

Virus entéricos, UB

Albert Bosch Navarro – Rosa M. Pintó Solé

Dpto. Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

El término virus entérico se aplica de forma genérica a cualquier virus de transmisión fecal-oral y no debe confundirse con el de *Enterovirus* que constituye un género dentro de la familia *Picornaviridae*. Nuestro grupo, como su nombre indica, se dedica al estudio de los virus entéricos, tanto desde una perspectiva molecular básica como desde una perspectiva aplicada como es el control de su papel como contaminantes ambientales y de alimentos.

Según los Centers for Disease Control (CDC) de Atlanta, se producen anualmente entre tres y cinco mil millones de casos de diarreas que causan alrededor de cinco millones de muertes, sobre todo en la población infantil. El primer

virus de gastroenteritis identificado fue el virus de Norwalk, en 1972, que es el prototipo de los norovirus, pertenecientes a la familia *Caliciviridae*, y el agente de transmisión alimentaria que causa un mayor número de casos de diarrea. Un año más tarde fueron descritos los rotavirus que todavía causan alrededor de medio millón de muertes infantiles cada año por gastroenteritis. Con el paso de los años otros virus causantes de gastroenteritis fueron descritos entre los cuales se encuentran los astrovirus pertenecientes a la familia *Astroviridae*. Recientemente atraen interés los sapovirus, también pertenecientes a la familia *Caliciviridae* como los norovirus, y cuyo papel en la gastroenteritis infantil parece

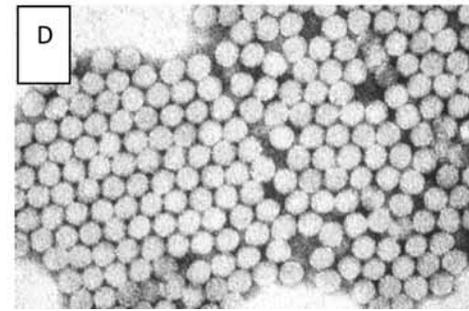
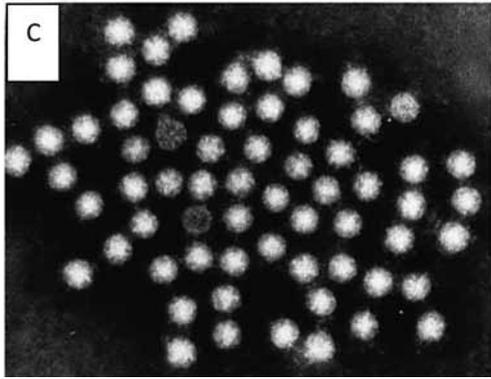
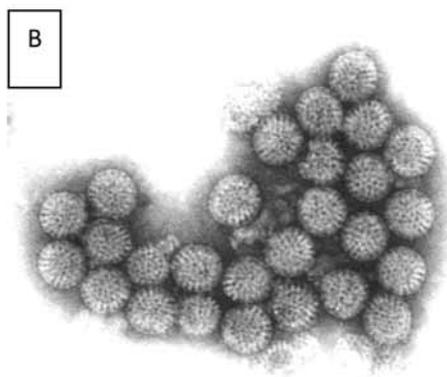
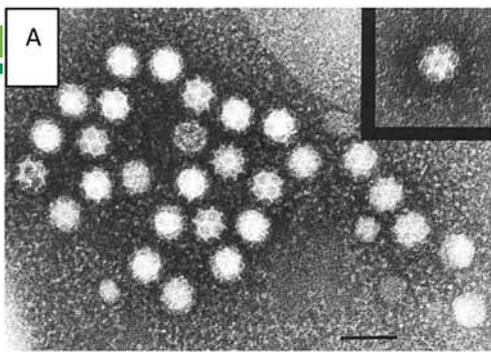


Figura 1. Virus entéricos objeto de estudio de nuestro grupo. A. Calicivirus; B. Rotavirus; C. Astrovirus; D. Virus de la hepatitis A.

ser relevante. Por otro lado, el virus de la hepatitis A, dentro de la anteriormente mencionada familia *Picornaviridae*, es un virus hepatotrópico de transmisión esencialmente fecal-oral que causa la mitad de todas las hepatitis a nivel mundial. Estos virus han sido el foco de interés de nuestro grupo durante más de tres décadas.

