



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

I N S T I T U T O D E B I O T E C N O L O G I A

DETERMINACION DE LA PREVALENCIA Y
DIVERSIDAD GENOTIPICA DE ASTROVIRUS DE
HUMANO (AstH) EN MEXICO Y AISLAMIENTO Y
CARACTERIZACION MOLECULAR DE
UNA CEPA DE ESTOS VIRUS

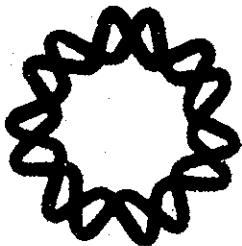
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

MARTHA MENDEZ TOSS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuernavaca, Morelos

Septiembre, 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos F. Arias Ortiz. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de una beca complemento de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México (1997 - 2000); una beca completa de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (1997 - 2001); y, una beca del Instituto de Medicina de Howard Hughes (2001 - 2002).

*A mi Ma, por todo lo que su corazón encierra,
por que una palabra suya ilumina todo mi ser.*

Te amo

*A mi Pa, por el cariño y apoyo de siempre,
su filosofía y ese ejemplo continuo de superación a seguir.*

Te amo.

*A mis hijos, por alumbrar mi camino y ser la esperanza de mi ser,
por su paciencia y comprensión en las buenas y en las malas, por enseñarme a crecer,
por existir. . . Los amo.*

*A Sandra, Darío, Marlene, Manuel y Gianna, por el cariño de hermanos que nos une,
por estar siempre conmigo y compartir mi sentir.*

*A Svieta, Jesús, Caroline, Luis y María de Jesús,
por la gran amistad y el cariño que nos unen, por los inolvidables y maravillosos
momentos compartidos y por su confianza en mí*

*A Shirley, por los grandes valores que su ser encierra,
por su invaluable solidaridad.*

A Froylán, por ayudarme a retomar el maravilloso camino de la ciencia.

A la vida , . . .

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi comité tutorial.

Dr. José Luis Puente García

Dr. Celso Ramos García

Dr. Carlos Arias Ortiz

Por sus comentarios y sugerencias, por haberme curtido para llegar al fin

A José Luis por su amabilidad y paciencia, por esas palabras de aliento; a Celso, por esas pláticas donde aprendí que los fracasos sirven para crecer; a Carlos, por todas sus enseñanzas, por su apoyo y por ese carisma especial que invita a salir siempre adelante

A los miembros del Jurado por sus comentarios y por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Dr. Edmundo Calva Mercado

Dr. Carlos F. Arias Ortiz

Dra. Lourdes Guitiérrez Xicoténcatl

Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

Dr. Alejandro Alagón Cano

Dra. Alejandra Bravo de la Parra

A Susana y Carlos por el tiempo compartido con ellos y sus grupos, por sus consejos y sabias palabras, por la gran admiración que por ellos siento.

A todas las personas que han sido y/o siguen siendo del grupo Arias-López, por el gusto de haber convivido con ustedes, por todos los momentos compartidos en nuestra casa-laboratorio y en las reuniones, porque de cada uno aprendí algo bueno y quedó en mi un grato recuerdo.

A todos los seres que conocí en el IBT y fuera de él, durante estos años de trabajo, porque de alguna manera todos forman parte del extraordinario rompecabezas de mi vida.

INDICE

	Página
RESUMEN	2
SUMMARY	5
INTRODUCCION	8
1. Genoma y proteínas de los AstH	12
2. Serotipos y genotipos de AstH	15
3. Patología	17
4. Epidemiología de los AstH	17
4.1 Prevalencia y distribución geográfica de los serotipos de AstH	21
JUSTIFICACION	25
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y METODOS	29
RESULTADOS	42
1. Determinación de la prevalencia y diversidad genotípica de los astrovirus de humano (AstH) en México	42
1.1 Artículo I	63
2. Aislamiento y caracterización molecular del genoma de una cepa de AstH	92
2.1 Artículo II	94
RESULTADOS ADICIONALES :	
Caracterización de la vía del procesamiento del precursor de las proteínas estructurales de la cepa de AstH Yuc-8	102
Artículo III	108
DISCUSION	116
PERSPECTIVAS	132
BIBLIOGRAFIA	134

RESUMEN

Los astrovirus de humano (AstH) se encuentran entre los principales agentes de diarrea viral infantil ocupando el segundo lugar en importancia médica, después de los rotavirus. En el presente trabajo se evaluó la prevalencia de estos virus en niños mexicanos, con y sin diarrea, provenientes de cinco ciudades: Monterrey, Mérida, Tlaxcala, San Luis Potosí y la Ciudad de México. Durante el periodo evaluado, de octubre de 1994 a marzo de 1995, los AstH se encontraron presentes en las cinco localidades, con una prevalencia general del 5.4% en los niños con diarrea y del 2.5% en los niños sin diarrea.

Los AstH se han clasificado en ocho serotipos diferentes: AstH-1 a 8, que correlacionan enteramente con los ocho grupos génicos (genotipos) determinados en base a una región de 348 pb del extremo 5' del ORF2. El serotipo 1 está considerado como el serotipo de mayor prevalencia y distribución geográfica en el mundo. En el presente estudio, se detectó la presencia de seis (AstH-1 a 4, 6 y 8) genotipos de AstH, determinados en base a una región de 183 pb del extremo 3' del ORF2. Se observó que la prevalencia de cada uno de ellos varió de una región a otra. Los genotipos 1 y 3 fueron los más prevalentes, aunque no se detectaron en todas las regiones estudiadas. A estos genotipos les siguieron, en prevalencia, los genotipos 2 y 4, el genotipo 8 y, finalmente, el genotipo 6. Sobresale la presencia del genotipo 8, cuyo respectivo serotipo (HAst-8) está considerado como raro. Los virus de genotipo 8 se encontraron presentes en la ciudad de Mérida con una prevalencia del 40%.

Dado el interés que existe en nuestro laboratorio por el estudio de la biología molecular de los astrovirus, se aisló en una línea celular, CaCo-2, una cepa de AstH que fué denominada Yuc-8. La caracterización molecular de su genoma mostró que éste está constituido por 6759 bases, seguidas por una cola de poli(A); tiene en sus extremos 5' y 3' regiones no traducidas de 83 y 85 nucleótidos, respectivamente; y, está organizado en tres marcos de lectura abierta (ORFs): el ORF 1a que codifica para la proteasa viral; el ORF 1b que codifica para la polimerasa viral; y, el ORF 2 que codifica para el precursor (VP90) de las proteínas estructurales del virus. El genoma de Yuc-8 tiene la organización genómica característica de los miembros de la Familia *Astroviridae*

La comparación de las secuencias de los precursores de las proteínas no estructurales de Yuc-8 con las secuencias respectivas existentes de otros AstH, mostró que la poliproteína del ORF 1a carece de 15 aminoácidos en su extremo carboxilo terminal. Esta ausencia de 15 aminoácidos se ha asociado con la adaptación de los AstH a su cultivo en líneas celulares diferentes a la de CaCo-2.

La comparación de la secuencia de la poliproteína VP90 de Yuc-8 con las secuencias existentes de los precursores de las proteínas estructurales de los diversos serotipos de AstH, mostró que Yuc-8 es un AstH de serotipo 8. Además, se observó que la región amino terminal (residuos 1 a 415) de esta poliproteína está muy conservada (> 81% de identidad) entre los diferentes serotipos de AstH, mientras que la región carboxilo terminal (residuos 416 a 782) es muy variable (de 36 a 60% de identidad). Los árboles filogenéticos, generados por separado, de estos dos dominios

son diferentes, por lo cual, es probable que la poliproteína VP90 se encuentre sujeta a una presión selectiva diferencial.

Por otro lado, se participó también en la caracterización de la vía del procesamiento de la poliproteína VP90 de Yuc-8. Se encontró que esta poliproteína se procesa intracelularmente, en su extremo carboxilo terminal, para dar origen a la proteína VP70. Esta última, al ser tratada con tripsina, da origen a las proteínas VP41 y VP28 que corresponden a los extremos amino y carboxilo terminales, respectivamente, de VP70. A partir de las proteínas VP41 y VP28 se originan las proteínas VP34, VP27 y VP25 que, al parecer, son los productos finales del procesamiento de VP90 y se encuentran presentes en los viriones maduros.

SUMMARY

Human Astroviruses (HAstV) are the second most important infantile diarrhea viral agent, after rotaviruses. In the present work, HAstV prevalence was evaluated in Mexican children less than five years old with or without diarrhea from five cities: Monterrey, Mérida, Tlaxcala, San Luis Potosí, and Mexico City. It was found that, from October 1994 to March 1995, HAstV were present in all of the five studied locations showing a prevalence rate of 5.4 and 2.5% in children with or without diarrhea, respectively.

HAstV have been classified in eight different serotypes (serotypes 1 to 8) which entirely correlate with the eight established genetic groups (genotypes) that have been determined using a 348bp ORF2 region. Serotype 1 is the most prevalent and widely distributed around the world. In this study, there were identified six different (1 to 4, 6 and 8) genotypes. It was observed that HAstV genotype prevalence varied from one region to another. Genotypes 1 and 3 were the most prevalent found genotypes even though they were not present in all the studied locations, followed by genotypes 2 and 4, genotype 8, and finally genotype 6. The presence of genotype 8 which corresponds to serotype HAstV-8 is considered as a rare type and stands out. Genotype 8 HAstV were found in the region of Merida, Yuc. with a prevalence rate of 40%.

Given that there is a great interest in our laboratory to study the molecular biology of HAstV, there was isolated one HAstV strain which was named Yuc-8. The molecular characterization of its genome showed that it contains 6759 bases,

followed by a poly(A) tail; it has 5' and 3' end non translated regions of 83 and 85 nucleotides, respectively; it is organized into three open reading frames (ORFs): ORF 1a which codifies for the viral protease; ORF 1b which codifies for the viral polymerase; and ORF 2 which codifies for the structural proteins precursor (VP90). The Yuc-8 genome shows the typical genomic organization of the Family *Astroviridae*.

Sequence comparison analysis of Yuc-8 ORFs 1a and 1b region sequence with the four existent HAstV sequences showed that ORF 1a polyprotein has a 15 amino acid deletion within its carboxi terminus, which has been associated with HAstV adaptation to grow in cells other than Caco-2.

Sequence comparison analysis of Yuc-8 VP90 polyprotein with reported structural proteins precursors sequences for the different serotypes, showed that Yuc-8 is a serotype 8 HAstV. It was also observed that VP90 amino-terminal domain (residues 1 to 415) is highly conserved (> 81 % identity) among the different HAstV serotypes, while VP90 carboxy-terminal domain (residues 416 to 782) is highly variable (identities between 36 and 60 %). The phylogenetic trees of these domains, which were generated separately, are non-superimposable suggesting that a differential selection pressure is exerted along the VP90 polyprotein.

On the other hand, in this work it is also shown the participation in the study of Yuc-8 VP90 polyprotein proteolytic processing. It was found that VP90 is cleaved intracellularly at its carboxy terminus to yield a protein of 70 kDa (VP70). When VP70 is treated with trypsin it is processed to yield the proteins VP41 and VP28

which represent the VP70 amino and carboxy terminus, respectively. Afterwards, VP41 and VP28 are cleaved to yield proteins VP34, VP27 and VP25 which seem to be the final products of VP90 proteolytic processing and are present in mature viruses.

INTRODUCCION

La diarrea viral ocurre en todo el mundo afectando principalmente a niños menores de cinco años de edad. Entre los principales agentes etiológicos de esta enfermedad se encuentran los adenovirus entéricos de serotipo 40 y 41 (AdH), los astrovirus (AstH), los calicivirus (CaH) y los rotavirus (RvH) de humano.

Los AstH están considerados como una causa frecuente de diarrea infantil en todo el mundo y ocupan el segundo lugar en importancia médica, después de los rotavirus (16, 17, 48, 60).

Los AstH fueron asociados por primera vez con la diarrea infantil en 1975, durante un estudio en el que se analizaron, por microscopía electrónica, muestras de heces provenientes de neonatos con diarrea (1). Al analizar la morfología de las partículas virales, de aproximadamente 27 nm de diámetro, se observó que algunas de ellas presentaban una morfología de estrella de cinco o seis picos (Fig. 1) por lo cual se les dió el nombre de *astrovirus* (35).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

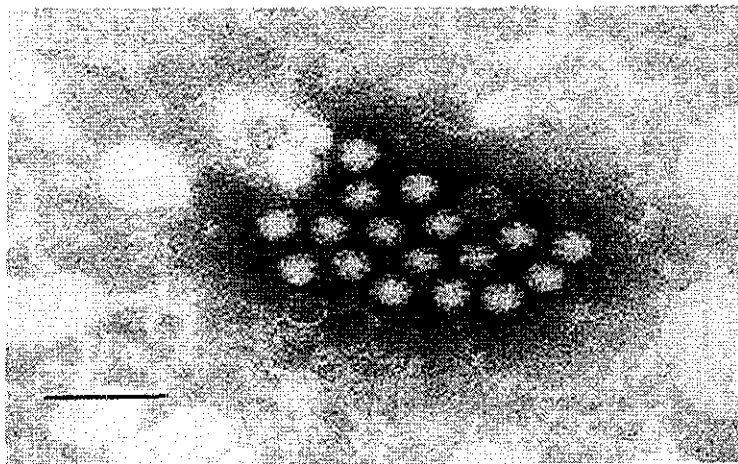


Fig. 1. AstH, de una muestra de heces, vistos por microscopía electrónica. La barra corresponde a 100 nm (38).

El aislamiento de los AstH no fue inmediato a su descubrimiento. Tuvieron que pasar algunos años para que los investigadores Lee, T.W. y Kurtz, J. B. logaran cultivarlos (29). Estos agentes virales se aislaron originalmente en células primarias de riñón de embrión de humano (HEK), después de lo cual se adaptaron a crecer en la línea celular LLCMK2 - células de riñón de mono rhesus. Durante este proceso, se demostró que la presencia de tripsina en el medio de cultivo es indispensable para mantener la replicación productiva del virus (29). Aproximadamente diez años después, en 1990, se demostró que la línea celular CaCo-2, derivada de células de carcinoma de colon de humano, es susceptible a la infección por AstH provenientes de muestras de heces y que en ella es posible cultivarlos (73).

Recientemente, en un estudio de análisis estructural en el que se utilizó la criomicroscopía electrónica, se detectaron algunas características únicas de la superficie de los AstH que no se habían podido apreciar en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica. Las imágenes de AstH purificados, a partir de un cultivo celular infectado con estos virus, mostraron partículas esféricas de tamaño uniforme con unas espículas en la superficie claramente visibles. La reconstrucción tridimensional de estas imágenes mostró una superficie de apariencia sólida y ligeramente ondulada, con un diámetro de 330 Å sobre la cual se proyectan, aproximadamente a 50 Å de la superficie, 30 espículas (Fig. 2) (39).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

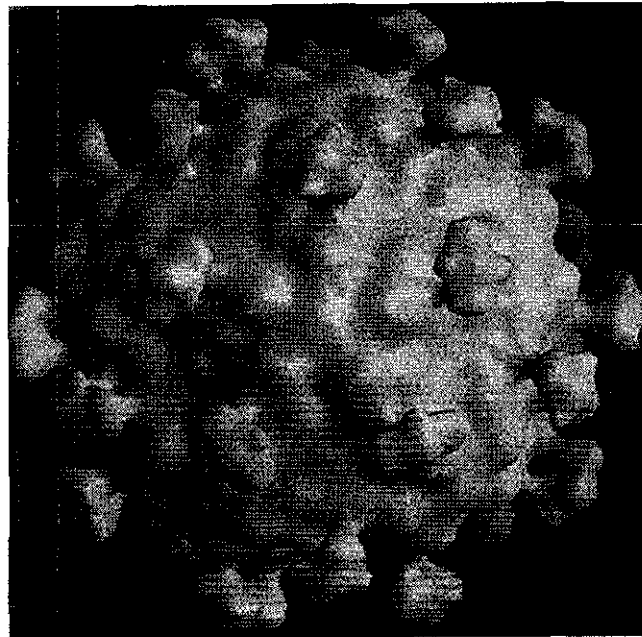


Fig.2. Imágen de una partícula de AstH obtenida por criomicroscopía electrónica (39).

Los AstH son partículas formadas por una capa de proteínas dentro de la cual se encuentra envuelto el genoma viral, constituido por una molécula de ácido ribonucleico (RNA) (38).

Estos virus fueron clasificados, en 1993, en una nueva Familia: *Astroviridae*, la cual comprende únicamente al género *Astrovirus*. Dentro de este género se incluyen, además de los AstH, los astrovirus aislados de otras especies animales (45, 58):

Familia:

Astroviridae

Género:

Astrovirus

Astrovirus conocidos:

Astrovirus de humano

Astrovirus de bovino

Astrovirus de felino

Astrovirus de pato

Astrovirus de ovino

Astrovirus de porcino

Astrovirus de pavo

1. Genoma y proteínas de los AstH

El genoma de los AstH está constituido por una molécula de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva (Fig. 3A). La longitud de los genomas de AstH varía entre 6771 y 8815 nucleótidos, dependiendo de la cepa de AstH analizada. En el banco de genes GenBank se encuentran reportadas las secuencias completas de los genomas de cinco cepas de AstH (Números de acceso: L23513, Z25771, L13745, AF141381, AF260508), la última de las cuales fue reportada por nuestro laboratorio (ver más adelante artículo II).

