). Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250(4987):1580-83.
- Jiang X, Wang M, Graham DY, and Estes MK. (1992). Expression, self assembly and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* 66(11):6527-32.
- Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. (1993). Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195(1):51-61.
- Jiang X, Matson DO, Ruiz-Palacios GM, Hu J, Treanor T, and Pickering LK. (1995). Expression, self-assembly and

- Antigenicity of a Snow Mountain Agent-like Calicivirus Capsid Protein. *J. Clin. Microbiol.* 33(6):1452-55.
- Jiang X, Turf E, Hu J, Barrett E, Dai XM, Monroe S, Humphrey C, Pickering LK, and Matson DO. (1996). Outbreaks of gastroenteritis in elderly nursing homes and retirement facilities associated with human caliciviruses. *J. Med. Virol.* 50(4):335-41.
- Jing Y, Qian Y, Huo Y, Wang LP, and Jiang X. (2000). Seroprevalence against Norwalk-like human caliciviruses in Beijing, China. *J. Med. Virol.* 60:97-101.
- Johansson PJ, Torvén M, Hammarlund AC, Björne U, Hedlund KO, Svensson L. (2002). Food-borne outbreak of gastroenteritis associated with genogroup I calicivirus. *J. Clin. Microbiol.* 40(3):794-8.
- Johansson PJ, Bergentoft K, Larsson PA, Magnusson G, Widell A, Thorhagen M, and Hedlund KO. (2005). A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 37(3):200-4.
- Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. (1990). Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J. Infect. Dis.* 161(1):18-21.
- Jordan JR, Gordon I, and Dorrance WR. (1953). A study of illness in a group of Cleveland families. Transmission of acute nonbacterial gastroenteritis to volunteers: evidence for two different etiological agents. *J. Exp. Med.* 98(5):461-75.
- Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, Lees DN, Hill VR, and Vinjé J. (2005). Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4):1870-75.

- Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, and Katayama K. (2004). Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 42(7):2988-95.
- Kaneko M, Nishihara S, Shinya N, Kudo T, Iwasaki H, Seno T, Okubo Y, and Narimatsu H. (1997). Wide variety of point mutations in the H gene of Bombay and para-Bombay individuals that inactivate H enzyme. *Blood* 90(2):839-49.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10(5):1075-81.
- Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, et al. (1982). Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann. Intern. Med.* 96(6 Pt 1):756-61.
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J. & Virgin, H. W. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299:1575-78.
- Karst SM. (2010). Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses* 2(3):748-81.
- Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, and Takeda N. (2002). Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299:225-39.
- Katpally U, Wobus CE, Dryden K, Virgin HW 4th, and Smith TJ. (2008). Structure of antibody-neutralized murine norovirus and

- unexpected differences from viruslike particles. *J. Virol.* 82(5):2079-88.
- Katpally U, Voss NR, Cavazza T, Taube S, Rubin JR, Young VL, Stuckey J, Ward VK, Virgin HW 4th, Wobus CE, and Smith TJ. (2010). High-resolution cryo-electron microscopy structures of murine norovirus 1 and rabbit hemorrhagic disease virus reveal marked flexibility in the receptor binding domains. *J. Virol.* 84(11):5836-41.
- Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, Magid MS, Gordon RE, Morse DL, Herold BC, LeLeiko NS, Tschernia A, Florman SS, Gondolesi GE, and Fishbein TM. (2003). Calicivirus enteritis in an intestinal transplant recipient. *Am. J. Transplant.* 3(6):764-68.
- Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, Bitsura JA, Gary GW, and Hoff JC. (1985). Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(2):261-64.
- Kinchington PR, Romanowski EG, and Jerold GY. (2005). Prospects for adenovirus antivirals. *J. Antimicrob. Chemother.* 55:424-29.
- King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, and Carstens EB. (2012). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, Elsevier.
- Kirkwood CD, Clark R, Bogdanovic-Sakran N, and Bishop RF. (2005). A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998–2002). *J. Med. Virol.* 77(1):96-101.