Un enfermo de gastroenteritis puede excretar niveles de virus de hasta 10^{13} partículas víricas por mL de deposición fecal y sus vómitos, explosivos, pueden contener unos 10^6 virus por mL. Las heces de un enfermo de hepatitis A pueden albergar hasta 10^8 virus por gramo. Dado que los habituales tratamientos de depuración de aguas residuales no consiguen una eliminación completa de los patógenos víricos, éstos se convierten en potenciales contaminantes del medio acuático, así como de alimentos como el marisco bivalvo cultivado en zonas contaminadas y frutas y verduras regadas con aguas contaminadas.

Puede verse un listado exhaustivo de las líneas de investigación del grupo en la página web del mismo (<http://www.ub.edu/microbiologia/viruse/index.htm>) en la que también se encuentran reseñadas las fuentes de financiación oficial de los últimos años.

Dentro de la virología ambiental un tema de interés actual del grupo es la puesta a punto de sistemas de detección y cuantificación para los virus de la hepatitis A, norovirus y sapovirus en muestras de agua, alimentos y también en muestras provenientes de pacientes. Este tema ha sido financiado por proyectos de la UE “SEAFOODplus”, “EVENT” y “DIVINE-NET” y el proyecto del Plan Nacional de Biotecnología “Estandarización de una RT-PCR a tiempo real para la cuantificación del virus de la hepatitis A, y caracterización de virus con cápsides mutantes”. Los resultados obtenidos han dado lugar a metodologías que han sido la base del desarrollo de métodos de referencia formulados por el comité de la UE CEN/TC275/WG6/TAG4 “Microbiology of food and

animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR- Part 1: Method for quantitative determination” y “Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR- Part 1: Method for qualitative determination”. En esta misma línea hemos depositado dos patentes que se encuentran actualmente en explotación “Control for assays based on reverse-transcription polymerase chain reaction. International PCT No. registro PCT/EP2007/055407, Estados Unidos, 2007” y “Standardized method and kit for the quantification of Hepatitis A virus. International PCT No. registro PCT/EP2007/055402, Estados Unidos, 2007”.

Las metodologías desarrolladas por el grupo nos han permitido llevar a cabo el primer estudio de estimación cuantitativa del riesgo de contraer hepatitis A después de consumir alimentos contaminados con el virus. Por otro lado también hemos podido llevar a cabo estudios de detección cuantitativa y caracterización genómica de norovirus de los genogrupos I y II, así como de sapovirus en la cuenca del río Llobregat que han sido financiados por el proyecto de la UE “HEALTHY-WATER”. Los resultados constituyen la primera descripción de la presencia de sapovirus en el ambiente fuera de Japón y proporcionan datos de los niveles de estos importantes patógenos gastrointestinales y de su prevalencia epidemiológica en esta cuenca que es fuente de abastecimiento de agua de bebida para una gran parte de la población catalana. También se han podido extraer conclusiones de la persistencia de estos virus después de tratamientos de depuración de aguas residuales y de potabilización para obtener agua de consumo.

Precisamente, la temática de la supervivencia de virus entéricos ha sido un tema estrella del grupo durante largo tiempo. Para un patógeno parásito intracelular obligado su capacidad para sobrevivir en las fases extracorpóreas es una cuestión crítica para determinar el riesgo asociado a su presencia en

un determinado tipo de muestra. En este campo, el Grupo de Virus Entéricos fue en 2001 el primer grupo de una universidad pública española en recibir la certificación oficial de cumplimiento de “Buenas Prácticas de Laboratorio” (BPL) en sus estudios de seguridad vírica (BPLI/0309/008/CAT), según RD 2043/1994. Seguimos validando la efectividad de técnicas emergentes de eliminación de virus. Dentro del proyecto Consolider-Ingenio 2010, Carnisenusa estamos evaluando la eficacia de tratamientos con haces de electrones acelerados y con pulsos lumínicos. El tratamiento mediante radiaciones ionizantes por electrones acelerados es limpio y no genera calor aunque se requieren altas dosis para eliminar virus como norovirus y virus de la hepatitis A. La tecnología de los pulsos lumínicos para la destrucción de microorganismos está todavía en vías de desarrollo. Introducida en la pasada década, consiste en emitir flashes de luz blanca en un espacio muy corto de tiempo (de 1 a 20 flashes por segundo) con una energía de 0,75 J/cm² por pulso. Los primeros datos obtenidos con este tratamiento son prometedores para la eliminación de norovirus y virus de la hepatitis A.