El genoma de los AstH está organizado en tres marcos de lectura abierta (ORFs): 1a, 1b y 2. En su extremo 5' contiene una región no traducida de aproximadamente 86 nucleótidos y en su extremo 3' una de aproximadamente 85 nucleótidos (la longitud de las regiones no traducidas varía ligeramente de una cepa a otra) a la cual le sigue una región de poli(A) (Fig. 3B) (21, 71).

Los ORFs 1a y 1b codifican para las proteínas no estructurales del virus. En el ORF 1a se encuentra codificada la proteasa viral (Pro) y existe una región codificadora para una posible señal de localización nuclear (SLN), mientras que en el ORF 1b se encuentran motivos de polimerasa viral de RNA dependiente de RNA (Pol) (21, 71). Los ORFs 1a y 1b se sobrelapan por 70 nucleótidos; en esta región se encuentra una señal de cambio de marco de lectura ribosomal de -1 (Fig. 3B), constituida por un heptámero de deslizamiento (AAA AAA C) corriente abajo del cual se encuentran secuencias capaces de formar una estructura de tallo-asa (32-34, 37). La expresión de estos dos ORFs se da a partir del RNA genómico, que funciona

como RNA mensajero para la traducción de las proteínas codificadas en ellos. El producto de la traducción del ORF 1a es una poliproteína de aproximadamente 108 kDa (Fig. 3C) (21, 70). El ORF 1b se traduce, únicamente cuando se da el cambio de marco de lectura ribosomal de -1, como una poliproteína de fusión, de aproximadamente 169 kDa, que abarca tanto al producto del ORF 1a como al del ORF 1b (Fig. 3C) (21, 70).

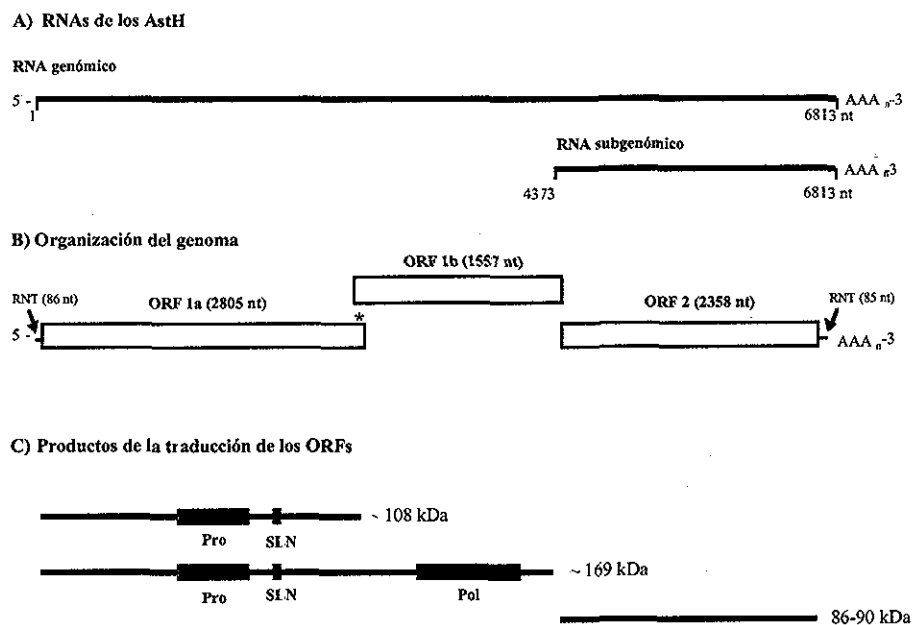


Fig. 3. Genoma de los AstH (en base a la secuencia de la cepa Newcastle de AstH-1). **A)** RNA genómico y subgenómico de los AstH. **B)** Organización del genoma de los AstH. El genoma se encuentra dividido en tres marcos de lectura abierta (ORFs 1a, 1b y 2), contiene dos regiones no traducidas (RNT) localizadas en los extremos 5' y 3' (indicadas con flechas) y una región de poli(A) en el extremo 3'. El asterisco (*) en el extremo 3' del ORF 1a indica la región de cambio de marco de lectura ribosomal. **C)** Productos de la traducción de los ORFs 1a, 1b y 2. Las regiones señaladas con rectángulos oscuros dentro de las poliproteínas indican la localización de los diferentes motivos en ellas encontrados: proteasa de serina de tipo 3C (Pro), señal de localización nuclear (SLN), polimerasa viral (Pol).

célula (3). En los virus purificados y tratados con tripsina se ha encontrado, de manera consistente, la presencia de tres proteínas de aproximadamente 34, 29 y 26 kDa (VP34, VP29 y VP26, respectivamente) (3, 61). Las proteínas VP29 y VP26, de una cepa de AstH-2, se generan por el corte de la poliproteína del ORF2 en los residuos de arginina 361 y 395, respectivamente (61). A pesar del avance en el conocimiento sobre los AstH, se ignora aún cuántas proteínas conforman a estos virus y cuál es la vía del procesamiento de su precursor.

2. Serotipos y genotipos de los AstH

La diversidad serotípica de los virus se establece de acuerdo a los antígenos virales, capaces de inducir la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes en el organismo infectado. Los serotipos (tipos antigénicos) de los AstH se han definido históricamente a partir de diversos ensayos inmunológicos, como son la inmunomicroscopía electrónica, los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) específicos de serotipo, los ensayos de inmunofluorescencia de células infectadas y los ensayos de neutralización (24, 28, 52). Los antisueros de conejo específicos de serotipo, generados por los Doctores John Kurtz y Terry Lee en el laboratorio de Salud Pública de Oxford, Reino Unido, se han utilizado como reactivos de referencia para la mayoría de los diferentes ensayos (25, 28). Se han caracterizado por completo ocho serotipos de AstH (24, 28, 64).

Serotipos de AstH:

AstH-1

AstH-2

AstH-3

AstH-4

AstH-5

AstH-6

AstH-7

AstH-8

Con el desarrollo de los ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción reversa (RT-PCR), surgió la posibilidad de tipificar a las cepas de AstH mediante el análisis comparativo de la información de la secuencia nucleotídica. La utilidad de este enfoque surgió cuando se demostró que los tipos génicos (genotipos) de AstH, determinados en base al análisis filogenético de las secuencias, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, de una región del dominio amino terminal del ORF 2, correlacionan precisamente con los tipos antigénicos de AstH, determinados por EIAs específicos de serotipo (52). Posteriormente, se determinó que también los genotipos de AstH, determinados en base al análisis filogenético de una región del extremo carboxilo terminal del ORF 2, correlacionan enteramente con sus respectivos tipos antigénicos (44). Así, al determinar el genotipo de los AstH, en base a las secuencias del ORF2, se puede inferir su serotipo correspondiente.

3. Patología

La enfermedad ocasionada por los AstH es, en general, una diarrea de severidad mediana. Esta enfermedad se presenta con vómito, fiebre, anorexia y, en algunos casos, con deshidratación severa. La duración de los síntomas clínicos es, en promedio, de 5 a 7 días pero puede prolongarse por periodos de hasta un mes o más (16, 38).

Los astrovirus de bovino no causan diarrea. Sin embargo, estos virus son capaces de infectar las células M del intestino delgado que cubren las placas de Peyer (75). En los borregos, que presentan diarrea de manera similar a los humanos, se ha encontrado al virus replicándose en los enterocitos maduros en las puntas de las vellocidades del intestino delgado.

4. Epidemiología de los AstH

La caracterización del comportamiento epidemiológico de los AstH ha sido relativamente lenta. Desde el año de su descubrimiento (1975) hasta principios de los años 90 la única técnica disponible para la detección de estos virus en muestras clínicas fue la microscopía electrónica que, a pesar de ser muy valiosa, resulta poco útil para el diagnóstico de los AstH en estudios epidemiológicos amplios. Los avances en el conocimiento de los AstH, particularmente su aislamiento en cultivo de células y la secuenciación de su genoma completo, han hecho posible la obtención de

herramientas moleculares sensibles y específicas para su detección. Actualmente, los métodos más utilizados para el diagnóstico de los AstH durante los estudios epidemiológicos son los EIAs y la RT-PCR (17, 36, 48, 52, 60).

Los AstH afectan del 2% al 16% de los niños con diarrea (sintomáticos) hospitalizados (9, 14, 55, 57, 62, 65) y del 7.6% al 17% de los niños sintomáticos de las comunidades estudiadas (10, 36, 56).

En algunos estudios recientes, realizados en diferentes partes del mundo (China, Chile, Francia, Finlandia), se investigaron las causas de la diarrea infantil tanto en niños que, por la severidad de la misma, solicitaron ayuda médica y/o fueron hospitalizados, como en niños de la comunidad (9, 14, 57, 63). En estos estudios se definió el papel de los principales agentes virales (rotavirus, calicivirus, astrovirus y adenovirus 40/41) en esta enfermedad.

El estudio realizado en China (57) se llevó a cabo, durante el periodo de Noviembre de 1994 a Agosto de 1996, en niños menores de cinco años de edad hospitalizados por diarrea severa en Beijin. En las muestras de heces se determinó la presencia de los rotavirus (RT-PCR), calicivirus (RT-PCR), astrovirus (microscopía electrónica) y adenovirus (microscopía electrónica) y se encontró que los AstH fueron el segundo agente viral más común, después de los rotavirus, encontrándose presentes en el 8% de los niños hospitalizados.

En Chile, la frecuencia de la infección por astrovirus se determinó, por EIA y RT-PCR, en niños con diarrea que fueron atendidos en unidades de emergencia y en

niños hospitalizados por diarrea aguda. La presencia de los AstH se identificó en el 15% y 6% de las muestras negativas y positivas para RvH, respectivamente, de los niños atendidos en las unidades de emergencia; y, en el 20% y 8% de las muestras positivas y negativas para RvH, respectivamente, de los niños hospitalizados (14). En Finlandia (56), los AstH fueron detectados por RT-PCR en el 9% de los episodios de diarrea infantil severa mientras que en Francia, por EIA y RT-PCR, en el 6.3% (9).

En Bangkok, Tailandia, los AstH fueron identificados por EIA con una prevalencia del 8.6% en los niños menores de cinco años de edad que fueron atendidos en clínicas de consulta externa (19).

En Melbourne, Australia, durante un periodo de cuatro años, se encontró por hibridación por Northern que, en general, la prevalencia de AstH en niños hospitalizados con diarrea severa fue del 3.0%. Sin embargo, ésta varió de un año a otro desde 1.4 hasta 4.4% (48, 55).

En un estudio realizado en Japón, se evaluó la prevalencia de AstH (RT-PCR) en niños que fueron hospitalizados por diarrea severa, en cinco regiones localizadas a lo largo del país. La prevalencia total de estos virus fue del 5.9%, variando desde un 0.5% en el sudoeste (Kurume) hasta un 10.4% en el noreste (Sapporo) (60).

La prevalencia de los AstH en niños de la comunidad abierta se ha determinado, por EIA, en tres regiones del mundo: Santa María de Jesús, Guatemala,

donde se encontró que los estos virus estuvieron presentes en el 7.6% de los niños con diarrea (10); en San Pedro Mártir, D.F., México, donde el 7% de los niños sintomáticos tuvo infección por AstH (17, 67); y, en Navenchauc, Chiapas, México, donde el 17% de las diarreas infantiles estuvieron asociadas con AstH (36).

Las infecciones por AstH entre los niños hospitalizados también son comunes. Un estudio realizado en Stanford, California, demostró que el 10% de los niños hospitalizados con diarrea severa presentó infección por AstH y que la mitad de éstas infecciones fueron nosocómicas (62). Los AstH también se han asociado con diarrea persistente en niños menores de cinco años de edad (65) y con epidemias de diarrea en niños localizados en diferentes ambientes, como pabellones pediátricos (13, 48), guarderías infantiles (30, 41, 43), jardines de niños y escuelas (42). Los AstH ocasionan también grandes epidemias entre adultos (8, 53) y afectan a personas inmunocomprometidas (11, 12).

En algunos de estos estudios también se evaluó la prevalencia de AstH, en niños sin diarrea (asintomáticos), menores de cinco años de edad, y se encontró que esta fue de alrededor del 2.0% (9, 10, 19, 65).

4.2 Prevalencia y distribución geográfica de los diferentes serotipos de AstH.

La prevalencia y diversidad de los serotipos de AstH se han evaluado en diversas regiones del mundo (Tabla 1). Los métodos principales que se han utilizado para la determinación de los serotipos de AstH son los EIAs y/o la RT-PCR con cebadores específicos para cada uno de los serotipos y/o en combinación con el análisis de la secuencia de la región del ORF2 amplificada. También se han utilizado tanto la inmunomicroscopía electrónica como la hibridización por Northern (Tabla 1).

El serotipo 1 de AstH, en general, es el serotipo más prevalente y el de mayor distribución geográfica. Sin embargo, los estudios prospectivos (con una duración de 2 a 5 años) mostraron que la prevalencia del serotipo 1 varía de una región a otra (Tabla 1), y dependiendo del año estudiado. Los serotipos 2, 3 y 4 siguen en importancia al serotipo 1. Estos serotipos, en algunas regiones como Barcelona (España) (18), Londres y Oxford (Inglaterra) (28, 51), Ciudad de México, México (67) y Maizuru, Japón (60), han desplazado al serotipo 1 en determinados años que varían dependiendo de la región analizada. El serotipo 5 es menos común pero se le ha detectado en cuatro de los cinco Continentes, mientras que los serotipos 6, 7 y 8 son los más escasos (Tabla 1).

Lugar	Periodo	Método	No de cepas	Serotipos y/o genotipos de AstH (prevalencia en %)							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Australia, (Melbourne) (48)	1995-1998	RT-PCR ^{S-1}	39	77	3	0	18	0	0	0	3
Bangladesh (65)	?	EIA	23	57	9	4	17	9	0	4	nd
Colombia (Bogotá) (40)	1977-1999	RT-PCR ^{S-1}	10	50	30	10	10	0	0	0	0
Chile (Santiago) (14)	1993-1995 1985-1987	EIA	22	58	20	0	8	0	0	0	nd
Egipto (Abu Homos) (50)	1995-1998	RT-PCR ^{S-1}	82	44	4	12	5	16	7	0	12
España (Barcelona) (18)	1997-2000	RT-PCR ^{S-1}	49	38	6	19	26	0	0	0	11
EUA (Stanford, Calif) (62)	1996-1997		18	83	11	6	0	0	0	0	nd
Inglaterra (25)	1974-1984	IF/IME	73	77	5	7	6	5	nd	nd	nd
Inglaterra (Londres) (51)	1981-1993	IME/EIA	125	86	<1	8	6	0	nd	nd	nd
Inglaterra (Oxford) (28)	1976-1992	IF/IME	291	65	11	9	11	2	<1	<1	nd
Japón (Kurume) (60)	1995-1997	RT-PCR ^{S-2}	1	100	0	0	0	0	0	0	0
Japón (Maizuru) (60)	1995-1998	RT-PCR ^{S-2}	50	76	0	24	0	0	0	0	0
Japón (Osaka) (60)	1997-1998	RT-PCR ^{S-2}	8	75	0	0	25	0	0	0	0
Japón (Sapporo) (60)	1995-1998	RT-PCR ^{S-2}	17	94	0	6	0	0	0	0	0
Japón (Tokyo) (60)	1995-1998	RT-PCR ^{S-2}	6	83	0	17	0	0	0	0	0
México (San Pedro Mártir, D.F) (67)	1988-1991	EIA / RT-PCR ^{S-2}	18	10	42	13	23	6	nd	6	nd

Tabla. 1. Prevalencia de los serotipos AstH en diversas regiones del mundo. EIA - ensayo inmunoenzimático para la determinación de los serotipos de AstH; IF - ensayo de inmunofluorescencia de células infectadas para la determinación de los serotipos de AstH; IME - inmunomicroscopía electrónica para la determinación de los serotipos de AstH; S-1 - amplificación del fragmento correspondiente a la región conservada del ORF2 (52); S-2 - amplificación del extremo 3' terminal del ORF2; nd - genotipo y/o serotipo no determinado.

Como se aprecia en la Tabla 1, el estudio de la diversidad serotípica de los AstH ha mostrado que en una misma región pueden circular más de dos serotipos de AstH, durante un periodo de tiempo determinado.

En resumen, podemos decir que:

- a) Los astrovirus de humano se encuentran ampliamente distribuidos alrededor del mundo ocasionando, en general, entre un 2 y 10% de las diarreas infantiles.
- b) La coexistencia de más de un serotipo de AstH en una determinada región es común.
- c) El serotipo de AstH identificado con mayor frecuencia ha sido el 1, sin embargo, su prevalencia varía de una región a otra y dependiendo del año estudiado.
- d) La presencia de AstH en niños sin diarrea es común, sin embargo, no existen datos acerca de los serotipos de AstH presentes en estos niños ni se ha evaluado si existe alguna asociación entre la presencia o ausencia de síntomas diarreicos y el serotipo de AstH presente en ellos.