- Kirkwood CD, and Streitberg R. (2008). Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *J. Clin. Virol.* 43:346-48.
- Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, and Estes MK. (2002). Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J. Clin. Microbiol.* 40:2459-65.
- Koelle K, Cobey S, Grenfell B, and Pascual M. (2006). Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in humans. *Science* 314:1898-903.
- Koo HL, Neill FH, Estes MK, Munoz FM, Cameron A, Dupont HL, and Atmar RL. (2013). Noroviruses: The Most Common Pediatric Viral Enteric Pathogen at a Large University Hospital After Introduction of Rotavirus Vaccination. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2(1):57-60.
- Koopmans M, Von Bosdorff CH, Vinjé J, de Medici D, and Monroe S. (2002). Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:187-205
- Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, and Koopmans M. (2013). Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158(10):2059-68.
- Kudo T, Iwasaki H, Nishihara S, Shinya N, Ando T, Narimatsu I, and Narimatsu H. (1996). Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. II. Secretor gene inactivation by a novel single missense mutation A385T in Japanese nonsecretor individuals. *J. Biol. Chem.* 271(16):9830-37.

- Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, and Clarke IN. (1993). Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259(5094):516-19.
- Lappalainen S, Pastor AR, Tamminen K, López-Guerrero V, Esquivel-Guadarrama F, Palomares LA, Vesikari T, and Blazevic V. (2014). Immune responses elicited against rotavirus middle layer protein VP6 inhibit viral replication in vitro and in vivo. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10(7). [Epub ahead of print].
- Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S, Doyle A, Zidane M, Suffredini E, Kohli E, Maddalo F, Monini M, Gallay A, Pommepuy M, Pothier P, and Ruggeri FM. (2006). Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J. Clin. Microbiol.* 44(11):3878-82.
- Le Pendu J. (2004). Histo-blood group antigen and human milk oligosaccharides: genetic polymorphism and risk of infectious diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 554:135-43.
- Le Pendu J, Ruvoën-Clouet N, Kindberg E, and Svensson L. (2006). Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin. Immunol.* 18(6):375-86.
- Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendou J, and Baric RS. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* 9:548-53.
- Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, and Baric RS. (2005). Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J. Virol.* 79(5):2900-09.
- Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinjé J, and Baric RS. (2008). Mechanisms of GII. 4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 5(2):e31.

- Lindesmith LC, Donaldson E, Leon L, Moe CL, Frelinger JA, Johnston RE, Ewber DJ, and Baric RS. (2010). Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. *J. Virol.* 84(4):1800-15.
- Lindesmith LC, Costantini V, Swanstrom J, Debbink K, Donaldson EF, Vinjé J, and Baric RS. (2013). Emergence of a norovirus GII.4 strain correlates with changes in evolving blockade epitopes. *J. Virol.* 87(5):2803-13.
- Linhares AC, Velázquez FR, Pérez-Schael I, Sáez-Llorens X, Abate H, Espinoza F, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Rivera-Medina DM, Rivera L, Pavía-Ruz N, Nuñez E, Damaso S, Ruiz-Palacios GM, De Vos B, O’Ryan M, Gillard P, and Bouckennooghe A. (2008). Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet* 371(9619):1181-9.
- Liste MB, Natera I, Suarez JA, Pujol FH, Liprandi F, and Ludert JE. (2000). Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *J. Clin. Microbiol.* 38(8):2873-77.
- Liu B, Clarke IN, and Lambden PR. (1996). Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by *in vitro* mutagenesis. *J. Virol.* 70(4):2605-10.
- LoBue AD, Lindesmith L, Yount B, Harrington PR, Thompson JM, Johnston RE, Moe CL, and Baric RS. (2006). Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains. *Vaccine* 24(24):5220-34.
- LoBue AD, Thompson JM, Lindesmith L, Johnston RE, and Baric RS. (2009). Alphavirus-adjuvanted norovirus-like particle vaccines: heterologous, humoral, and mucosal immune