Todavía dentro de la temática de la supervivencia de virus en el medio ambiente llama la atención que virus teóricamente muy parecidos muestren una muy distinta estabilidad estructural. El ejemplo claro lo constituyen dos virus de la familia *Picornaviridae*: poliovirus y el virus de la hepatitis A. El primero se inactiva con relativa facilidad y el segundo es un virus muy resistente. Datos generados dentro de proyectos del Plan Nacional de Biotecnología “Diagnóstico molecular del virus de la hepatitis A y estudio de su variabilidad genética y estabilidad estructural” y “Mejoras en el diagnóstico cuantitativo del virus de la hepatitis A y avances para la producción de antígenos mediante la adaptación de sus estrategias replicativas y estructurales” nos han llevado a hipotetizar sobre la base molecular de este distinto comportamiento. De hecho el virus de la hepatitis difiere molecularmente en muchos aspectos de los otros miembros de la familia, entre otras cosas en su incapacidad para inhibir la síntesis de proteínas de la célula hospedadora y en un uso de codones muy descompensado y desoptimizado respecto al de la célula para evitar la competencia con la misma. El resultado de todo ello es el uso de codones infrecuentes y un control muy fino de la cinética de traducción, especialmente de la región genómica correspondiente a las proteínas estructurales del virus. Uno de los objetivos de este comportamiento sería asegurar un correcto plegamiento de las proteínas de la cápside vírica. Consecuencias de todo lo anteriormente expuesto son un ciclo multiplicativo muy lento y fuertes constricciones estructurales que hacen que hasta la fecha sólo se haya descrito un serotipo del virus de la hepatitis A (siendo una excepción dentro de la familia) y que la cápside de este virus sea extraordinariamente cohesiva lo que explicaría su extraordinaria estabilidad estructural y resistencia a la inactivación.

Aparte de los temas anteriormente mencionados el grupo sigue dedicándose activamente al estudio de la replicación de astrovirus, virus para los cuales todavía existen

muchas incógnitas y en los cuales nos hemos ganado un reconocimiento que nos ha conducido a ocupar la presidencia del grupo especializado correspondiente en el Comité de Taxonomía de Virus (ICTV). Por otro lado, también se llevan a cabo estudios de los mecanismos de inducción y respuesta a interferón in vitro por parte de norovirus y astrovirus, que son totalmente distintos entre sí.

LISTADO DE LAS PRINCIPALES PUBLICACIONES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS DE LA UB DE LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS (2005-2010)

Libros

- A. Bosch, (Editor). Human Viruses in Water. Dentro de la serie Perspectives in Medical Virology Series, vol. 17, A. J. Zuckerman; I. K. Mushahwar, series Eds., Elsevier, Amsterdam, 2007, ISBN - 978-0-444-52157-6.
- M. Koopmans, D. O. Cliver & A. Bosch (Editores). Foodborne Viruses: Progress and challenges. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, D.C., USA, 2008, ISBN - 978-1-55581-464-9.