- e) La organización del genoma de estos virus es muy particular por lo que se les clasificó dentro de su propia familia, *Astroviridae*.

- f) Se conoce muy poco acerca del ciclo de replicación de estos virus así como de las proteínas que forman parte de los viriones maduros.

JUSTIFICACION

La diarrea viral es una enfermedad que afecta a niños de todo el mundo, la cual no ha podido ser eficazmente controlada. Para establecer métodos de control, es importante aumentar nuestro conocimiento sobre el comportamiento epidemiológico de los agentes etiológicos que la ocasionan; su diversidad serotípica y; su biología molecular.

Los astrovirus de humano están considerados como el segundo agente etiológico, después de los rotavirus, de diarrea viral infantil. En México, se comenzó a evaluar recientemente el comportamiento epidemiológico de estos virus. Sin embargo, la información con la que se cuenta abarca solamente a dos localidades del país y los resultados obtenidos difieren uno del otro. En nuestro laboratorio se cuenta con una colección de muestras de heces provenientes de niños menores de cinco años de edad, que se colectaron en cinco ciudades (Ciudad de México, Tlaxcala, San Luis Potosí, Mérida y Monterrey) durante un periodo de seis meses. En esta colección se evaluó, en un estudio previo, la prevalencia y diversidad serotípica de los rotavirus y ofrece la posibilidad de utilizarla para identificar otros agentes virales causantes de diarrea como los AstH y los adenovirus 40/41.

El genoma de los AstH está formado por una molécula de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva y organizado en tres marcos de lectura abierta (ORF 1a, 1b y 2). El ORF2 codifica para la poliproteína precursora de las proteínas estructurales del virus las cuales se sintetizan a partir de un RNA subgenómico que se produce

durante la replicación del virus. En general, el conocimiento sobre la biología molecular de los AstH es escaso. Se ha establecido la existencia de ocho serotipos de AstH, de los cuales sólo se conoce la secuencia del genoma completo de tres de ellos (AstH-1, 2 y 3). Se desconoce cuáles son las vías del procesamiento de las poliproteínas virales (estructurales y no estructurales) que se sintetizan durante una infección y no se ha podido establecer cuáles son sus productos finales. Para poder ampliar el conocimiento sobre la biología molecular de estos virus, es necesario contar con una cepa adaptada a crecer en cultivo de células.

OBJETIVOS

1. Estudiar la prevalencia y diversidad genotípica de los astrovirus de humano (AstH) en México durante el periodo de octubre de 1994 a marzo de 1995.

1 a. Determinar la prevalencia de AstH en muestras de heces de niños menores de cinco años de edad con y sin diarrea provenientes de la Ciudad de México, San Luis Potosí, Tlaxcala, Mérida y Monterrey.

1.b. Determinar los genotipos de las cepas de AstH identificadas y su distribución geográfica.

1.c. Determinar si existe correlación entre la presencia o ausencia de síntomas diarreicos y el genotipo de AstH infectante.

2. Aislar y caracterizar una cepa de AstH representativa de algún genotipo particular de México.

2.a. Aislar en células Caco-2 una cepa de AstH.

2.b. Caracterizar molecularmente la cepa aislada.

En la primera parte del presente trabajo se reportan los resultados de un estudio epidemiológico en el que se evaluó, durante el periodo comprendido de octubre de 1994 a marzo de 1995, la prevalencia y diversidad serotípica de los AstH en niños menores de cinco años de edad, con y sin diarrea, provenientes de cinco localidades de México: Ciudad de México, San Luis Potosí, Tlaxcala, Mérida y Monterrey.

En la segunda parte, se muestran los resultados del aislamiento de una cepa de AstH de genotipo 8 (Yuc-8), obtenida a partir de una muestra de heces proveniente de un niño de la ciudad de Mérida. Asimismo, se presentan los resultados de la caracterización molecular del genoma de Yuc-8.

Finalmente, como resultados adicionales, se presenta la caracterización de la vía del procesamiento del precursor de las proteínas estructurales codificado por el ORF2, de la cepa de AstH Yuc-8.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de heces.

Las muestras de heces se obtuvieron tanto de niños menores de cinco años de edad, que fueron atendidos en clínicas de consulta externa y/o hospitalizados por diarrea severa (niños sintomáticos), como de niños que acudieron a dichos centros de salud por enfermedades ajenas a esta enfermedad (niños asintomáticos). La recolección se realizó durante el periodo de octubre de 1994 a marzo de 1995 en cinco ciudades de México: Monterrey (Mty), Nuevo León; Mérida (Mer), Yucatán; Tlaxcala (Tlx), Tlaxcala; San Luis Potosí (SLP), San Luis Potosí y la Ciudad de México (DF), Distrito Federal (47).

Ensayo inmunoenzimático (EIA) para la detección de adenovirus 40/41.

Se utilizó el estuche comercial Adenoclone[®] - Type 40/41 EIA de Cambridge Biotech, diseñado para la detección cualitativa de los adenovirus de humano de serotipo 40 y 41 en muestras de heces. En este EIA de tipo sándwich, todos los adenovirus de humano presentes son capturados por anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno específico de grupo, que se encuentran fijos en una superficie sólida. Posteriormente, los adenovirus de serotipo 40 y 41 son reconocidos específicamente por anticuerpos monoclonales acoplados a peroxidasa (conjugado enzimático). La presencia de estos virus se revela, indirectamente, mediante la detección del conjugado enzimático con peróxido de urea (sustrato) y

tetrametilbenzidine (cromógeno). La interacción de la enzima con su sustrato (incolore) hace que este último se vuelva de color azul.

EIA para la detección de astrovirus.

Para la detección de los AstH se utilizó el estuche comercial (IDEIATM Astrovirus; Dako), diseñado para la detección cualitativa de los astrovirus en muestras de heces de humano. En este EIA de tipo sándwich, el anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno de astrovirus específico de grupo, se encuentra fijo en una superficie sólida. Este primer anticuerpo captura al antígeno viral al cual, posteriormente, se le une de manera específica un segundo anticuerpo policlonal de conejo al que, a su vez, se pega un tercer anticuerpo acoplado a peroxidasa dirigido contra las IgG de conejo. La presencia de los AstH se revela indirectamente mediante la detección del conjugado enzimático con un cromógeno.

Tratamiento de las heces para microscopía electrónica.

Se preparó un extracto de heces al 10% en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) a pH 7.3 y se clarificó por centrifugación a 2000g durante 30 min. El sobrenadante se centrifugó posteriormente a 106 500 g durante una hora, se eliminó por decantación y el poso se resuspendió en 100 µl de agua destilada con 100 µg/ml de bacitracina.

Inmunomicroscopía electrónica.

La inmunomicroscopía electrónica se utilizó para visualizar las partículas de astrovirus presentes en las muestras de heces. Esta técnica se realizó de acuerdo a la metodología descrita por T. W. Lee y J.B. Kurtz (28). Sobre un trozo de Parafilm "M" (American National CanTM), se mezclaron 4 µl de una dilución 1:100 de suero de conejo anti astrovirus (sueros obtenidos por los doctores Lee T.W. y Kurtz, J. B. (27) con 4 µl del poso fecal resuspendido. Esta mezcla se incubó en una cámara húmeda a 35° C por una hora. 20 min antes de finalizar la incubación de dicha mezcla, rejillas cubiertas con carbón se colocaron sobre gotas de proteína A en PBS (10 µl/ml; Sigma) y se incubaron a temperatura ambiente hasta finalizar la incubación de la mezcla. Las rejillas se escurrieron, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se colocaron sobre la mezcla de virus con suero específico contra astrovirus. Después de 10 min de absorción a temperatura ambiente, las rejillas se lavaron nuevamente con agua destilada y se tiñeron con ácido túngstico al 1%. Las rejillas se examinaron en un microscopio electrónico Zeiss EM-900 a 80 kV.

Extracción del RNA de los AstH.

500 µl de una suspensión de heces al 10-20% en PBS se extrajeron con 500 µl de Freon® (fluorotrichloromethane, de Aldrich). Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo de policarbonato (Beckman, Instruments, Inc.; # de catálogo 343778) en donde el volumen del líquido se llevó a 3/4 partes del tubo con PBS. Se centrifugó a

55,000 rpm, a 4° C, por 40 min (rotor TLA 100.2 y Optima™ TLX ultracentrifuge, Beckman, Instruments, Inc.). Se eliminó el sobrenadante y el RNA contenido en el poso se extrajo con 200 µl de Trizol® Reagent (Gibco BRL) y 20 µl de cloroformo. Se centrifugó a 14,000 rpm, a 4° C, durante 5 min (centrifuge 5402, Eppendorf). Se recuperó la fase acuosa, se le adicionó un volúmen igual de isopropanol y se incubó toda la noche a -20° C. Se centrifugó a 14,000 rpm, a 4° C, durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el poso se lavó con 500 µl de etanol absoluto. Se centrifugó a 14,000 rpm, a 4° C, durante 5 min. Se eliminó el etanol y el RNA se resuspendió en 10 µl de agua desionizada estéril.

Iniciadores para la amplificación del extremo 3' terminal del ORF2.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Posición en el ORF2 de AstH (No. de acceso)	Referencia
Ast-End	ICC-IAC-ICG-GCG-IGG-CCG-C	2375-2393 nt (L06802)	(59)
Ast-Beg	ACC-GTG-IAA-CCC-ICC-ICT-C	2375-2393 nt (L06802)	(59)
Beg-4	GGG-CIT-GAG-GAG-GAT-CAA-AC	1957-1976 nt (Z33883)	Diseñado en nuestro laboratorio
Mon-244	GGI-GTC-ACA-GGA-CCA-AAA-CC	217-236 nt (L06802)	(52)
Mon-245	TIA-GIG-AGC-CAC-CAG-CCA-TC	610-629 nt (L06802)	(52)

Amplificación del extremo 3' terminal del ORF2: reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción reversa (RT-PCR).

El RNA obtenido a partir de las heces se utilizó para amplificar el extremo 3' terminal del ORF2 mediante la RT-PCR. El DNA complementario se sintetizó a partir de 1 µl del RNA extraído de las heces en una mezcla de reacción con 1 pmol del iniciador Ast-End y 20 U de transcriptasa reversa (SuperScript RNase H⁻ Reverse Transcriptase, Gibco BRL) en 20 µl de volumen final. Esta mezcla se incubó a 42° C durante 50 min. Para la PCR del ORF2 de los astrovirus de serotipo 1 a 3 y 5 a 8 se utilizaron los iniciadores Ast-Beg, y Ast-End, mientras que para los AstH de serotipo 4 los iniciadores fueron Beg-4 y Ast-End. La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 µl de mezcla de reacción utilizando 1 µl del cDNA, 1 U de polimerasa (Vent DNA polymerase, New England, Biolabs, Inc.) y 25 pmol de cada iniciador. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 1 min a 94° C, treinta y cinco ciclos de amplificación (30 sec a 94° C, 30 sec a 50° C, 25 sec a 72° C) y un paso de extensión final de 15 min a 72° C. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2 % y se detectaron por tinción con bromuro de etidio. Los tamaños de los fragmentos de PCR esperados son de: 241 pares de bases para los serotipos 1, 2, 3, 5, 7 y 8; 217 pares de bases para el serotipo 6; y 362 pares de bases para el serotipo 4).

Secuenciación de los fragmentos de PCR.

Los productos de PCR se purificaron con el estuche comercial Concert™ Rapid PCR Purification System de Gibco BRL (11458-015) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia de los fragmentos de DNA purificado se obtuvo en un secuenciador automatizado (ABI Prism DNA automatic sequencer, Model 377-18, Perkin Elmer).

Análisis de las secuencias de DNA obtenidas.

El análisis de las secuencias de DNA obtenidas se realizó con el programa ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) con el cual se obtuvo el alineamiento y se realizó el análisis filogenético. El árbol filogenético se editó con el programa TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview/>). Los números de acceso de las secuencias utilizadas se enlistan a continuación. Para AstH-1: L23513 (1-Oxf), Y08627 (1-Nor/UK), S68561 (1-New), AF395734 (1-Hun-a), AF395733 (1-Hun-b), AY094088 (1-Safr-a), AY094086 (1-Safr-b), AY094082 (1-Safr-c), AY094081 (1-Safr-d), AY094080, (1-Safr-e), AY093655 (1-Safr-f), AY093654 (1-Safr-g), AY093652 (1-Safr-h), AF257225 (1-SPM-a) y AF257222 (1-SPM-b). Para AstH-2: L06802 (2-Oxf), Y08628 (2-Nor/UK), AY094085 (2-Safr-a), AY094084 (2-Safr-b), AY094079 (2-Safr-c), AF257229 (2-SPM-a) y AF257226 (2-SPM-b). Para AstH-3: AF141381 (3-Ber:), AF257223 (3-SPM-a), AF257227 (3-SPM-b), AF395735 (1-Hun), AY094090 (3-Safr-a), AY094087 (3-Safr-b), AY093650 (3-Safr-c), Y08629 (3-Nor/UK) y AF117209 (3-USA). Para AstH-4: Z33883 (4-Oxf),

AF395736 (4-Hun), AF257228 (4-SPM), AB025812 (4-Jap-a), AB025811 (4-Jap-b), AB025801 (4-Jap-c), AB025803 (4-Jap-d), AB025802 (4-Jap-e), AB025809 (4-Jap-f), AB025808 (4-Jap-g), AB025807 (4-Jap-h), AB025805 (4-Jap-i), AB025804 (4-Jap-j), AB025806 (4-Jap-k) y AB025810 (4-Jap-l), AY094092 (4-Safr) y Y08630 (4-Nor/UK). Para AstH-5: U15136 (5-Oxf), AB037274 (5-Chi-a), AB037273 (5-Chi-b), AF395737 (5-Hun), Y08631 (5-Nor/UK), AY094089 (5-Safr-a), AY093651 (5-Safr-b) y AF257224 (5-SPM). Para AstH-6: Z46658 (6-Oxf), AB031031 (6-Jap-a), AB031030 (6-Jap-b) y AY093653 (6-Safr). Para AstH-7: AF248738 (7-Oxf), Y08632 (7-Nor/UK), AY094091 (7-Safr) y AF257221 (7-SPM). Para AstH-8: Z66541 (8-RU), AF395738 (8-Hun), AF292079 (8-Safr-a), AY094083 (8-Safr-b), AY093649 (8-Safr-c) y AF260508 (Yuc-8; Mer-8). Entre paréntesis se muestra la nomenclatura correspondiente utilizada en las figuras 6 y 10 de la sección de Resultados, así como en las figuras 1 y 2 del manuscrito 1.

Subcultivo de células CaCo-2.

La línea celular CaCo-2 se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection). Estas células se cultivaron en frascos para cultivo de tejidos (Tissue Culture Treated Non-Pyrogenic Polystyrene Flasks; Costar) con medio mínimo esencial de Eagle (MEM, Sigma; # de catálogo: M-0644) complementado con 29.2 mg/ml de glutamina, 1,000U/ml de penicilina y 1,000µg/ml de streptomycin (Penicillin-Streptomycin, Gibco BRL), y 15 % de suero fetal de bovino (Fetal Bovine Serum, Gibco BRL) a 37° en una incubadora con 5% de bióxido de carbono. El subcultivo, para mantener la línea en crecimiento, se realizó cada vez que las células formaban

una monocapa confluyente en la superficie del frasco de cultivo. Entonces, se les retiró el medio de cultivo (con vacío), se lavaron una vez con PBS y se incubaron con una solución de Tripsina al 1% (Gibco BRL) y 200 mg/l de EDTA (Gibco) en PBS, hasta que se desprendieron después de lo cual, se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron nuevamente.

Aislamiento de Yuc-8.

La cepa de AstH Yuc-8 se aisló a partir de una infección natural y se adaptó a crecer en células CaCo-2. Se preparó un extracto de heces en PBS (1 : 2) y se clarificó por centrifugación a 2000 x g durante 5 min. Se tomó un alícuota de 500 µl de sobrenadante y se extrajo con freón (1 : 1). La fase acuosa se filtró a través de una membrana de 0,22 µm, se diluyó 1:10 en medio de cultivo celular con 10 µg/ml de tripsina (Trypsin 1:250; Gibco BRL) y se incubó durante 1 h a 37° C. Con 200 µl de este inóculo se inocularon células CaCo-2 crecidas en monocapa en tubos de cultivo de superficie plana de 3 ml (NUNCLONTM Delta Surface; NUNCTM Brand Products) y se incubaron a 37° C con agitación constante durante 60 min. Posteriormente, se retiró el inóculo, se adicionó medio de cultivo celular, se incubó por 6 h más a 37° C, se cambió el medio de cultivo celular por medio sin suero con 5 µg/ml de tripsina y se incubó a 37° C hasta observar efecto citopático (aproximadamente 36 h). Las células infectadas se congelaron y descongelaron tres veces y se guardaron a -70° C. Con 200 µl del lisado celular obtenido se repitió la inoculación de células CaCo-2. Este procedimiento se repitió hasta llegar al pase 7, detectando en cada pase la presencia del RNA de Yuc-8 por RT-PCR con los

iniciadores Mon274 y Mon275 (52). Después del séptimo pase se identificó la presencia del antígeno viral por EIA (IDEIA™ Astrovirus, Dako) y por inmunomicroscopía electrónica, utilizando los anticuerpos monoclonales 8G4 que reconocen a los AstH 1 a 7 (4), se observó la presencia de las partículas virales.