- responses protect against murine norovirus challenge. *J. Virol.* 83(7):3212-27.
- Lochridge VP, Jutila KL, Graff JW, and Hardy ME. (2005). Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J. Gen. Virol.* 86(10):2799-806.
- Lopman BA, Brown DW, and Koopmans M. (2002). Human caliciviruses in Europe. *J. Clin. Virol.* 24:137-60.
- Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, and Brown DWG. (2003). Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9:71-77.
- Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, Buesa J, Schreier E, Reacher M, and Brown D. (2004a). Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 363:682-88.
- Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. (2004b). Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin. Infect. Dis.* 39(3):318-24.
- Luttermann C, and Meyers G. (2007). A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *J. Biol. Chem.* 282:7056-65.
- Mackinnon MJ, and Read AF. (2004). Immunity promotes virulence evolution in a malaria model. *PLoS Biol.* 2(9):E230.
- Madeley CR, and Cosgrove BP. (1975). 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2(7932):451-2.
- Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, Kato K, Tohya Y, and Akashi H. (2006). Junctional adhesion molecule 1 is a

- functional receptor for feline calicivirus. *J. Virol.* 80(9):4482-90.
- Manso CF, Torres E, Bou G, and Romalde JL. (2013). Role of norovirus in acute gastroenteritis in the Northwest of Spain during 2010-2011. *J. Med. Virol.* 85(11):2009-15.
- Marcato PS, Benazzi C, Vecchi G, Galeotti M, Della Salda L, Sarli G, Lucidi P. (1991). Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev. Sci. Tech.* 10:371-92.
- Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoen N, Clement M, Le Pendu J. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83: 565-73.
- Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, and Le Pendu J. (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122(7):1967-77.
- Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, Bellacicco AL, Decaro N, Elia G, Greco G, Corrente M, Desario C, Arista S, Banyai K, Koopmans M, and Buonavoglia C. (2007). Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg. Infect. Dis.* 13(7):1071-73.
- Martínez LC, Masachessi G, Carruyo G, Ferreyra LJ, Barril PA, Isa MB, Giordano MO, Ludert JE, and Nates SV. (2010). Picobirnavirus causes persistent infection in pigs. *Infect. Genet. Evol.* 10(7):984-88.
- Matson DO, Estes MK, Glass RI, Bartlett AV, Penaranda M, Calomeni E, Tanaka T, Nakata S, and Chiba S. (1989).

- Human calicivirus-associated diarrhea in children attending day care centers. *J. Infect. Dis.* 159(1):71-8.
- Matson DO, Berke T, Dinulos MB, Poet E, Zhong WM, Dai XM, Jiang X, Golding B, and Smith AW. (1996). Partial characterization of the genome of nine animal caliciviruses. *Arch. Virol.* 141(12):2443-56.
- Matsui SM, Kim JP, Greenberg HB, Su W, Sun Q, Johnson PC, DuPont HL, Oshiro LS, and Reyes GR. (1991). The isolation and characterization of a Norwalk virus-specific cDNA. *J. Clin. Investig.* 87(4):1456-61.
- Matsui SM, and Greenberg HB. (1996). Astroviruses. In: David PMH, and Knipe M. (Eds.), Anonymous. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 811-24.
- Matsui SM, and Greenberg HB. (2000). Immunity to calicivirus infection. *J. Infect. Dis.* 181:S331-335.
- Matsuura Y, Tohya Y, Onuma M, Roerink F, Mochizuki M, Sugimura T. (2000). Expression and processing of the canine calicivirus capsid precursor. *J. Gen. Virol.* 81(Pt 1):195-99.
- Matthijnsens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Ba'nyai K, Rahman M, Zeller M, Beutels P, Van Damme P, and Van Ranst M. (2009). Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 4:1303-1316.
- Matthijnsens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. (2010). Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol. Biol. Evol.* 27:2431-2436.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Ba'nyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V,

- Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, and Van Ranst M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156:1397-413.
- Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, and Koopmans M. (2006). Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin. Microbiol. Infect.* 12(1):69-74.
- Mayrose I, Penn O, Erez E, Rubinstein ND, Shlomi T, Freund NT, Bublil EM, Ruppin E, Sharan R, Gershoni JM, Martz E, and Pupko T. (2007). Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides. *Bioinformatics* 23(23):3244-46.
- Mendez E, and Arias CF, (2007). Astroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 981–1000.
- Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MS, and Vinjé J. (2010). Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 16(6):980-82.
- Millard J, Appleton H, and Parry JV. (1987). Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. Part 1. Procedures for infection and recovery of virus from laboratory-maintained cockles. *Epidemiol. Infect.* 98(3):397-414.
- Mitchell DK, Matson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ, Willcocks MM, and Pickering LK. (1999). Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J. Infect. Dis.* 180(2):514-17.
- Morokutti A, Muster T, and Ferko B. (2014). Intranasal vaccination with a replication-deficient influenza virus induces

- heterosubtypic neutralising mucosal IgA antibodies in humans. *Vaccine* 32(17):1897-900.
- Morris CA, Flewett TH, Bryden AS, and Davies H. (1975). Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* 1(7897):4-5.
- Morton V, Jean J, Farber J, and Mattison K. (2009). Detection of noroviruses in ready-to-eat foods by using carbohydrate-coated magnetic beads. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(13):4641-43.
- Moser LA, and Schultz-Cherry S. (2005). Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunol.* 18(1):4-10.
- Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, and Glass RI. (2000). Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J. Infect. Dis.* 181(Suppl. 2):S284-87.
- Mumphrey SM, Changotra H, Moore TN, Heimann-Nichols ER, Wobus CE, Reilly MJ, Moghadamfalahi M, Shukla D, and Karst SM. (2007). Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J. Virol.* 81:3251-63.
- Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, and Katayama K. (2013). Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS One* 8:e66534.
- Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, and Matsuzaki Y. (2007). Prolonged norovirus shedding in infants - 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26:46-49.

- Muruve, D.A. (2004). The Innate Immune Response to Adenovirus Vectors. *Hum. Gene Ther.* 15:1157-66.
- Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe SS, and Glass RI. (1997). Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J. Med. Virol.* 53(4):372-83.
- Nurminen K, Blazevic V, Huhti L, Rasanen S, Koho T, Hytonen VP, and Vesikari T. (2011). Prevalence of norovirus GII-4 antibodies in Finnish children. *J. Med. Virol.* 83(3):525-31.
- Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, and Bridger JC. (2006). Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* 350(1):240-50.
- Oriol R. (1990). Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *J. Immunogenet.* 17(4-5):235-45.
- Ossiboff RJ, Zhou Y, Lightfoot PJ, Prasad BV, Parker JS. (2010). Conformational changes in the capsid of a calicivirus upon interaction with its functional receptor. *J. Virol.* 84(11):5550-64.
- Papafragkou E, Hewitt J, Park GW, Greening G, Vinjé J. (2013). Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models. *PLoS One* 8(6):e63485.
- Parashar U, Quiroz ES, Mounts AW, Monroe SS, Fankhauser RL, and Ando T. (2001). "Norwalk-like viruses". Public Health consequences and outbreak management. *Morb. Mort. Weekly Rep.* 50(9):1-17.

- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, and Glass RI. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12(2), 304-6.
- Park SI, Jeong C, Park SJ, Kim HH, Jeong YJ, Hyun BH, Chun YH, Kang MI, Cho KO. (2008). Molecular detection and characterization of unclassified bovine enteric caliciviruses in South Korea. *Vet. Microbiol.* 130(3-4):371-79.
- Parker SP, Cubitt WD, Jiang XJ, and Estes MK. (1994). Seroprevalence studies using a recombinant Norwalk virus protein enzyme immunoassay. *J. Med. Virol.* 42(2):146-50.
- Parra GI, Bok K, Taylor R, Haynes JR, Sosnovtsev SV, Richardson C, and Green KY. (2012). Immunogenicity and specificity of norovirus consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations. *Vaccine* 30(24):3580-86.
- Parra GI, Azure J, Fischer R, Bok K, Sandoval-Jaime C, Sosnovtsev SV, Sander P, Green KY. (2013). Identification of a Broadly Cross-Reactive Epitope in the Inner Shell of the Norovirus Capsid. *PLoS One* 8: e67592.
- Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. (1977). Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N. Engl. J. Med.* 297(2):86-9.
- Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. (2008). Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14(8):1224-31.
- Patel MM, Halla AJ, Vinjé J, Parashar UD. (2009). Noroviruses: A comprehensive review. *J. Clin. Virol.* 44:1-8.
- Payne DC, Vinjé J, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Weinberg GA, Hall CB, Chappell J, Bernstein DI, Curns AT, Wikswow M, Shirley SH, Hall AJ, Lopman B, and Parashar UD. (2013).

- Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *N. Engl. J. Med.* 368(12):1121-30.
- Peasey AE, Ruiz-Palacios GM, Quigley M, Newsholme W, Martinez J, Rosales G, Jiang X, and Blumenthal UJ. (2004). Seroepidemiology and risk factors for sporadic norovirus/Mexico strain. *J. Infect. Dis.* 189(11):2027-36.
- Pedersen NC, Elliott JB, Glasgow A, Poland A, and Keel K. (2000). An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.* 73(4):281-300.
- Pereira HG, Flewett TH, Candeias JA, Barth OM. (1988) A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. *J. Gen. Virol.* 69(Pt 11):2749-54.
- Pinto M, Robine-Léon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 47:323-30.
- Ponterio E, Petrizzo A, Di Bartolo I, Buonaguro FM, Buonaguro L, and Ruggeri FM. (2013). Pattern of activation of human antigen presenting cells by genotype GII.4 norovirus virus-like particles. *J. Transl. Med.* 11:127.
- Prasad BV, Matson DO, and Smith AW. (1994a). Three dimensional structure of calicivirus. *J. Mol. Biol.* 240(3):256-64.
- Prasad BV, Rothenagel R, Jiang X, and Estes MK. (1994b). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk-virus capsids. *J. Virol.* 68(8):5117-25.

- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286:287-290.
- Radford AD, Dawson S, Coyne KP, Porter CJ, and Gaskell RM. (2006). The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccines. *Vet. Microbiol. Review.* 117(1):14-8.
- Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, and Gaskell RM. (2007). Feline calicivirus. *Vet. Res.* 38(2):319-35.
- Ramani S, Atmar RL, and Estes MK. (2014). Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30(1):25-33.
- Reeck A, Kavanagh O, Estes MK, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY, and Atmar RL. (2010). Serological correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 202(8):1212-18.
- Reuter G, Pankovics P, and Szucs G. (2008). Genetic drift of norovirus genotype GII-4 in seven consecutive epidemic seasons in Hungary. *J. Clin. Virol.* 42(2):135-40.
- Riemann HA, Price AH, and Hodges JH. (1945). The cause of epidemic diarrhea, nausea and vomiting (viral dysentery?). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 59:8-9
- Risco C, Carrascosa JL, Pedregosa AM, Humphrey CD, and Sánchez-Fauquier A. (1995). Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J. Gen. Virol.* 76(Pt 8):2075-80.
- Rodríguez-Díaz J, Querales L, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H, Betancourt WQ. (2009). Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(2):387-94.

- Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, and Koopmans M. (2002). Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 35(3):246-53.
- Rockx B, Baric RS, de Grijns I, Duizer E, Koopmans MP. (2005). Characterization of the homo- and heterotypic immune responses after natural norovirus infection. *J. Med. Virol.* 77(3):439-46.
- Rohayem J. (2009). Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin. Microbiol. Infect.* 15(6):524-27.
- Rohayem J, Bergmann M, Gebhardt J, Gould E, Tucker P, Mattevi A, Unge T, Hilgenfeld R, and Neyts J. (2010). Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Res.* 87(2):162-78.
- Rondy M, Koopmans M, Rotsaert C, Van Loon T, Beljaars B, Van Dijk G, Siebenga J, Svraka S, Rossen JW, Teunis P, Van Pelt W, and Verhoef L. (2011). Norovirus disease associated with excess mortality and use of statins: a retrospective cohort study of an outbreak following a pilgrimage to Lourdes. *Epidemiol. Infect.* 139(3):453-63.
- Rousset M. (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68:1035-40.
- Rubio-del-Campo A, Coll-Marqués JM, Yebra MJ, Buesa J, Pérez-Martínez G, Monedero V, and Rodríguez-Díaz J. (2014). Noroviral p-particles as an in vitro model to assess the interactions of noroviruses with probiotics. *PLoS One* 9(2):e89586.
- Russell WC. (2009). Adenoviruses: Update on structure and function. *J. Gene. Virol.* 90:1-20.

- Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, Andre-Fontaine G, Blanchard D, and Le Pendu J. (2000). Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J. Virol.* 74(24):11950-54.
- Rydell GE, Nilsson J, Rodríguez-Díaz J, Ruvoën-Clouet N, Svensson L, Le Pendu J, and Larson G. (2009). Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology* 19(3):309-20.
- Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, and Chiba S. (2001). Clinical severity of Norwalk virus Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20(9):849-53.
- Sala MR, Cardeñosa N, Arias C, Llovet T, Recasens A, Dominguez A, Buesa J, and Salleras L. (2005). An outbreak of food poisoning due to a genogroup I norovirus. *Epidemiol. Infect.* 133(1):187-91.
- Sánchez G, Aznar R, Martínez A, and Rodrigo D. (2011). Inactivation of human and murine norovirus by high-pressure processing. *Foodborne Pathog. Dis.* 8(2):249-53.
- Santos N, and Hoshino Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15:29-56.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, and Griffin PM. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17(1):7-15.
- Seah EL, Marshall JA, and Wright PJ. (2003). trans activity of the norovirus Camberwell proteinase and cleavage of the N-terminal protein encoded by ORF1. *J. Virol.* 77:7150-55.

- Serpa J, Mendes N, Reis CA, Santos Silva LF, Almeida R, Le Pendu J, and David L. (2004). Two new FUT2 (fucosyltransferase 2 gene) missense polymorphisms, 739G-->A and 839T-->C, are partly responsible for non-secretor status in a Caucasian population from Northern Portugal. *Biochem J.* 383(Pt. 3):469-74.
- Schreiber DS, Blacklow NR, and Trier JS. (1973). The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 288, 1318–1323.
- Shanker S, Choi JM, Sankaran B, Atmar RL, Estes MK, and Prasad BV. (2011). Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution. *J. Virol.* 85(17):8635-45.
- Sharp TM, Guix S, Katayama K, Crawford SE, and Estes MK. (2010). Inhibition of cellular protein secretion by norwalk virus nonstructural protein p22 requires a mimic of an endoplasmic reticulum export signal. *PLoS One* 5(10):e13130.
- Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, Xiaofan Z, Miyamura T, Wakita T, Ishii K, and Takeda N. (2008). Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J. Virol.* 82(21):10756-67.
- Shirato H. (2011). Norovirus and histo-blood group antigens. *Jpn. J. Infect. Dis.* 64(2):95-103. *Review.*
- Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, and Koopmans M. (2007). Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J. Virol.* 81(18):9932-41.
- Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, Halperin T, Rasool NB, Hewitt J, Greening GE, Jin M, Duan ZJ, Lucero Y, O’Ryan M,

- Hoehne M, Schreier E, Ratcliff RM, White PA, Iritani N, Reuter G, and Koopmans M. (2009). Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J. Infect. Dis.* 200(5):802-12.
- Smith AW, and Boyt PM. (1990). Caliciviruses of ocean origin: a review. *The Journal of Zoo Wildlife Medicine* 21:3-23.
- Soejima M, and Koda Y. (2005). Molecular mechanisms of Lewis antigen expression. *Leg. Med. (Tokyo)* 7(4):266-69.
- Souza M, Cheetham SM, Azevedo MSP, Costantini V, and Saif LJ. (2007a). Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *J. Virol.* 81:9183-92.
- Souza M, Costantini V, Azevedo MS, and Saif LJ. (2007b). A human norovirus-like particle vaccine adjuvanted with ISCOM or mLT induces cytokine and antibody responses and protection to the homologous GII.4 human norovirus in a gnotobiotic pig disease model. *Vaccine* 25:8448-59.
- Souza M, Azevedo MSP, Jung K, Cheetham S, and Saif LJ. (2008). Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J. Virol.* 82:1777-86.
- Sosnovtsev SV, Sosnovtseva SA, and Green KY. (1998). Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J. Virol.* 72(4):3051-59.
- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Onwudiwe O, and Green KY. (2005). Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J. Virol.* 79(7):4012-24.
- Straub TM, HönerzuBentrop K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, and Nickerson CA. (2007). In

- vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13:396-403.
- Straub TM, Bartholomew RA, Valdez CO, Valentine NB, Dohnalkova A, Ozanich RM, Bruckner-Lea CJ, and Call DR. (2011). Human norovirus infection of caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure. *J. Water Health* 9(2):225-40.
- Straub TM, Hutchison JR, Bartholomew RA, Valdez CO, Valentine NB, Dohnalkova A, Ozanich RM, and Bruckner-Lea CJ. (2013). Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays. *Water Sci. Technol.* 67(4):863-68.
- Stuart AD, and Brown TD. (2007). Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J. Gen. Virol.* 88(Pt 1):177-86.
- Takanashi S, Saif LJ, Hughes JH, Meulia T, Jung K, Scheuer KA, and Wang Q. (2014). Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. *Arch Virol.* 159(2):257-66.
- Tamminen K, Huhti L, Koho T, Lappalainen S, Hytonen VP, Vesikari T, Blazevic V. (2012). A comparison of immunogenicity of norovirus GII-4 virus-like particles and P-particles. *Immunology* 135:89-99.
- Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, and Takeda N. (2004). Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J. Virol.* 78: 3817-26.
- Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N. (2000). Interaction of recombinant norwalk virus particles with the

- 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. *J. Virol.* 74: 11589-97.
- Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, and Jiang X. (2003). Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J. Virol.* 77:12562-71.
- Tan M, Hegde RS, and Jiang X. (2004a). The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J. Virol.* 78:6233-42.
- Tan M, Zhong W, Song D, Thornton S, and Jiang X. (2004b). E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *J. Med. Virol.* 74:641-49.
- Tan M, and Jiang X. (2005a). The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J. Virol.* 79:14017-30.
- Tan M, and Jiang X. (2005b). Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol.* 13:285-93.
- Tan M, Fang P, Chachiyo T, Xia M, Huang P, Fang Z, Jiang W, and Jiang X. (2008). Noroviral P particle: structure, function and applications in virus-host interaction. *Virology* 382:115-23.
- Tan M, and Jiang X. (2011). Norovirus-host interaction: multi-selections by human histo-blood group antigens. *Trends Microbiol.* 19(8):382-88.
- Tan M, Huang P, Xia M, Fang PA, Zhong W, McNeal M, Wei C, Jiang W, and Jiang X. (2011). Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J. Virol.* 85:753-64.

- Tate JE, and Parashar UD. (2011). Monitoring impact and effectiveness of rotavirus vaccination. *Expert. Rev. Vaccines* 10(8):1123-25.
- Taube S, Perry JW, Yetming K, Patel SP, Auble H, Shu L, Nawar HF, Lee CH, Connell TD, Shayman JA, and Wobus CE. (2009). Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J. Virol.* 83(9):4092-101.
- Taube S, Kolawole AO, Höhne M, Wilkinson JE, Handley SA, Perry JW, Thackray LB, Akkina R, and Wobus CE. (2013). A mouse model for human norovirus. *MBio.* 4(4).pii:e00450-13.
- Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, and Calderon RL. (2008). Norwalk virus: how infectious is it?. *J. Med. Virol.* 80(8):1468–76.
- Thackray LB, Wobus CE, Chachu KA, Liu B, Alegre ER, Henderson KS, Kelley ST, and Virgin HW 4th. (2007). Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. *J. Virol.* 81(19):10460-73.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-82.
- Thornhill TS, Wyatt RG, Kalica AR, Dolin R, Chanock RM, and Kapikian AZ. (1977). Detection by immune electron microscopy of 26 to 27-nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 135(1):20-7.
- Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, and Svensson L. (2005). A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2)

- gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J. Virol.* 79(24):15351-55.
- Tian P, Brandl M, Mandrell R. (2005). Porcine gastric mucin binds to recombinant norovirus particles and competitively inhibits their binding to histo-blood group antigens and Caco-2 cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 41:315-20.
- Tu ET, Bull RA, Greening GE, Hewitt J, Lyon MJ, Marshall JA, McIver CJ, Rawlinson WD, and White PA. (2008). Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clin. Infect. Dis.* 46(3):413-20.
- Turcios-Ruiz RM, Axelrod P, St John K, Bullitt E, Donahue J, Robinson N, and Friss HE. (2008). Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *J. Pediatr.* 153(3):339-44.
- Van Beek J, Kroneman A, Vennema H, and Koopmans M. (2013). Noronet report, april 2013. Norovirus Molecular Plattform (*Noronet*).
- Von Regenmortel, MHV. (2000). Virus Taxonomy. VIIth report of the ICTV. Academic Press. pp 1167.
- Vinje J, and Koopmans MP. (1996). Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* 174(3):610-15.
- Vinje J, Hamidjaja RA, and Sobsey MD. (2004). Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J. Virol. Meth.* 116:109-17.
- Westhoff TH, Vergoulidou M, Loddenkemper C, Schwartz S, Hofmann J, Schneider T, Zidek W, and van der Giet M.

- (2009). Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24:1051-53.
- White LJ, Ball JM, Hardy ME, Tanaka TN, Kitamoto N, and Estes MK. (1996). Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J. Virol.* 70:6589-97.
- White PA, Hansman GS, Li A, Dable J, Isaacs M, Ferson M, McIver CJ, and Rawlinson WD. (2002). Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia. *J. Med. Virol.* 68(1):113-18.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresh DA, Nemerow GR. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73:309-19.
- Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN, Charles M, Chege W, Isakbaeva E, Wright JG, Mintz E, Forney D, Massey J, Glass RI, and Monroe SS. (2004). Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus. United States, 2002. *Infect. Dis.* 190(1): 27-36.
- Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, Salehi ED, Swanson E, Totaro J, Woron R, Mead PS, Bresee JS, Monroe SS, and Glass RI. (2005). Norovirus and foodborne disease, United States, 1991–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 11(1):95-102.
- Wilhelmi I, Roman E, and Sanchez-Fauquier A. (2003). Viruses causing gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* 4:247-62.
- Williams DJ, Edwards KM, Payne DC, Manning J, Parashar UD, and Lopman BA. (2012). Decline in gastroenteritis-related triage calls after rotavirus vaccine licensure. *Pediatrics* 130(4):e872-78.

- Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, Kapikian AZ, and Chanock RM. (1974). Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J. Infect. Dis.* 129(6):709-14.
- Yamashita T, Kobayashi S, Sakae K, Nakata S, Chiba S, Ishihara Y, and Isomura S. (1991). Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 164(5):954-57.
- Yolken R, Dubovi E, Leister F, Reid R, Almeida-Hill J, and Santosham M. (1989). Infantile gastroenteritis associated with excretion of pestivirus antigens. *Lancet* 1(8637):517-20.
- Yu G, Zhang D, Guo F, Tan M, Jiang X, and Jiang W. (2013). Cryo-EM structure of a novel calicivirus, Tulane virus. *PLoS One* 8(3):e59817.
- Zahorsky J. (1929). Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch. Pediatr.* 46:391-95.
- Zakhour M, Ruvoën-Clouet N, Charpilienne A, Langpap B, Poncet D, Peters T, Bovin N, and Le Pendu J. (2009). The alphaGal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine norovirus Newbury2 expected to prevent cross-species transmission. *PLoS Pathog* 5(7):e1000504.
- Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, and Iturriza-Gomara M. (2012). Molecular evolution of GII-4 Norovirus strains. *PLoS One* 7:e41625.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, and Monroe SS. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346(2):312-23.
- Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, and Vinjé J. (2010). Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4

Bibliografia

noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* 48(1):168-77.