Capítulos de libro

- A. Bosch, F.X. Abad & R.M. Pintó. Human pathogenic viruses in the marine environment. En “Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment”, S. Belkin, R. Colwell (Eds.), 2005. Springer, New York, NY, pp 109-131.
- A. Bosch, R.M. Pintó & F.X. Abad. Survival and transport of enteric viruses in the environment. En “Viruses in Food”, S. M. Goyal (Ed.). Food Microbiology and Food Safety Series, 2006. Springer, New York, NY, pp 151-187.
- S. Guix, A. Bosch & R.M. Pintó. Astrovirus replication. En: Structure-based study of virus replication. H.R. Cheng & T. Miyamura (Eds). Editorial World Scientific Publishing, Hackensack, N.J., USA, 2007, pp 571-595. ISBN 981-270-405-1.
- R. M. Pintó and A. Bosch. Rethinking virus detection in food. En “Foodborne Viruses: Progress and challenges” M. Koopmans, D. O. Cliver & A. Bosch (Eds). ASM Press, Washington, D.C., USA, 2008, pp 171-188, ISBN - 978-1-55581-464-9.
- A. Bosch, D.H. Lees, C.H. von-Bonsdorff, R.M. Pintó, L. Croci, D. De Medici & F.S. Le Guyader. Detecting virus contamination in shellfish. En “Improving seafood products for the consumer”, T. Borresen (Ed.) Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra, 2008, pp 194-211, ISBN-1-84569 019-2
- J. Quer, M. Martell, F. Rodriguez, A. Bosch, R. Jardi, M. Buti & J. I. Esteban. The impact of rapid evolution of hepatitis viruses. En “Origin and evolution of viruses”, 2n edition, E. Domingo, R. Webster & J. J. Holland (Eds). Academic Press, New York, 2008, pp 303-349, ISBN-13: 978-0-12-220360-2.
- A. Bosch, R.M. Pintó, & F.S. Le Guyader. Viral contaminants of molluscan shellfish. En “Shellfish Safety and Quality”, S. Shumway & G. Rodrick (Eds). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra, 2009, pp 83-107, ISBN-978-1-84569-152-3.
- A. Bosch, Steffen Mueller & R.M. Pintó. Coding Biases and Viral Fitness. En “The Picornaviruses”, E. Ehrenfeld, E. Domingo & R.P. Roos (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 2010, pp 271-283, ISBN-13: 978-1-55581-603-2.
- A. Bosch, S. Guix, N.K. Krishna, E. Méndez, S.S. Monroe, M. Pantin-Jackwood & S. Schultz-Cherry. Astroviridae. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2010. A.M.Q. King et al. (eds). Elsevier, London, New York (En Prensa).



El Grupo de Investigación de Virus Entéricos de la UB en febrero de 2010, de izquierda a derecha: Mari Costafreda, Fran Pérez-Rodríguez, Julián Andrés Cruz, Cristina Ferrer-Orta, Susana Guix, Nerea Beguiristain, Lucía D'Andrea, Cristina Fuentes, Anna Altisent, Rosa M Pintó y Albert Bosch.