Propagación de Yuc-8.

Se activó el virus con tripsina (10 µl/ml) durante 30 min a 37° C. Se retiró el medio de cultivo de las células a infectar, se lavaron dos veces con medio de cultivo sin suero, se les agregó el virus activado distribuyéndolo bien sobre la monocapa de células y se incubaron a 37° C durante una hora en una incubadora con bióxido de carbono y humedad. Posteriormente, se les adicionó medio de cultivo y se incubaron durante 6 horas más. Después, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo sin suero, se les adicionó medio de cultivo sin suero con tripsina (5 µg/ml), y se incubaron a 37° C hasta que se observó el efecto citopático (48-72 horas).

Secuenciación del genoma.

Se obtuvo el RNA total de las células CaCo-2 infectadas con Yuc-8 utilizando Trizol (Gibco BRL), y se utilizó como templado para amplificar el genoma de astrovirus por RT-PCR. Para las reacciones de RT-PCR se utilizaron la transcriptasa reversa SuperScript (Gibco BRL) y la polimerasa de DNA Vent (New England Biolabs). Los primeros iniciadores se diseñaron de acuerdo con la secuencia previamente

reportada para AstH-1 (No de acceso Z25771) y, posteriormente, en la secuencia obtenida de Yuc-8. Los fragmentos de DNA amplificado se secuenciaron con un secuenciador automático de DNA ABI prism, modelo 377-18 (Perkin Elmer). La secuencia de la región 5' no traducida se determinó a partir del producto de PCR obtenido con un cebador correspondiente a los 20 nucleótidos terminales del extremo 5' que se encuentran conservados entre los serotipos de AstH 1, 2 y 3. La secuencia nucleotídica de la región no traducida del extremo 3'-terminal se determinó a partir de los productos de PCR obtenidos con el par de cebadores oligo(dT) y Ast-Beg. Para determinar la secuencia consenso se utilizaron cuando menos tres fragmentos de PCR, sintetizados de manera independiente, de cada región.

Anticuerpos dirigidos contra péptidos sintéticos.

El péptido KSNKQVTVEVSNNGRNRC (KSN), que mimetiza la región de la poliproteína del ORF2 de AstH-1 (1-Oxf) comprendida entre los aminoácidos 4-20, fue sintetizado por la compañía Research Genetics, Inc. Este péptido se acopló a la proteína KLH (Keyhole Limpet Hemocianin) activada con maleimida (Inject maleimide activated-KLH; Pierce) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El péptido conjugado a la proteína KLH se utilizó para inocular ratones BALB/c que fueron inmunizados tres veces con aproximadamente 100 µg de proteína total. La primera inmunización se hizo con adyuvante completo de Freund (1:1) (Complete Freund's Adjuvant, Gibco BRL), mientras que las dos inmunizaciones subsecuentes, realizadas a intervalos de 15 días, se realizaron con adyuvante incompleto de Freund (Incomplete Freund's Adjuvant, Gibco BRL). A los quince días después de la tercera

inmunización se probó por EIA la especificidad de los anticuerpos obtenidos y se recolectaron.

Obtención de los plásmidos recombinantes para la síntesis de las proteínas recombinantes E1, E2 y E3.

Para la obtención del plásmido recombinante pGEX-4T-3-E1, se clonó el fragmento ORF2₃₋₂₀₈ en el sitio de restricción Sma I del plásmido pGEX-4T-3 (Pharmacia). Para la obtención del plásmido recombinante pGEX-4T-1-E2, se clonó el fragmento ORF2₂₀₉₋₃₄₁ en el sitio de restricción Not I del plásmido pGEX-4T-1 (Pharmacia). Para la obtención del plásmido recombinante pGEX-4T-3-E3, se clonó el fragmento ORF2₃₈₆₋₅₉₄ entre los sitios de restricción Age I y Nsi I del plásmido pGEX-4T-3 (Pharmacia).

Transformación de *Echerichia coli* Sure.

Se electroporaron por separado células *E. coli* electrocompetentes (1×10^9 bacterias/ μ l) (FOCUS 12(2): 38-40) con cada uno de los plásmidos recombinantes obtenidos. En breve: las células competentes congeladas a -70° C se descongelaron en hielo. Se tomó una alícuota de células competentes de 40 μ l y se mezcló con 0.5 μ g de DNA (plásmido para transformar). Esta mezcla se puso en la celda de electroporación (Electroporation cuvettes plusTM Modelo 610; 1mm Gap Cuvette) en la cual se le dió un choque eléctrico (1.6 KV, 25 μ FD, 200 ohms). Las células

electroporadas se incubaron en 1 ml de medio S.O.C. (S.O.C. Medium, Gibco BRL) a 37° C durante una hora. Se centrifugaron 2 min a 14,000 rpm y el poso se resuspendió en 600 µl de medio de Luria y las células se sembraron en cajas de Petri con agar y 100 mg/ml de carbenicilina. Se incubaron aproximadamente 18 hrs a 37° C y se seleccionaron las colonias de las células transformadas.

Obtención de las proteínas recombinantes de astrovirus de humano (E1, E2 y E3).

El protocolo utilizado para la expresión de las proteínas recombinantes E1, E2 y E3 fue el mismo para todas. Las células transformadas con el plásmido recombinante se crecieron en medio de Luria a 37° C durante toda la noche (aproximadamente 10 hrs). Posteriormente, se preparó una dilución 1:10 del cultivo celular en medio fresco de Luria complementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37° C hasta que alcanzaron su fase media logarítmica ($A_{600} = 0.6 - 1.0$). Se adicionó al medio de cultivo isopropyl-β-D-tiogalactosidasa (IPTG) (Pharmacia) a una concentración final de 1.0 mM, para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Las células se incubaron por 5 horas más a 37° C y se analizó la presencia de las proteínas esperadas por inmunotinción en fase sólida (Western Blot). Posteriormente se purificaron por electroelución a partir de geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se cuantificaron por el método de Bradford.

Anticuerpos dirigidos contra E1, E2 y E3.

Se inmunizaron tres veces conejos Nueva Zelanda, con aproximadamente 100 μ g de proteína recombinante. La primera inmunización se hizo con adyuvante completo de Freund (1:1), mientras que las dos inmunizaciones subsecuentes, realizadas a intervalos de 15 días, se realizaron con adyuvante incompleto de Freund. A los quince días después de la tercera inmunización se probó por inmunotinción en fase sólida (Western Blot) la especificidad de los anticuerpos obtenidos.

RESULTADOS

1. Determinación de la prevalencia y diversidad genotípica de astrovirus de humano (AstH) en México.

Prevalencia de AstH en cinco regiones de México.

Durante el periodo de octubre de 1994 a marzo de 1995 se colectaron 2,396 muestras de heces provenientes de niños menores de cinco años de edad, con diarrea y sin diarrea, que fueron hospitalizados o atendidos en clínicas de consulta externa. Los niños estudiados provenían de cinco localidades diferentes: Ciudad de México (DF), Tlaxcala (Tlx), San Luis Potosí (SLP), Mérida (Mer) y Monterrey (Mty).

Las muestras de heces se analizaron en un estudio previo para determinar la presencia de los rotavirus (RvH), que se sabe es el principal agente viral de diarrea infantil. Se encontró que el 54.4% (593/1,091) de los niños sintomáticos y el 7.3% (95/1,305) de los niños asintomáticos excretaron estos virus (54). Para determinar la prevalencia de los astrovirus de humano, se analizaron 710 muestras negativas para RvH: 355 de niños sintomáticos y 355 de niños asintomáticos.

La identificación de los AstH se realizó con dos ensayos inmunoenzimáticos (EIAs) específicos para su detección. Los AstH se identificaron, con ambos EIAs, en 28 muestras. La presencia de las partículas de astrovirus se confirmó, por inmunomicroscopía electrónica, en 24 de las 28 muestras positivas para AstH (Tabla 2).

No. de muestra	Localidad	Tipo de muestra	EIA (J. E. Herrmann)	EIA (DAKO)	IME	RI-PCR	Genotipo
1	DF	S	+	+	+	+	2
2	DF	S	+	+	+	+	3
3	DF	S	+	+	+	+	3
4	DF	S	+	+	+	+	4
5	DF	S	+	+	+	+	4
6	DF	S	+	+	+	-	nd
7	Tlx	S	+	+	+	+	2
8	Tlx	S	+	+	+	+	3
9	Tlx	S	+	+	+	+	3
10	SLP	S	+	+	+	+	2
11	Mer	S	+	+	+	+	1
12	Mer	S	+	+	+	+	1
13	Mer	S	+	+	-	+	4
14	Mer	S	+	+	+	+	8
15	Mer	S	+	+	-	+	8
16	Mty	S	+	+	+	+	1
17	Mty	S	+	+	+	+	1
18	Mty	S	+	+	+	-	nd
19	Mty	S	+	+	-	-	nd
20	DF	A	+	+	+	-	nd
21	Mer	A	+	+	+	+	1
22	Mer	A	+	+	+	+	8
23	Mer	A	+	+	+	-	nd
24	Mer	A	+	+	-	-	nd
25	Mty	A	+	+	+	+	2
26	Mty	A	+	+	+	+	3
27	Mty	A	+	+	+	-	nd
28	Mty	A	+	+	+	-	nd

Tabla 2. Identificación de AstH en las muestras de heces. Se ilustran los resultados obtenidos con los diversos métodos utilizados para la determinación de la presencia de los AstH en las muestras de heces de los niños con y sin diarrea así como el genotipo asignado a las cepas identificadas, en base a la secuencia de los amplicones obtenidos por RT-PCR. EIA - ensayo inmunoenzimático; IME - inmunomicroscopía electrónica; RI-PCR - transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa del extremo 5' del ORF2; S - muestra de heces proveniente de un niño con diarrea (sintomático); A - muestra de heces proveniente de un niño sin diarrea (asintomático); "+" - resultado positivo; "-" - resultado negativo; nd - genotipo no determinado (de los AstH detectados en estas muestras no se logró amplificar la región analizada del ORF2).

Los AstH estuvieron presentes en el 5.4% de los niños sintomáticos y en el 2.5% de los niños asintomáticos (Tabla 3). Al analizar los resultados obtenidos en cada una de las cinco localidades estudiadas se observó que la prevalencia de los AstH varió de 3.0 (Mty) a 11.3% (DF) en los niños sintomáticos y de 0 (SLP y Tlx) a 4.2% (Mer) en los niños asintomáticos (Tabla 3). El análisis estadístico de estos datos indica una tendencia a la asociación entre la presencia de AstH y la presencia de síntomas diarreicos, aunque con baja significancia estadística ($\chi^2 = 3.718$, $P = 0.054$).

Región	DF	SLP	Tlx	Mer	Mty	Total
S	6/53	1/21	3/53	5/95	4/133	19/355
(%)	(11.3)	(4.8)	(5.7)	(5.3)	(3.0)	(5.4)
A	1/53	0/21	0/53	4/95	4/133	9/355
(%)	(1.9)	(0)	(0)	(4.2)	(3.0)	(2.5)

Tabla 3. Prevalencia de AstH en niños mexicanos menores de cinco años de edad. S – niños con diarrea (sintomáticos); A – niños sin diarrea (asintomáticos); DF - Distrito Federal; Tlx - Tlaxcala; SLP - San Luis Potosí; Mer - Mérida y Mty - Monterrey.

Diversidad genotípica de los AstH detectados en México

Los genotipos de las cepas de AstH identificadas se determinaron en base a la región 3' terminal del ORF2. La región estudiada codifica para los 61 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la poliproteína del ORF2 (excluyendo los 5 aminoácidos terminales) y es variable entre cepas pertenecientes a diferentes serotipos (Fig. 5, ver también figura 1b del artículo II). La secuencia correspondiente para los serotipos 4 y 6 es de 59 y 53 aminoácidos, respectivamente (Fig. 5). Esta región se amplificó por RT-PCR, se secuenció y se comparó con las secuencias reportadas para AstH en el GenBank.

	1		61
AstH-8	ISVERATRIITNGAFP----	TRAARVRRSVYNDLLVSGLSPGAAWSHACEQARRAGDNHDLQLSGS	777
AstH-7	MT.....M..KR.....	----C.DKQK..HM..A.....NV.....E..TM.T..MPNV..D	786
AstH-6	VT.D...M...R.....	----PNYKP..EPS.....APSDCLAT.R.....NET-----C.....	773
AstH-5	M.....K..SN.....	----L.....V.D.D.....KV.....T.....	778
AstH-4	.R....Y.GMS.Y.NVEWGS	GEQSTSQHIQEISSDDVGAGAHY.CV..RKQQ-----SLNQ..	766
AstH-3	MT.....KR.....	----S.GKTK...M...A.....N.....E..IM.I..QTPNV..D	789
AstH-2	MT.....KR.....	----C.EKLK...M...A..A..SS..N..DE..NV.S..QLAK...D	791
AstH-1	MIIMT.....ARR.....	----LSD.IK.G..M.....V..N.....E..K.VGETNPCT...D	782

Fig. 5. Alineamiento del fragmento de 61 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la poliproteína del ORF2 de los diferentes serotipos de AstH. La numeración de la secuencia corresponde a la de las cepas de referencia: L23513 (AstH-1), A45695 (AstH-2), AF141381 (AstH-3), Z33883 (AstH-4), U15136 (AstH-5), Z46658 (AstH-6), AF248738 (AstH-7) y AF260508 (AstH-8). Los guiones (-) indican remoción/inserción de aminoácidos, mientras que los puntos indican identidad de aminoácidos.

Se logró amplificar y secuenciar el extremo 3' terminal de 20 de las 28 cepas de AstH detectadas. El alineamiento de las secuencias obtenidas, tanto a nivel de nucleótidos (no se muestra) como de aminoácidos (Fig. 6), con todas las secuencias reportadas para los diferentes serotipos de AstH, así como el análisis de la diversidad genética (Dg) intra- e interserotipo de dicha región (ver más adelante), permitieron asignar el genotipo correspondiente.

Genotipo	Cepa	S/A	722	782
1	Oxf		MTMTRATRIARRAPPFLSDRIKRVYMDLIIVSGVSPGNASHACCEEARAKVQGEINFCITSGS	
1	Nor/UK			A I
1	New Mty-a (4)	2S, 1S ^{ast} 1A ^{ast}		A I
1	Hun-a			A S A I
1	Safr-d		I NS	A I
1	Safr-g		I K A NS	A I
1	Hun-b		I A NS	TAR I
1	Safr-h		I K TP A NS	A I
1	Safr-a, -f		A I A NS	IA I
1	Safr-e		A FT A NS	IA I G
1	Safr-b		VA I K NS	G NI G
1	Safr-c		K A A	A I
1	SPM-a, -b, Mty-b (1)	1S ^{ast}	K A A D	TA GI
1	Mer (4)	2S, 1S ^{ast} 1A	K A A D	TA GI N
731				
2	Oxf		MTVERATRIIKRAFFTCAEKLKRSVYMDLIIVASGAFSPSAWSNACDEARNVQSNQIAMI SGD	791
2	Nor/UK Safr-c SPM-b			T T
2	Safr-a		K I	I I
2	SPM-a		I I	S I
2	Tlx (1)	1S	I I V H	I I
2	Mty (1)	1A	A I V H	I I
2	DF-2 (1)	1S	I I V H I	I I
2	SLP-2 (1)	1S	I I V H	I I F
2	Safr-b		D I	SI G F I
729				
3	Ber		MTVERATRIIKRAFFTSAKIKRSVYMDLIIVASGLSPGNASHACCEEARINGINQTFNVSGD	789
3	SPM-b		D	T M P
3	Hun		D S	M
3	Safr-a		D Y	T M
3	Safr-c		D S	T M
3	Nor/UK, Safr-b, SPM-a, USA DF (2), Tlx (2), Mty (2)	4S, 1S ^{ast} 1A	D	T M
708				
4	Oxf, Hun, Jap-e		ISRERATYIGMSAYPNVWVSGEQSTSQHIQEIISDDVAGAHYSCVCRKQQSLNQGS	766
4	Jap-d			N
4	Nor/UK		A L	
4	Safr		D S SG E CT A S	
4	Jap-a, -f to -j		D K S F E CI A S	
4	Jap-b, -k		D K S F VE CI A S	
4	SPM		M D PP I A	
4	Jap-c, -l, DF-a (1), Mer (1)	2S	M D FF A	
4	DF-b (1)	1S	M D FF A F	
718				
5	Oxf		MSVERATRIKISNAFPTRAARI RRSVYNDLIIVSGLDIIVDAAMSHACCEARVQKVDGNDHLQITSGS	778
5	Nor/UK			G G
5	Hun			G G A
5	Safr-a			G G V
5	Chi-a		R G G	V
5	Chi-b		R G G	G V
5	SPM		R GHG T V	V
5	Safr-b		A R N I GPG	VP
721				
6	Oxf		VTVDRATMIINRAFFTIPNYKPRREFSNDIIVASDCLAIARSHACNETCCQLSGS	773
6	Mty (1)	1S ^{ast}	M	F
6	Safr		M S H F I	
6	Jap-a		M HRS QP T V D	
6	Jap-b		M HRS QP I D F	
726				
7	Oxf, Nor/UK SPM		MTVERATMI TKRAFFTCAKQKRSVYMDLIIVASGLSPGNVWSHACCEARTNGTNNHMFVSGD	786
7	Safr			T
717				
8	UK		ISVERATRIITNGAFFFFIDRMRSVYNDLIIVSGLSPGAAMSHACCEARRAGDNDHLQILSGS	777
8	Safr-b -c			A AA P
8	Hun		D A AA	P
8	Safr-a		T AA	
8	Mer (3)	2S, 1A	T AA V	

Fig 6. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región del extremo carboxilo terminal del ORF 2 de diferentes tipos de AstH. Las secuencias dentro de cada tipo están alineadas con la de una cepa de referencia cuyo serotipo se determinó con anticuerpos específicos de serotipo. Se encuentran incluidas las 26 secuencias de AstH obtenidas en el presente estudio así como todas las secuencias reportadas de dicha región provenientes de AstH aislados en diferentes partes del mundo. Los nombres correspondientes a las cepas de AstH mexicanas están en negritas. Entre paréntesis se muestra el número de cepas identificadas en el presente estudio que tienen secuencias idénticas. La columna S/A indica si la cepa de AstH fue aislada de un niño sintomático (S) o de un niño asintomático (A). El superíndice RvH en esta columna indica que la cepa de astrovirus correspondiente se identificó en una muestra positiva para RvH. La numeración de las secuencias es de acuerdo a la secuencia de la poliproteína del ORF 2 de cada cepa de referencia. Los espacios vacíos indican identidad de aminoácidos. Ber - cepa de Berlín, Alemania; Chi - cepa de China; DF - cepa de la Ciudad de México, México; Hun - cepa de Hungría; Jap - cepa de Japón; Mer - cepa de Mérida, México; Mty - cepa de Monterrey, México; New - cepa de Newcastle, Inglaterra; Nor/UK - cepa de Noruega y/o Reino Unido; Oxf - cepa de Oxford, Inglaterra; Safr - cepa de Sudáfrica; SLP - cepa de San Luis Potosí, México; SPM - cepa de San Pedro Mártir, México; Tlx - cepa de Tlaxcala, México; UK - cepa de Reino Unido; USA - cepa de Estados Unidos de América. Las letras a, b, c, etc. identifican a más de un espécimen de la misma región.

a) **Genotipos de las cepas de AstH aisladas de niños con diarrea**

De las 19 cepas de AstH identificadas en niños con diarrea, 16 pudieron tipificarse por RT-PCR y secuenciación del fragmento de DNA amplificado (Tabla 2). Cinco de los 8 genotipos de AstH reportados hasta ahora se identificaron en estas cepas; cuatro de las cepas fueron genotipo 1 (21%), cuatro genotipo 3 (21%), tres pertenecieron al genotipo 2 (16%), 3 al genotipo 4 (16%), y 2 fueron de genotipo 8 (11%) (Tablas 3 y 5; Fig. 7). En tres de las 19 cepas detectadas por EIA no se pudo amplificar la región 3' terminal del ORF2 y en una de ellas tampoco se detectó virus por inmunomicroscopía electrónica (IME) (Tabla 2).

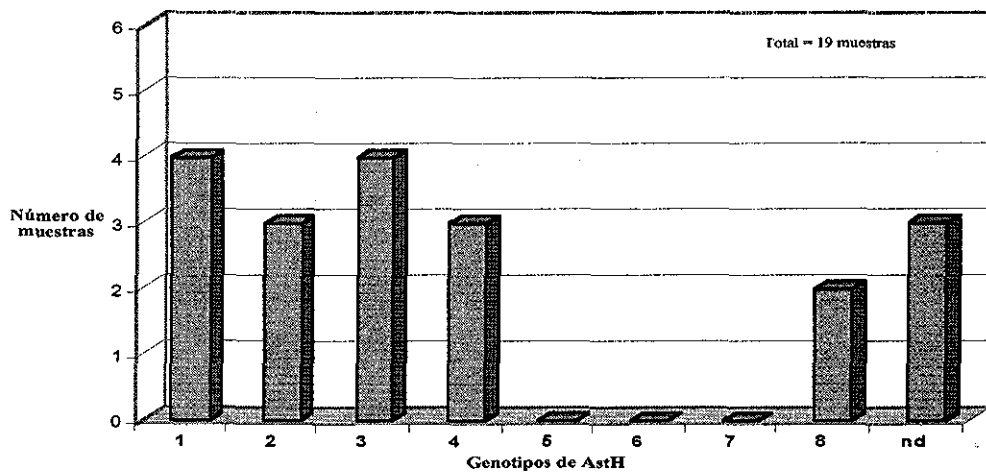


Fig. 7. Genotipos de AstH detectados en muestras de heces provenientes de niños con diarrea

b) Genotipos de las cepas de AstH aisladas de niños asintomáticos

En el caso de las 9 cepas de AstH identificadas en niños asintomáticos, cuatro de ellas pudieron genotipificarse (Tabla 2); se encontró que cada una de éstas cepas de AstH perteneció a un genotipo diferente: 1, 2, 3 y 8 (Fig. 6; Fig. 8). A las cinco cepas restantes no fue posible asignarles genotipo dado que no se logró amplificar la región 3' del ORF 2. En una de ellas no se detectaron partículas virales por IME.

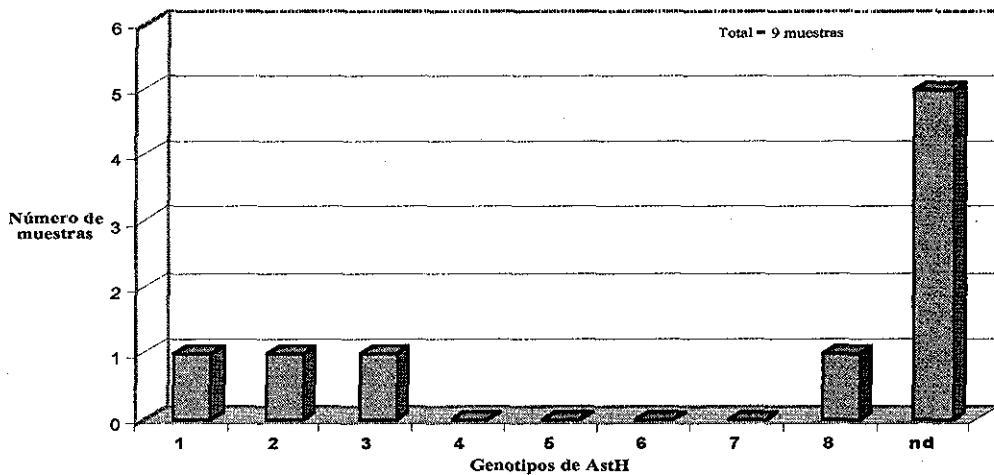


Fig. 8. Genotipos de AstH detectados en muestras de heces provenientes de niños sin diarrea (A).

La falta de amplificación del fragmento de DNA por RT-PCR tanto en las muestras aisladas de niños sintomáticos como asintomáticos puede deberse a: i) que no se hayan podido eliminar en esas muestras de heces inhibidores de las enzimas utilizadas en las reacciones de RT-PCR; ii) que el RNA viral del virus se haya degradado durante los varios eventos de congelación-descongelación de las muestras de heces que se realizaron durante su caracterización; iii) que la cantidad de virus presente en estas muestras haya sido escasa; iv) que entre estas cepas se encuentre(n) algún(os) genotipo(s) de AstH aún no identificado(s), para la detección del(os) cual(es) los cebadores utilizados en el presente estudio no hayan sido adecuados, o bien; v) una mezcla de dos o más de los factores mencionados anteriormente.

Distribución geográfica de los genotipos de AstH.

La distribución geográfica de los diferentes genotipos de AstH detectados en México varió de una región a otra (Fig. 9).

a) Distribución de los genotipos detectados en las muestras de heces provenientes de niños con diarrea.

Los AstH se detectaron en niños con diarrea provenientes de las cinco localidades de México analizadas. En Monterrey se identificaron cuatro cepas de AstH, dos de las cuales pertenecieron al genotipo 1 y a las otras dos no fue posible asignarles genotipo. En la zona de Mérida se detectaron cinco cepas de AstH entre

las cuales fueron identificados los genotipos 1, 4 y 8, siendo éste último tan prevalente (40%) como el 1 en ésta zona. En Tlaxcala fueron identificadas una cepa de AstH de genotipo 2 y dos de genotipo 3. En San Luis Potosí se detectó la presencia de una cepa de AstH de genotipo 2. En la Ciudad de México se encontraron cinco cepas de AstH las cuales representaron a los genotipos 2, 3 y 4 y una cepa de la que no se logró amplificar la región 3' terminal del ORF2 (Fig 9).

Como se aprecia en la Fig. 9, la prevalencia y distribución geográfica de los genotipos de AstH identificados en los niños sintomáticos varió de una región a otra. Los genotipos 1 y 3 fueron, en general, los de mayor prevalencia (21% cada uno). Sin embargo, el genotipo 1 sólo se detectó en Monterrey y Mérida y el genotipo 3 en Tlaxcala y la Ciudad de México. El genotipo 2 (15.8%) estuvo presente en tres (Tlaxcala, San Luis Potosí y Ciudad de México) de las cinco regiones analizadas, siendo el genotipo de mayor distribución geográfica. El genotipo 4 (15.8%) fue tan prevalente como el genotipo 2 pero se encontró sólo en las regiones de Mérida y la Ciudad de México. El genotipo 8 se detectó únicamente en Mérida, con una prevalencia del 40%. Los genotipos 5, 6 y 7 de AstH no se detectaron en este grupo de muestras.

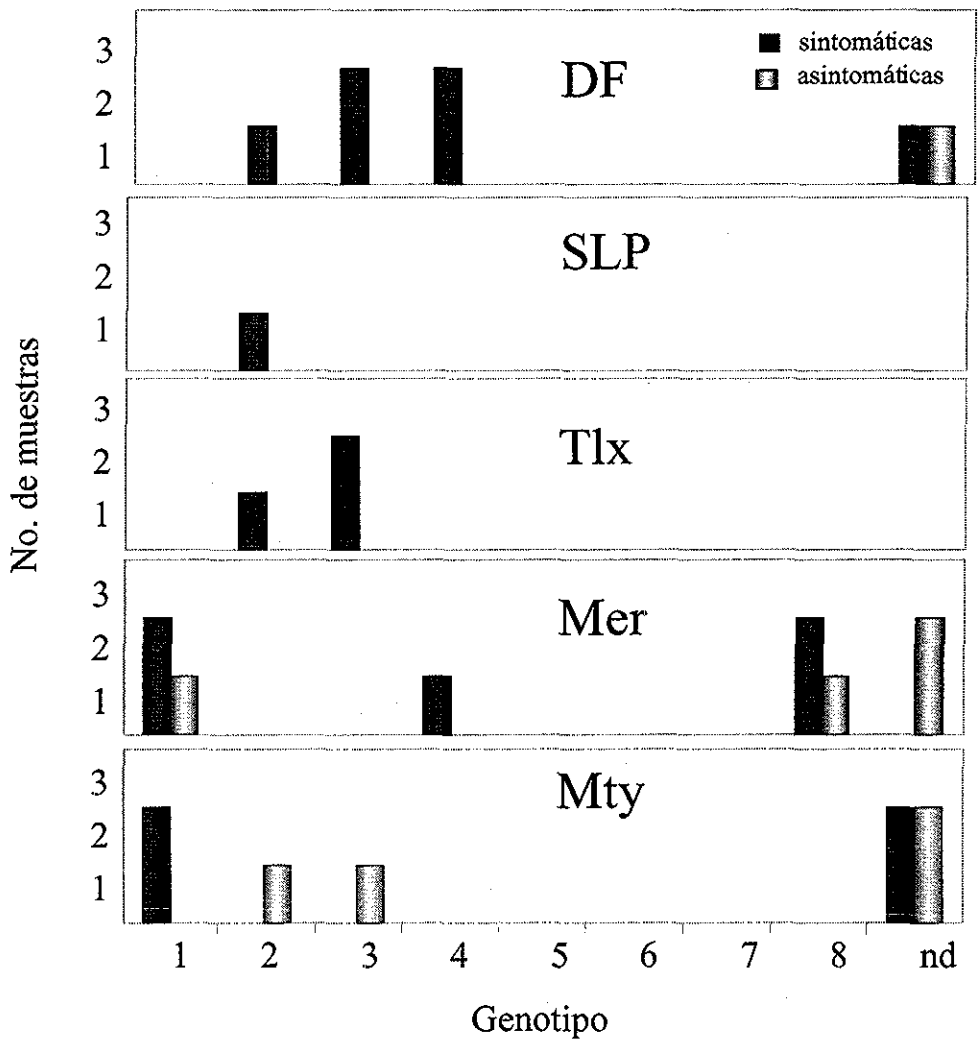


Fig. 9. Distribución geográfica de los genotipos de AstH detectados en muestras de heces provenientes de niños menores de cinco años de edad con diarrea (S) y sin diarrea (A).

Es interesante, que los diversos genotipos estuvieron presentes cuando menos en dos localidades, con la excepción del genotipo 8 que se detectó exclusivamente en la ciudad de Mérida. Además, que en tres (Mérida, Tlaxcala y la Ciudad de México) de las cinco regiones estudiadas se encontró más de un genotipo circulando al mismo tiempo.

b) Distribución de los genotipos detectados en las muestras de heces de niños sin diarrea.

Los AstH en niños sin diarrea, se detectaron en muestras de Monterrey, Mérida y la Ciudad de México (Fig. 9). De las cuatro cepas identificadas en Monterrey una fue de genotipo 2, otra de genotipo 3 y a dos no se les pudo asignar el genotipo. En Mérida, de las cuatro cepas detectadas una correspondió al genotipo 1, otra al genotipo 8 y dos no pudieron serotipificarse. A la cepa identificada en la Ciudad de México no se le pudo asignar genotipo. (Fig. 9).

Asociación entre la presencia o ausencia de síntomas diarreicos y el genotipo de AstH infectante.

De los genotipos identificados (1 a 4 y 8) todos se encontraron presentes en los niños con diarrea al igual que en los niños asintomáticos con excepción del genotipo 4 (Tabla 4).

Niños/Genotipos	1	2	3	4	5	6	7	8
S	+	+	+	+	-	-	-	+
A	+	+	+	-	-	-	-	+

Tabla 4. Genotipos de AstH identificados en los niños con diarrea (S) y sin diarrea (A).

La comparación de la secuencia del ORF2 de los AstH, de genotipo 1, 3 y 8, provenientes de niños con y sin diarrea mostró que en algunos casos cepas de un mismo genotipo tuvieron la misma secuencia independientemente de si el niño tenía diarrea o no (Fig. 6); ver, por ejemplo, las cepas 3-DF, 3-Tlx y 3-Mty de genotipo 3 y 8-Mer de genotipo 8. En el caso de la secuencia de genotipo 2 (2-Mty) detectada en los niños asintomáticos ésta difiere en uno o dos aminoácidos con respecto a las secuencias de las cepas provenientes de los niños sintomáticos. Sin embargo, entre estas últimas se observó también una diferencia similar de uno o dos aminoácidos entre ellas (Fig. 6). Estos resultados sugieren que en base a la región analizada del genoma no existe una asociación, al menos clara, de algún genotipo particular con la presencia o ausencia de síntomas diarreicos. Para poder establecer si realmente existe dicha asociación es necesario llevar a cabo estudios de mayor amplitud cuyos resultados permitan realizar un análisis estadístico confiable.

Coinfecciones de AstH con RvH

Con la finalidad de conocer la frecuencia de coinfección de AstH con RvH durante el periodo estudiado, se analizaron 240 muestras de heces positivas para RvH, seleccionadas al azar, provenientes de niños con (167 muestras) y sin (73 muestras) diarrea, de las cinco regiones analizadas. Los AstH se encontraron en el 3.0 % (5/167) de los niños sintomáticos y en el 2,7% (2/73) de los niños asintomáticos infectados con RvH (Tabla 7).

La serotipificación de las cepas de AstH identificadas mostró que las cepas detectadas en los niños sintomáticos pertenecieron a los genotipos 1 (3/5), 3 (1/5) y 6 (1/5). De las dos cepas de AstH identificadas en los niños asintomáticos, una fue de genotipo 1 (1/2) mientras que a la otra no se le pudo asignar el genotipo (Fig. 6).