Artículos

- S. Guix, S. Caballero, A. Bosch & R.M. Pintó. Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. *Virology*, 2005, 333: 124-131.
- S. Guix, A. Bosch & R.M. Pintó. Human Astrovirus Diagnosis and Typing: Current and future prospects. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41:103-105.
- F.X. Abad, A. Bosch & C. Navarro. Implementation of Good Laboratory Practice in a University Research Unit. *Quality Assurance Journal*, 2005, 9 : 304-311.
- M.I. Costafreda, A. Bosch & R.M. Pintó. Development, Evaluation and Standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for the Quantification of Hepatitis A Virus in Clinical and Shellfish Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 3846-3855.
- I. Abid, S. Guix, M. Aouni, R.M. Pintó & A. Bosch. Detection and characterization of human group C rotavirus in the pediatric population of Barcelona, Spain. *Journal of Clinical Virology*, 2006, 38: 78-82.
- W. Morsy El-Senousy, S. Guix, I. Abid, R.M. Pintó & A. Bosch. Astrovirus removal from water and sewage treatment plants evaluated by a competitive RT-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 164-167.
- R.M. Pintó, D. Alegre, A. Dominguez, W.M. El-Senousy, G. Sánchez, C. Villena, M. I. Costafreda, LL. Aragonès & A. Bosch. Epidemiology of hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiology and Infection*, 2007, 135: 270-273.
- G. Sánchez, A. Bosch & R.M. Pintó. Under the microscope: Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45: 1-5.
- R.M. Pintó, LL. Aragonès, M.I. Costafreda, E. Ribes & A. Bosch. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus (Review article). *Virus Research*, 2007, 127: 158-163.
- S. Guix, S. Caballero, C. Fuentes, A. Bosch & R.M. Pintó. Genetic analysis of the hypervariable region of the human astrovirus nsP1a coding region: design of a new RFLP typing method. *Journal of Medical Virology*, 2008, 80: 306-315.
- LL. Aragonès, A. Bosch & R.M. Pintó. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *Journal of Virology*, 2008, 82: 1688-1700.
- A. Kroneman, J. Harris, H. Vennema, E. Duizer, J. Gray, M. Iturriza, B. Böttiger, K. Mølbak, C. Johnsen, C-H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Kuusi, P. Pothier, A. Gallay, E. Schreier, J. Koch, G. Szücs, G. Reuter, K. Kristalovics, M. Lynch, P. McKeown, B. Foley, S. Coughlan, F.M Ruggieri, I. Di Bartolo, K. Vainio, E. Isakbaeva, M. Poljsak-Prijatelj, A. Hocevar Grom, A. Bosch, J. Buesa, A. Sanchez Fauquier, G. Hernández-Pezzi, K-O Hedlund & M. Koopmans. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *Journal of Public Health*, 2008, 30: 82-90.
- A. Bosch, S. Guix, D. Sano & R.M. Pintó. Review article. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19: 295-301.
- A. Kroneman, L. Verhoef, J. Harris, H. Vennema, E. Duizer, Y van Duynhoven, J. Gray, M. Iturriza, B. Böttiger, G. Falkenhorst, C-H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Kuusi, P. Pothier, A. Gallay, E. Schreier, M. Höhne, J. Koch, G. Szücs, G. Reuter, K. Kristalovics, M. Lynch, P. McKeown, B. Foley, S. Coughlan, F.M Ruggieri, I. Di Bartolo, K. Vainio, E. Isakbaeva, M. Poljsak-Prijatelj, A. Hocevar Grom, J. Zimsek Mijovski, A. Bosch, J. Buesa, A. Sanchez Fauquier, G. Hernández-Pezzi, K-O Hedlund & M. Koopmans. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46: 2959-2965.
- J. Gómez-Segura, S. Caballero, V. Moreno, M.J. Prieto & A. Bosch. Palladium(II) Binding to N(7) of Acyclovir. DNA interaction and Herpes Simplex virus (HSV-1) inhibitory activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, 103: 128-134.
- F.S. Le Guyader, S. Parnaudeau, J. Schaeffer, A. Bosch, F. Loisy, M. Pommepuy & R.L. Atmar. Detection and quantification of norovirus in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 2009, 75: 618-624.
- C. Tortajada, P. G. de Olalla, R. M. Pinto, A. Bosch & J. Caylà. Outbreak of hepatitis A among men who have sex with men in Barcelona, Spain, September 2008 – March 2009. *Eurosurveillance*, 2009;14(15). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19175>
- M.L. Sagristá, F. Postigo, M. A. de Madariaga, R.M. Pintó, S. Caballero, A. Bosch, M.A. Vallés & M. Mora. Photodynamic inactivation of viruses by immobilized chlorin-containing liposomes. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2009, 13: 1-11.
- R.M. Pintó, M.I. Costafreda & A. Bosch. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 7350-7355.
- D. Sano, R.M. Pintó, T. Omura & A. Bosch. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44: 808-812.
- LL. Aragonès, S. Guix, E. Ribes, A. Bosch & R.M. Pintó. Fine-Tuning Translation Kinetics Selection as the Driving Force of Codon Usage Bias in the Hepatitis A Virus Capsid. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(3): e1000797. doi:10.1371/journal.ppat.1000797
- A. Bosch & F.S. Le Guyader (Guest Editors). Special Issue: Viruses in Shellfish. *Food and Environmental Virology* 2010, 2: 115-193.
- R.M. Pintó, M.I. Costafreda, F.J. Pérez-Rodríguez, L. D'Andrea & A. Bosch. Hepatitis A virus: State of the art. *Food and Environmental Virology* 2010, 2: 127-135.