2. Diversidad genética de los AstH

Se analizó la diversidad genética intra e interserotipo, de la región del ORF 2 analizada, de las cepas de AstH identificadas en diferentes partes del mundo, incluídas las 26 secuenciadas en el presente estudio. El grado de Dg se calculó como el número de cambios de aminoácidos entre el número total (61 para los genotipos 1, 2, 3 y 8; 59 para el genotipo 4 y 53 para el genotipo 6) de residuos de amino ácidos analizados. La Dg se calculó para todos los serotipos de AstH.

La comparación de las secuencias de las 4 cepas de AstH-1 detectadas en Mérida mostró que éstas fueron idénticas (ver 1-Mer en la Fig. 6), $D_g = 0$; mientras que entre las cinco cepas de genotipo 1 de la región de Monterrey se identificaron dos secuencias diferentes, 1-Mty-a y 1-Mty-b, entre las cuales la D_g fue de 0.08. La comparación de las 15 secuencias reportadas de AstH-1 y las tres secuencias obtenidas en el presente estudio mostró que: 1) la secuencia 1-Mty-a fue idéntica a la secuencia reportada para un AstH-1 de Newcastle, Reino Unido; 2) la secuencia 1-Mty-b fue idéntica a la de las dos cepas de AstH-1 detectadas en San Pedro Martir, DF y; 3) el rango de la D_g cuando todas las cepas se compararon entre ellas, por pares, fue de 0 a 0.23 (Tabla 5).

Cada una de las cuatro cepas de AstH-2 (2-DF, 2-Mty, 2-SLP y 2-Tlx) detectadas en el presente estudio provino de una localidad diferente (Fig. 6). La diversidad genética entre estas cepas fue de 0.02. La comparación de las 7 secuencias disponibles de AstH-2 y las 4 secuencias obtenidas en el presente estudio indicó un rango de D_g intratípica de 0 a 0.1 (Tabla 5) entre ellas.

Las secuencias de las seis cepas de AstH-3 [3-DF (2), 3-Mty (2) y 3-Tlx (2)] que se detectaron en el estudio, provenientes de tres regiones diferentes, fueron idénticas (Fig. 6). La comparación de las 9 secuencias disponibles de AstH-3 y la secuencia obtenida en el presente estudio mostró que la D_g entre ellas varió de 0 a 0.07 (Tabla 5).

Entre las tres cepas de AstH-4 identificadas en el presente trabajo se detectaron dos secuencias diferentes, una representada por las cepas 4-DF-a y 4-

Mer, y la otra representada por la cepa 4-DF-b (Fig. 6). La Dg entre estas dos secuencias fue de 0.16. La comparación de las 17 secuencias disponibles de AstH-4 y las dos secuencias obtenidas en el presente estudio mostró que la Dg entre ellas varió de 0 a 0.24 (Tabla 5).

En el presente estudio no se detectaron cepas de AstH pertenecientes al genotipo 5. La comparación de las 8 secuencias disponibles en la literatura para AstH-5 mostró una Dg entre ellas de 0.02 a 0.15 (Tabla 5).

En el caso de las 4 secuencias reportadas para AstH-6 y la de la cepa identificada en Monterrey (6-Mty) se determinó una Dg intratípica que varió desde 0.04 hasta 0.17 (Tabla 5).

En el presente estudio no se detectaron cepas de AstH pertenecientes al genotipo 7. La comparación de las 4 secuencias disponibles para este genotipo mostró que tres de ellas (7-Oxf, 7-Nor/UK y 7-SPM) fueron idénticas ($Dg = 0$), mientras que con respecto a la secuencia de una cepa de Sudáfrica (7-Safr) presentaron una diferencia de un residuo de aminoácido ($Dg = 0.016$). La Dg intratípica para los AstH-7 fue, por lo tanto, de 0 a 0.016, lo que lo convierte en el genotipo más conservado (Tabla 5).

Finalmente, las tres cepas de AstH-8 (8-Mer) identificadas en este estudio tuvieron la misma secuencia en la región analizada (Fig. 6). La comparación de esta secuencia con las cinco secuencias disponibles para el genotipo 8 de AstH mostró que la Dg entre ellas varió entre 0 y 0.08 (Tabla 5).

La mayor Dg intratípica se encontró en los grupos de AstH-1 (Dg de 0 a 0.23) y AstH-4 (Dg de 0 a 0.24). Las cepas de AstH de genotipo 4 fueron además, las genéticamente más distantes del resto de los genotipos (Dg 0.70 a 0.84). Los genotipos más cercanamente relacionados fueron 3 y 7 (Dg intergenotipo de 0.12 a 0.16) seguidos por los genotipos 5 y 8 (Dg intergenotipo de 0.15 a 0.25) (Tabla 5 y Fig. 10)

Como se puede observar en la Tabla 5, la diversidad genética observada entre cepas pertenecientes a un mismo genotipo es siempre menor que la diversidad encontrada entre esas cepas y las pertenecientes a cualquier otro genotipo diferente. A pesar de que hay una limitada divergencia genética entre, por ejemplo, los genotipos 3 y 7 (Dg de 0.12 a 0.16), que es menor a la encontrada entre dos cepas de AstH de genotipo 4 (Dg = 0.24) o de AstH de genotipo 1 (Dg = 0.23), la diversidad intragenotipo 3 (Dg de 0 a 0.07) e intragenotipo 7 (Dg de 0 a 0.016) es lo suficientemente baja, como para no clasificar erróneamente cepas pertenecientes a estos genotipos. En la Fig. 10 se muestra de manera gráfica la relación genética que existe, en base a la región del genoma analizada, entre los diversos genotipos de AstH.

AstH	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0=0.23							
2	0.31 - 0.48	0=0.16						
3	0.33 - 0.41	0.2 - 0.28	0=0.07					
4	0.80 - 0.89	0.75 - 0.84	0.79 - 0.85	0=0.24				
5	0.43 - 0.49	0.39 - 0.48	0.36 - 0.43	0.77 - 0.82	0.02=0.15			
6	0.57 - 0.64	0.54 - 0.59	0.56 - 0.61	0.66 - 0.73	0.57 - 0.61	0.04=0.17		
7	0.36 - 0.46	0.26 - 0.34	0.11 - 0.18	0.77 - 0.84	0.39 - 0.44	0.54 - 0.59	0=0.02	
8	0.41 - 0.51	0.41 - 0.49	0.36 - 0.41	0.74 - 0.80	0.15 - 0.25	0.54 - 0.62	0.40 - 0.44	0=0.08

Tabla 5. Diversidad genética (Dg) entre los diferentes genotipos (1 a 8) de AstH. El grado de diversidad genética (Dg) se determinó como el número de cambios de aminoácidos entre dos secuencias dividido entre el número total (61 para los genotipos 1, 2, 3, 5, 7, y 8; 59 para el genotipo 4; y 53 para el genotipo 6) de residuos analizados.

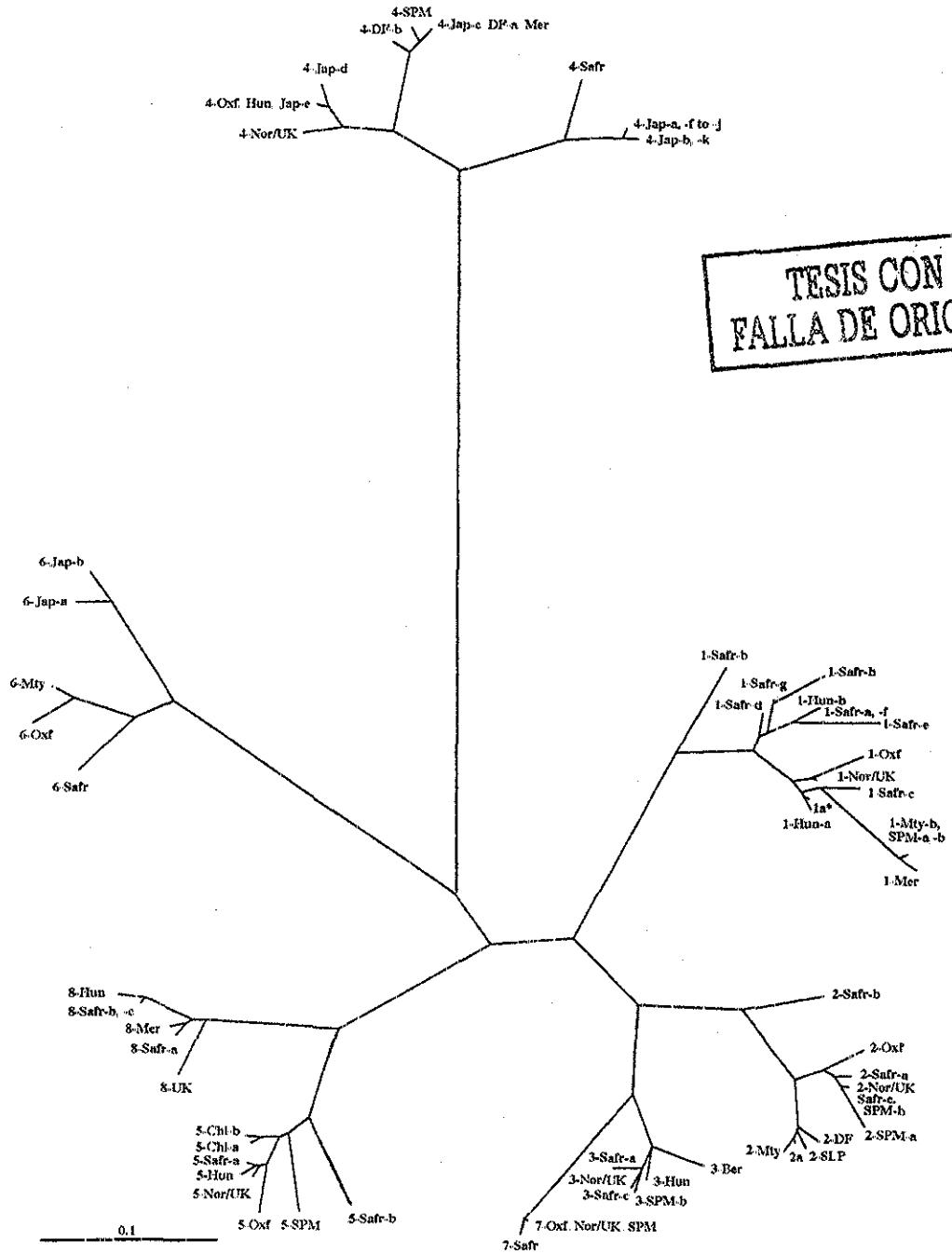


Fig. 10. Dendrograma que muestra la relación genética de la región del extremo 3' del ORF 2 estudiada de los diferentes genotipos de AstH. La barra de escala indica una distancia evolutiva de 0.1 residuos de aminoácidos por posición en la secuencia. 1a* corresponde a las cepas de AstH 1-New y Mty-a; 2a representa a las cepa 2-Tlx. Las secuencias utilizadas se obtuvieron de la base de datos del GenBank y se encuentran enumeradas en la sección de Material y Métodos.

3. Determinación de la prevalencia de adenovirus 40/41 (AdH)

Con la finalidad de ampliar el panorama del comportamiento epidemiológico de los principales virus de diarrea infantil en niños mexicanos menores de cinco años, durante el periodo estudiado se determinó también la prevalencia de AdH en las mismas muestras de heces analizadas para la detección de AstH (710 muestras negativas para rotavirus) por medio de un EIA comercial (Adenoclone®-Type 40/41 EIA, Cambridge Biotech).

Se encontró que durante el periodo evaluado, la prevalencia de AdH en los niños con y sin diarrea fue del 2.8 y 1.1%, respectivamente. La prevalencia de AdH en los niños con diarrea varió de 0% (DF y SLP) a 5.3% (Mer), mientras que en los niños sin diarrea fue de 0% (SLP y Ilx) a 3.8% (DF) (Tabla 6). Al igual que en el caso de los astrovirus, se observó una tendencia a la asociación entre la presencia de AdH y la presencia de síntomas diarreicos, aunque sin significancia estadística ($\chi^2 = 2.623$; $P = 0.1$).

Región/Niños	DF	SLP	Tlx	Mer	Mty	Total
S	0/53	0/21	1/53	5/95	4/133	10/355
(%)	(0)	(0)	(1.9)	(5.3)	(3.0)	(2.8)
A	2/53	0/21	0/53	1/95	1/133	4/355
(%)	(3.8)	(0)	(0)	(1.1)	(0.8)	(1.1)

Tabla 6. Prevalencia de AdH en niños mexicanos menores de cinco años de edad S – muestras de heces de niños con diarrea; A – muestras de heces de niños sin diarrea; DF - Distrito Federal; Tlx - Tlaxcala; SLP - San Luis Potosí; Mer - Mérida y Mty - Monterrey.

Coinfecciones de AdH con AstH y RvH

En las muestras de los niños sintomáticos no se detectó ninguna infección doble con AdH y AstH, y solamente en una de las muestras de los niños asintomáticos (1/355) se identificó la presencia de ambos virus.

Las coinfecciones de AdH y RvH se evaluaron en las 240 muestras positivas para RvH en las que previamente se había analizó la presencia de AstH. La presencia de los dos virus se detectó en el 1.2% (2/167) de los niños sintomáticos y en 2.7% (2/73) de los niños asintomáticos.

En general, en los niños con diarrea las coinfecciones más frecuentes fueron las de AstH con RvH (3.0%) seguidas por las de AdH con RvH (1.2%) y no se detectaron infecciones duales de AstH con AdH. En los niños asintomáticos, las coinfecciones de AstH con RvH fueron tan frecuentes (2.7%) como las de RvH con AdH y sólo en una muestra (1/355) se detectó la coexistencia de AstH con AdH. No se detectaron infecciones virales triples con AstH, AdH y RvH (Tabla 7).

Virus / Niños	S	A
AstH + AdH	0% (0/355)	0.002% (1/355)
AstH + RvH	3.0% (5/167)	2.7% (2/73)
AdH + RvH	1.2% (2/167)	2.7% (2/73)
AstH + AdH + RvH	0% (0/522)	0% (0/428)

Tabla 7. Frecuencias de coinfecciones entre AstH, AdH y RvH

Artículo I

Con los resultados hasta aquí descritos se escribió el artículo:

**"Prevalencia y Diversidad Genética de Astrovirus de
Humano en Niños Mexicanos con Infecciones
Sintomáticas y Asintomáticas"**

enviado a la revista *Journal of Clinical Microbiology*

Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections

Martha Méndez-Toss¹, Dixie D. Griffin^{1†}, Juan Calva², Juan F. Contreras³, Fernando I. Puerto⁴, Felipe Mota⁵, Héctor Guiscafré⁶, Roberto Cedillo^{6¶}, Onofre Muñoz⁶, Ismael Herrera⁷, Susana López¹, and Carlos F. Arias^{1*}

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos; ²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City; ³Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León; ⁴Centro de Investigaciones Regionales “Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán; ⁵Departamento de Medicina Comunitaria e Hidratación Oral, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City; ⁶Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City; ⁷Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, San Luis Potosí; Mexico.

Running title: astrovirus type diversity

*Corresponding author: Dr. Carlos F. Arias, Instituto de Biotecnología/UNAM, A.P. 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos 62250, México. Tel (52-777) 311-4701, 329-1661; Fax (52-777) 317-2388; e-mail: arias@ibt.unam.mx

†Current address: Medical College of Georgia, Augusta, GA

¶Current address: Instituto Mexicano del Seguro Social / Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán

ABSTRACT

The prevalence and type diversity of human astroviruses (HAstV) in children with symptomatic and asymptomatic infections were determined in five localities of Mexico. HAstV were detected in 5.4% (19/355) and 2.6% (9/355) of rotavirus-negative children with and without diarrhea, respectively. Genotyping of the detected strains showed that at least six (1, 2, 3, 4, 6, and 8) of the eight known HAstV types circulated in Mexico between October 1994 and March 1995. HAstV types 1 and 3 were the most prevalent in children with diarrhea, although they were not found in all localities studied. HAstV type 8 was found only in Mérida, where it was as prevalent (40%) as type 1 viruses, indicating that this astrovirus type is more common than previously recognized. A correlation between the HAstV infecting type and the presence or absence of diarrheic symptoms was not observed. Enteric adenoviruses were also studied, and they were found to be present in 2.8% (10/355) and 1.1% (4/355) of symptomatic and asymptomatic children, respectively.

INTRODUCTION

Human astroviruses (HAstV) are recognized as a common cause of infantile gastroenteritis worldwide (5, 29). The astrovirus virions are 28 to 34 nm nonenveloped particles which were first described in 1975 (1, 12), and epidemiological studies carried out in different locations of the world have reported astrovirus prevalence rates of 2% to 16% among children hospitalized with diarrhea and of 5% to 17% among children with diarrhea in community-based studies (29).

HAstV belong to the *Astroviridae* family which comprises a single genus, *Astrovirus* (22). The HAstV genome is a polyadenylated plus-stranded RNA molecule of about 7 kb organized in three open reading frames (ORFs): ORF1a and ORF1b, at the 5' end of the genome, code for the nonstructural viral proteins, while ORF2, at the 3' end, encodes the capsid proteins (8). According to the nucleotide and amino acid sequence of a relatively conserved amino-terminal region of ORF2, these viruses have been grouped into eight genotypes (13, 18), which have been shown to entirely correlate with the eight established HAstV serotypes (9-11, 27). Typing surveys indicate that HAstV type 1 is the most prevalent, types 2 to 4 are common, and types 5 to 7 are less common, while type 8 has only recently been identified (4-6, 16, 17, 24). These studies have shown that it is not uncommon to find two or more astrovirus types circulating in one region during a given period of time, and have also described variations of the prevalent astrovirus type with time (6, 11, 16, 17, 24, 25, 30).

The prevalence of HAstV in children with no diarrheic symptoms has also been determined, although in a more limited number of studies. These viruses have been found in about 2.0% of the children analyzed (2, 3, 7, 28, 30) however, the astrovirus types associated with these asymptomatic infections has not been characterized.

In this study we have determined the frequency of HAstV infection in diarrheic and nondiarrheic children in five different localities of Mexico; the genotype diversity of the HAstV strains associated to symptomatic and asymptomatic infections and; the genetic diversity of these strains. We also evaluated the coinfection of astroviruses with adenovirus 40/41 and with rotaviruses.

MATERIALS AND METHODS

Stool specimens. The samples included in this work were part of a larger study designed to determine the antigenic diversity of rotavirus strains circulating in Mexico during the period of October 1994 to March 1995 (15, 20). Two groups of samples were analyzed. The first group comprised 710 rotavirus-negative specimens: 355 from diarrheic (symptomatic) and 355 from nondiarrheic (asymptomatic) children. The second group comprised 240 rotavirus-positive stools from 168 symptomatic and 72 asymptomatic children. The symptomatic samples were collected from infants admitted for acute diarrhea to hospitals or outpatients clinics, while asymptomatic children were included from the outpatient clinics when they requested medical attention for diseases other than diarrhea (15). This study was carried out in five different locations: Mexico City; Tlaxcala, Tlaxcala; San Luis Potosí, San Luis Potosí; Monterrey, Nuevo León; and Mérida, Yucatán.

Astrovirus and adenovirus 40/41 detection. Fecal specimens were tested for the presence of astroviruses and enteric adenoviruses using commercial enzyme-linked immunosorbent assays (EIA) (IDEIA-astrovirus, Dako Diagnostics; Premiere Adenoclone-Type 40/41, Meridian Diagnostics, Inc.)

RNA extraction and PCR amplification of the 3'-terminal region of HAsV ORF2. Total RNA was isolated directly from fecal samples. The feces were diluted in phosphate-buffered saline solution (pH 7.2) to a 10-20 % concentration, extracted with freon, and ultracentrifuged (55,000 rpm, TLA 100.2 rotor, OPTIMA

TLX ultracentrifuge, Beckman Instruments, Inc.) for 40 min at 4° C. The RNA in the pellet was extracted with Trizol (trizol reagent, GIBCO, BRL) and resuspended in 10 µl of sterile water. The viral RNA was used to amplify the ORF2 3'-terminal region by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The first cDNA strand was synthesized at 42°C for 50 min using 1 µl of template RNA and 1 µM of primer End (23) in 20 µl of reaction mix containing 20 U of SuperScript RNase H⁻ reverse transcriptase (GIBCO, BRL). The primers used for PCR were End and Beg (23) for genotypes 1 to 3, and 5 to 8; or Beg-4 [5'-GGGCTTGAGGAGGATCAAAC-3', nucleotides 1957-1976 in HAstV-4 (Z33883) ORF2] and End for genotype 4 viruses. The PCR reaction was performed in a 25 µl reaction mix containing 1 µl of cDNA, 1 U of Vent DNA polymerase (New England, Biolabs, Inc.) and 2.5 µM of the PCR primers. The amplification conditions were 1 min at 94°C, thirty five amplification cycles (94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec and 72°C for 25 sec) and 15 min at 72° C. The expected PCR fragment sizes were 241 bp for genotypes 1, 2, 3, 5, 7, and 8; 217 bp for genotype 6; and 362 bp for genotype 4. The PCR products were analyzed on 2 % agarose gels and detected by ethidium bromide staining.

Astrovirus genotyping. The PCR amplicons were extracted and purified for sequencing with an ABI Prism DNA automatic sequencer, Model 377-18 (Perkin Elmer). Sequence alignment was made by ClustalX analysis (<ftp://ftp-igbmc.ustrasbg.fr/pub/ClustalX/>) of the nucleotide and amino acid sequences obtained in the present work, together with the sequences in databanks whose accession numbers are listed next. For HAstV-1: L23513 (1-Oxf), Y08627 (1-Nor/UK), S68561 (1-New),

AF395734 (1-Hun-a), AF395733 (1-Hun-b), AY094088 (1-Safr-a), AY094086 (1-Safr-b), AY094082 (1-Safr-c), AY094081 (1-Safr-d), AY094080, (1-Safr-e), AY093655 (1-Safr-f), AY093654 (1-Safr-g), AY093652 (1-Safr-h), AF257225 (1-SPM-a) and AF257222 (1-SPM-b). For HAstV-2: L06802 (2-Oxf), Y08628 (2-Nor/UK), AY094085 (2-Safr-a), AY094084 (2-Safr-b), AY094079 (2-Safr-c), AF257229 (2-SPM-a) and AF257226 (2-SPM-b). For HAstV-3: AF141381 (3-Ber:), AF257223 (3-SPM-a), AF257227 (3-SPM-b), AF395735 (1-Hun), AY094090 (3-Safr-a), AY094087 (3-Safr-b), AY093650 (3-Safr-c), Y08629 (3-Nor/UK) and AF117209 (3-USA). For HAstV-4: Z33883 (4-Oxf), AF395736 (4-Hun), AF257228 (4-SPM), AB025812 (4-Jap-a), AB025811 (4-Jap-b), AB025801 (4-Jap-c), AB025803 (4-Jap-d), AB025802 (4-Jap-e), AB025809 (4-Jap-f), AB025808 (4-Jap-g), AB025807 (4-Jap-h), AB025805 (4-Jap-i), AB025804 (4-Jap-j), AB025806 (4-Jap-k) and AB025810 (4-Jap-l), AY094092 (4-Safr), Y08630 (4-Nor/UK). For HAstV-5: U15136 (5-Oxf), AB037274 (5-Chi-a), AB037273 (5-Chi-b), AF395737 (5-Hun), Y08631 (5-Nor/UK), AY094089 (5-Safr-a), AY093651 (5-Safr-b), and AF257224 (5-SPM). For HAstV-6: Z46658 (6-Oxf), AB031031 (6-Jap-a), AB031030 (6-Jap-b) and AY093653 (6-Safr). For HAstV-7: AF248738 (7-Oxf), Y08632 (7-Nor/UK), AY094091 (7-Safr) and AF257221 (7-SPM). For HAstV-8: Z66541 (8-RU), AF395738 (8-Hun), AF292079 (8-Safr-a), AY094083 (8-Safr-b), AY093649 (8-Safr-c) and AF260508 (Mer-8). In parenthesis is shown the corresponding nomenclature used in Figs. 1 and 3

All listed sequences, including sequences obtained in the present work, were used to determine the ORF2 3'-end intra- and inter-type genetic diversity (Table 1).

They were used also to construct the phylogenetic tree with ClustalX and TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview/>) programs.

RESULTS AND DISCUSSION

HAsV prevalence in symptomatic and asymptomatic children.

During the period from October 1994 to March 1995 stool samples were collected from children less than 5 years old with and without diarrhea in five locations of Mexico (Mexico City, San Luis Potosí, Tlaxcala, Mérida, and Monterrey). In a previous study these samples had been screened for rotaviruses, which were found to be present in 54% (20) and 7% (unpublished results) of the symptomatic and asymptomatic children, respectively. In this study, the presence of HAsV in a total of 710 rotavirus-negative samples (355 diarrheic and 355 nondiarrheic) was determined by an enzyme immunoassay (EIA). The prevalence of astroviruses in symptomatic children was 5.4% (19/355), while in asymptomatic children it was 2.5% (9/355); the presence of astrovirus particles was confirmed by immunoelectron microscopy in 24 of the 28 EIA-positive samples.

HAsV were found in the five locations studied, indicating that these viruses are widely distributed along the country. The prevalence of HAsV varied from 3% (Monterrey) to 11.3% (Mexico City) within the symptomatic children, and from 0% (San Luis Potosí) to 4.2% (Mérida) within the asymptomatic children (data not shown). In general, a tendency to the association between the presence of HAsV and diarrheic symptoms was observed ($\chi^2 = 3.718$, $P = 0.054$), although without reaching statistical significance.

The prevalence of HAsV in symptomatic children found in this work is similar to the frequency reported from other regions of the world, where it has been

described to fluctuate between 2 and 16% (2, 4, 16, 21, 25, 26, 28). Likewise, the HAstV prevalence found among the asymptomatic children is also similar to the prevalence of around 2.0% observed in asymptomatic astrovirus infections in Bangladesh (28), France (2), Guatemala (3) and Thailand (7).

Genotype diversity of HAstV strains. To determine the genomic type (genotype) of the detected HAstV strains, the 3'-end region of the genome, encoding the 61 carboxy terminal amino acids of ORF2 (excluding the 5 amino acids at the carboxy terminus of the polyprotein) was amplified by RT-PCR and sequenced. This region has been shown to be variable between strains belonging to different serotypes (13), and phylogenetic analysis of a region somewhat larger than this showed that eight genogroups can be differentiated, with different isolates of the same serotype clustering together, indicating that typing antibodies differentiate between phylogenetically distinct groups defined by the 3'-end sequence of HAstV ORF2 (14, 30).

The sequence of 20 (16 from symptomatic and 4 from asymptomatic children) out of the 28 detected HAstV strains was determined. The ORF2 fragment from the remaining 8 strains could not be amplified. All typed astrovirus strains had sequences related to one of the eight known serotypes (Fig. 1), and phylogenetic analysis of all available sequences of the carboxy terminal region of astrovirus ORF2 showed that each Mexican isolate clustered with one of the eight described genogroups (Fig. 2). Four (25%) of the strains from symptomatic children clustered with genotype 1 HAstV strains; four (25%) with genotype 3 strains; three (19%)

with genotype 2; three (19%) with genotype 4 and; two (12%) with genotype 8 astroviruses. The four isolates detected in the samples from asymptomatic children were of types 1, 2, 3, and 8. Of particular interest was the finding of three genotype 8 strains in Mérida, since this astrovirus type has only been sporadically detected in Australia (16), Egypt (17), South Africa (27) and Spain (6).

The genotype diversity of HAstV found in this study, together with the previous detection of HAstV types 1 to 5 and 7 in Mexico City (30), indicates that the eight known astrovirus types circulate in Mexico. The high diversity of astrovirus types is not uncommon and has also been reported in countries like Bangladesh, Egypt, Spain, and England (6, 11, 17, 28).

The four HAstV types detected in the asymptomatic controls were also found among the symptomatic children, having identical (types 1, 3, and 8) or very similar (type 2) sequences in the ORF2 region analyzed (Fig. 1). These results suggest that there is not an association between the HAstV infecting type and the presence or absence of diarrheic symptoms, although a larger number of astrovirus strains isolated from symptomatic and asymptomatic infants needs to be characterized to address this question.

Genetic diversity of HAstV. In order to determine the genetic diversity (Gd) of the analyzed ORF2 region of HAstV, we calculated the intra- and inter-type virus diversity using the amino acid sequences determined in this work together with those previously reported (Table 1). The Gd was calculated as the quotient of the number of amino acid changes divided by the total number of amino acid residues

analyzed (61 for types 1, 2, 3, 5, 7, and 8; 59 for type 4; and 53 for type 6). This analysis showed that the intra-type Gd is always lower than that found between different types (Table 1). Despite the fact that in some cases there is a low Gd between viruses that are classified as different types (for instance types 3 and 7, Gd = 0.12 to 0.16), the intra-type Gd for type 3 (0 to 0.066) and type 7 (0 to 0.016) viruses is low enough to correctly classify the HAstV strains belonging to these types.

The analysis of the ORF2 amino acid sequences from the astrovirus strains identified in this study showed that in some cases multiple specimens from the same location had identical sequence (Fig. 1). For instance, all HAstV strains belonging to types 1 and 8 from Mérida had the same intra-type sequence, regardless if they were isolated from a symptomatic or asymptomatic patient or if they were obtained from a rotavirus-negative or rotavirus-positive (see below) sample; this was also the case for four of the five type 1 astrovirus strains from Monterrey (1-Mty-a) (Fig. 1). In addition, despite the fact that the type 4 strains have the highest intra-type genetic diversity (0 to 0.24, see Table 1), the type 4 viruses detected in this study were all very closely related (Gd 0.02). Similarly, the sequence of the four identified type 2 strains (Fig. 1; 2-DF, 2-Mty, 2-SLP, and 2-Tlx) differed between them at only one or two amino acid positions (Gd 0.02 to 0.03). HAstV type 3 was the most conserved, as the six strains identified, from three different locations (two from Mexico City, two from Monterrey, and two from Tlaxcala) had all an identical sequence.

In general, the Mexican HAstV strains belonging to a given type were more similar among them than to strains of the same type isolated from other parts of the world, however, there were some exceptions. In HAstV type 1 viruses, almost all Mexican strains that were detected, including those previously reported (30), were very closely related (Gd 0.02). However, four viruses from Monterrey (1-Mty-a) had a sequence identical to that of a strain from Newcastle, England (1-New) and had only one amino acid change (Gd \leq 0.02) compared to strains from Norway/UK, and Hungary (Fig. 1). The type 3 Mexican strains characterized in this study had a sequence identical to that of strains from Norway/UK, United States, and South Africa, indicating that viruses within this type are very conserved. The type 4 Mexican strains clustered together with one of the Japanese strains previously characterized (4-Jap-c, Gd 0 to 0.02), but clearly differed from other Japanese strains (Gd 0.08 to 0.17) (Figs. 1 and 2). The only type 6 (6-Mty) HAstV strain detected was different from other type 6 reported strains from Japan and Hungary, and was more closely related to a United Kingdom isolate. Finally, the three type 8 strains detected in Mérida were similar to a South African isolate (8-Safr-a; Gd 0.03), and were more distant from the United Kingdom strain (Gd 0.07).

The low intra-type RNA sequence diversity observed in this and a previous work (19), is reflected in the conserved intra-type amino acid sequence of the ORF2 region analyzed. This observation, together with the distinct differences among types, suggests that the different astrovirus types diverged long time ago, and support the idea that the serotype based on the reactivity of antibodies are phylogenetically distinct groups (14, 19). The low intra-type genetic diversity observed might also be useful to trace the origin and movement of HAstV strains around the world.

Geographical distribution of the HAstV types. The distribution of the HAstV genotypes varied from one region to another (Fig. 3). The most widely distributed were type 2 astroviruses, which were present in four of the five locations studied, while type 8 astroviruses were found only in Mérida, where they were as prevalent (40%) as HAstV type 1. At least 2 different types were found to cocirculate in each location, with the exception of San Luis Potosí, where only one sample was found to be positive for astrovirus. In symptomatic children astrovirus types 1 and 3 were the most frequently detected (25% each), however, they were not present in all locations studied; type 1 viruses were found only in Mérida and Monterrey, while type 3 viruses were detected only in Mexico City and Tlaxcala. This sort of heterogeneous distribution of astrovirus types has also been observed in other studies; for instance, in a survey carried out in five regions of Japan, type 1 viruses were present in all locations studied, while the circulation of types 2 and 3, the other two HAstV types identified, was limited to particular locations (24).

Thus, although the eight HAstV types circulate in Mexico, their prevalence varies from one location to another, and it also seems to depend on the period of time evaluated, since in a previous study carried out in a small periurban community of Mexico City it was observed that the HAstV type distribution changed along the year (30). Thus, for instance, in a given year type 3 was detected from January to March, while type 2 viruses were found from April to August (30). The reasons for the variation of the prevalent HAstV types with time and location are, however, unknown.

Coinfection of astroviruses, rotaviruses, and adenoviruses. To assess the frequency of dual infections of HAstV and rotaviruses, 240 rotavirus-positive samples (167 diarrheic and 73 nondiarrheic), randomly selected from the collection, were tested for the presence of HAstV. Astroviruses were found in 3% (5/167) of the diarrheic and in 2.7% (2/73) of the nondiarrheic samples. HAstV types 1 (3/5), 3 (1/5) and 6 (1/5) were present in samples from symptomatic children, while one of the two HAstV strains identified in the asymptomatic controls was of type 1 and the other one could not be typed (Fig. 1).

Despite the fact that dual infections of human astroviruses and rotaviruses in children with diarrhea are common (2, 4), it is not clear whether the infection with one of these viruses favors the infection by the second. The observation in this study that astroviruses are found at similar frequencies in both rotavirus-positive and rotavirus-negative diarrheic stools suggests that there is not a synergy between the infection of these two viruses.

The presence of enteric adenoviruses was determined by EIA in the same fecal samples that were used for astrovirus detection. Adenoviruses were present in 14 out of the 710 rotavirus-negative samples analyzed. In symptomatic children 2.8% (10/355) of the samples were positive for these viruses, while in asymptomatic children their prevalence was of 1.1% (4/355). No coinfections between adenoviruses and HAstV were detected. In the case of the rotavirus-positive samples, dual infections of rotaviruses and adenoviruses were found in 1.2% (2/167) and 2.7% (2/73) of the samples from symptomatic and asymptomatic children, respectively.

The astrovirus prevalence rate found in this study was twice as high as that of enteric adenoviruses, but much lower than that reported for rotaviruses in the same collection of samples. However, to establish the relative epidemiological importance of these and other gastrointestinal viruses in symptomatic and asymptomatic infections in Mexico, it is important to carry out additional studies that span at least two consecutive years and several different geographical locations of the country.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical assistance of Eugenio López, Paul Gaytán and René Hernández for the synthesis of oligonucleotides and DNA sequencing. This study was partially supported by grants 75197-527106 and 55000613 from the Howard Hughes Medical Institute; and IN200999 from DGAPA/UNAM.

REFERENCES

1. **Appleton, H., and P. G. Higgins.** 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet.* 1:1297.
2. **Bon, F., P. Fascia, M. Dauvergne, D. Tenenbaum, H. Planson, A. M. Petion, P. Pothier, and E. Kohli.** 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J. Clin. Microbiol.* 37:3055-3058.
3. **Cruz, J. R., A. V. Bartlett, J. E. Herrmann, P. Caceres, N. R. Blacklow, and F. Cano.** 1992. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J. Clin. Microbiol.* 30:1140-1144.
4. **Gaggero, A., M. O'Ryan, J. S. Noel, R. I. Glass, S. S. Monroe, N. Mamani, V. Prado, and L. F. Avendano.** 1998. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 36:3691-3693.
5. **Glass, R. I., J. Noel, D. Mitchell, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, L. K. Pickering, P. Dennehy, G. Ruiz-Palacios, M. L. de Guerrero, and S. S. Monroe.** 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch. Virol. Suppl.* 12:287-300.
6. **Guix, S., S. Caballero, C. Villena, R. Bartolomé, C. Latorre, N. Rabella, M. Simó, A. Bosch, and R. M. Pinto.** 2002. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Barcelona, Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40:133-139.

7. **Herrmann, J. E., D. N. Taylor, P. Echeverria, and N. R. Blacklow.** 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N. Engl. J. Med.* **324**:1757-1760.
8. **Jiang, B., S. S. Monroe, E. V. Koonin, S. E. Stine, and R. I. Glass.** 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:10539-10543.
9. **Koopmans, M. P., M. H. Bijen, S. S. Monroe, and J. Vinje.** 1998. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**:33-37.
10. **Kurtz, J. B., and T. W. Lee.** 1984. Human astrovirus serotypes. *Lancet.* **2**:1405.
11. **Lee, T. W., and J. B. Kurtz.** 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol. Infect.* **112**:187-193.
12. **Madeley, C. R., and B. P. Cosgrove.** 1975. Viruses in infantile gastroenteritis. *Lancet.* **ii**:124.
13. **Mendez-Toss, M., P. Romero-Guido, M. E. Munguia, E. Mendez, and C. F. Arias.** 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J. Gen. Virol.* **81**:2891-2897.
14. **Monceyron, C., B. Grinde, and T. O. Jonassen.** 1997. Molecular characterisation of the 3'-end of the astrovirus genome. *Arch. Virol.* **142**:699-706.
15. **Mota-Hernández, F., C. Gutiérrez-Camacho, S. Villa-Contreras, J. J. Calva, C. Arias, L. Padilla-Noriega, H. Guiscafré-Gallardo, M. L.**

- Guerrero, S. López, O. Muñoz, J. F. Contreras, R. Cedillo, I. Herrera, and F. Puerto.** 2002. Diarrhea Severity by Different VP4 and VP7 Rotavirus Serptypes. *J. Clin. Microbiol.* **Submitted.**
16. **Mustafa, H., E. A. Palombo, and R. F. Bishop.** 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* **38:1058-1062.**
17. **Naficy, A. B., M. R. Rao, J. L. Holmes, R. Abu-Elyazeed, S. J. Savarino, T. F. Wierzba, R. W. Freneck, S. S. Monroe, R. I. Glass, and J. D. Clemens.** 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J. Infect. Dis.* **182:685-690.**
18. **Noel, J. S., T. W. Lee, J. B. Kurtz, R. I. Glass, and S. S. Monroe.** 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **33:797-801.**
19. **Oh, D., and E. Schreier.** 2001. Molecular characterization of human astroviruses in Germany. *Arch. Virol.* **146:443-455.**
20. **Padilla-Noriega, L., M. Méndez-Toss, G. Menchaca, J. Contreras, P. Romero-Guido, F. Puerto, H. Guiscafré, F. Mota, I. Herrera, R. Cedillo, O. Muñoz, J. Calva, M. L. Guerrero, B. S. Coulson, H. B. Greenberg, S. López, and C. F. Arias.** 1998. Antigenic and Genomic Diversity of Human Rotavirus in Two Consecutive Epidemic Seasons in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* **36:1688-1692.**
21. **Qiao, H., M. Nilsson, E. R. Abreu, K. O. Hedlund, K. Johansen, G. Zaori, and L. Svensson.** 1999. Viral diarrhea in children in Beijing, China. *J. Med. Virol.* **57:390-396.**

22. **Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, R. F. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner.** 2000. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of viruses: 741-746.
23. **Saito, K., H. Ushijima, O. Nishio, M. Oseto, H. Motohiro, Y. Ueda, M. Takagi, S. Nakaya, T. Ando, R. Glass, and et al.** 1995. Detection of astroviruses from stool samples in Japan using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *Microbiol. Immunol.* **39**:825-828.
24. **Sakamoto, T., H. Negishi, Q. H. Wang, S. Akihara, B. Kim, S. Nishimura, K. Kaneshi, S. Nakaya, Y. Ueda, K. Sugita, T. Motohiro, T. Nishimura, and H. Ushijima.** 2000. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J. Med. Virol.* **61**:326-331.
25. **Shastri, S., A. M. Doane, J. Gonzales, U. Upadhyayula, and D. M. Bass.** 1998. Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2571-2574.
26. **Shetty, M., T. A. Brown, M. Kotian, and P. G. Shivananda.** 1995. Viral diarrhoea in a rural coastal region of Karnataka India. *J. Trop. Pediatr.* **41**:301-303.
27. **Taylor, M. B., J. Walter, T. Berke, W. D. Cubitt, D. K. Mitchell, and D. O. Matson.** 2001. Characterisation of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. *J. Med. Virol.* **64**:256-261.
28. **Unicomb, L. E., N. N. Banu, T. Azim, A. Islam, P. K. Bardhan, A. S. Faruque, A. Hall, C. L. Moe, J. S. Noel, S. S. Monroe, M. J. Albert,**

- and R. I. Glass.** 1998. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**:611-614.
29. **Walter, J. E., and D. K. Mitchell.** 2000. Role of astroviruses in childhood diarrhea. *Curr. Opin. Pediatr.* **12**:275-279.
30. **Walter, J. E., D. K. Mitchell, M. L. Guerrero, T. Berke, D. O. Matson, S. S. Monroe, L. K. Pickering, and G. Ruiz-Palacios.** 2001. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. *J. Infect. Dis.* **183**:681-686.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of the carboxy terminal region of ORF2 from different HAstV types. The sequences within a given type are aligned with a reference strain whose serotype has been determined with serotyping antibodies. The 26 HAstV sequences obtained in the present study are included in this alignment, together with all sequences reported for this region for HAstV isolated from different parts of the world. The names of the corresponding Mexican astrovirus strains are shown in bold. In parenthesis it is shown the number of HAstV strains found in this study having identical sequence. The column S/A indicate if the HAstV strain was isolated from a diarrheic (S) or nondiarrheic (A) Children. The RVH superindex in this column indicates that the corresponding astrovirus strain was identified in a rotavirus-positive sample. Sequence numbering is according to the ORF2 polyprotein sequence of each reference strain. Empty spaces indicate amino acid identity. Ber - HAstV strain from Berlin, Germany. Chi - strain from China. DF - strain from Mexico City, Mexico. Hun - strain from Hungary. Jap - strain from Japan. Mer - strain from Mérida, Mexico. Mty - strain from Monterrey, Mexico. New - strain from Newcastle, England. Nor/UK - strain from Norway and/or UK. Oxf - strain from Oxford, England. Safr - strain from South Africa. SLP - strain from San Luis Potosí, Mexico. SPM - strain from San Pedro Martir, Mexico. Tlx - strain from Tlaxcala, Mexico. UK - strain from United Kingdom. USA - strain from United States of America. The letters a, b, c, etc. identify more than one specimen from the same location.

Fig. 2. Phylogenetic tree of the 61 amino acid residues region of ORF2 of isolates from different locations of the World, including the sequences obtained in the present study. The scale bar indicates an evolutionary distance of 0.1 amino acid residue per position in the sequence. Sequences were obtained from the GenBank database with the accession numbers listed in the section Materials and Methods.

Fig. 3. Geographical distribution of HAstV types identified in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections in five locations of Mexico. DF (Mexico City), SLP (San Luis Potosí), Tlx (Tlaxcala), Mer (Mérida) and Mty (Monterrey).

AstH	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0-0.23							
2	0.31 - 0.48	0-0.16						
3	0.33 - 0.41	0.2 - 0.28	0-0.07					
4	0.80 - 0.89	0.75 - 0.84	0.79 - 0.85	0-0.24				
5	0.43 - 0.49	0.39 - 0.48	0.36 - 0.43	0.77 - 0.82	0.02 - 0.15			
6	0.57 - 0.64	0.54 - 0.59	0.56 - 0.61	0.66 - 0.73	0.57 - 0.61	0.04 - 0.17		
7	0.36 - 0.46	0.26 - 0.34	0.11 - 0.18	0.77 - 0.84	0.39 - 0.44	0.54 - 0.59	0-0.02	
8	0.41 - 0.51	0.41 - 0.49	0.36 - 0.41	0.74 - 0.80	0.15 - 0.25	0.54 - 0.62	0.40 - 0.44	0-0.08

Table.1

Type	Strain	S/A	722	782
1	Oxf		MTMIRATRIARRAPPILSDRIKRGVYMDLIVSGVSPGNAWSHACEARKAVGEINPCISGS	
1	Nor/UK			A I
1	New Mty-a (4)	2S, 1S ^{RVH} , 1A ^{RVH}		A I
1	Hun-a			A S
1	Safr-d		T	NS
1	Safr-g		T K	A NS
1	Hun-b		T	A NS
1	Safr-h		T K TP	A NS
1	Safr-a -f		A	A NS
1	Safr-c		A	FI
1	Safr-b		VA	I K
1	Safr-c		K	A A
1	SPM-a, -b, Mty-b (1)	1S ^{RVH}	K	A A D
1	Mer (4)	2S, 1S ^{RVH} , 1A	K	A A D
2	Oxf		MTIVERAIRITKRAPPTCAEKLKRSVYMDLIVSGVSPSSAWSNACDEARNVGSNQIAKISGD	791
2	Nor/UK Safr-c SPM-b			T
2	Safr-a		X	T
2	SPM-a			I I
2	Tlx (1)	1S		I I
2	Mty (1)	1A		V H
2	DF-2 (1)	1S		A I
2	SLP-2 (1)	1S		T I
2	Safr-b			I I
3	Ber		MTIVERAIRITKRAPPTCAEKLKRSVYMDLIVSGVSPGNAWSHACEARIMGINQTPMVSGD	789
3	SPM-b			D
3	Hun			D
3	Safr-a			D
3	Safr-c			D
3	Nor/UK, Safr-b SPM-a, USA, DF (2), Tlx (2), Mty (2)	4S, 1S ^{RVH} , 1A		D
4	Oxf, Hun Jap-e		ISRERATYIGMSAYPNVWGSGBEQSISQHIQEISSDDVGAGAHYSCVCERKQQSINQGS	766
4	Jap-d			A
4	Nor/UK			S
4	Safr			D
4	Jap-a -f to -j			D
4	Jap-b -k			D
4	SPM			M
4	Jap-c -l, DF-a (1), Mer (1)	2S		M
4	DF-b (1)	1S		M
5	Oxf		MSVERATKITSNAPPTRAARIRRSVYNDLIVSVI.DPDAAWSHACEQARKVGDNDHDLQISGS	778
5	Nor/UK			G G
5	Hun			G G
5	Safr-a			G G
5	Chi-a		R	G G
5	Chi-b		R	G G
5	SPM		R	G H G
5	Safr-b		A R N	I
6	Oxf		VIVDRAIMITNRAFPPIPNYKPRRREPSNDLIVSGVSPGNAWSHACEARIMGTNHMPNVSGD	777
6	Mty (1)	1S ^{RVH}		M
6	Safr			M
6	Jap-a			M
6	Jap-b			M
7	Oxf, Nor/UK SPM		MTIVERAIMITKRAPPTCADKQKRSVYMDLIVSGVSPGNAWSHACEARIMGTNHMPNVSGD	786
7	Safr			T
8	UK		ISVERATRIINGAFPPTDRMRRSVYNDLIVSGVSPGNAWSHACEQARRAGDNDHDLQISGS	777
8	Safr-a			A A A
8	Hun		D	A A A
8	Safr-b, -c			T A A
8	Mer (3)	2S, 1A		T A A

Fig 1

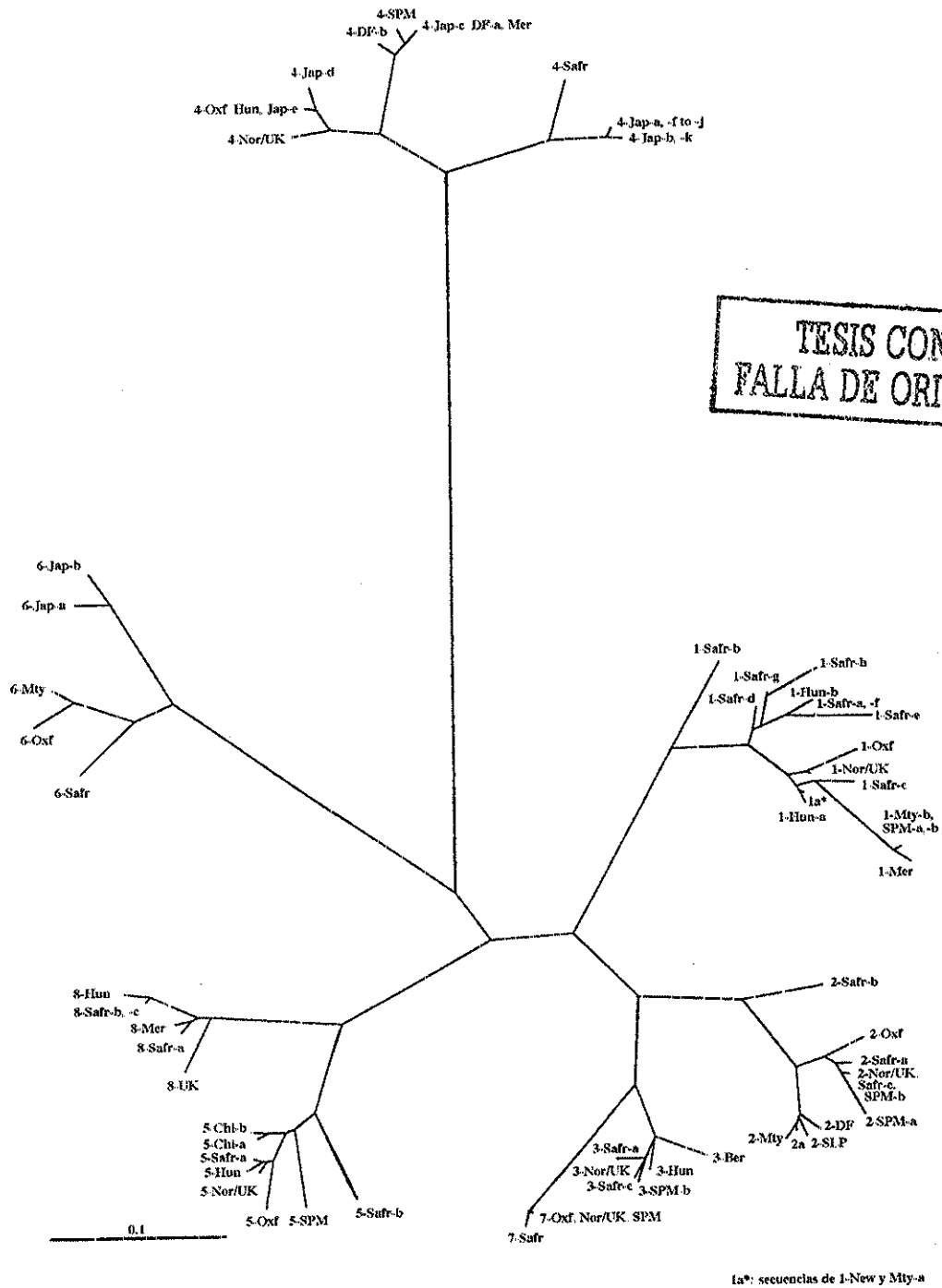


Fig. 2

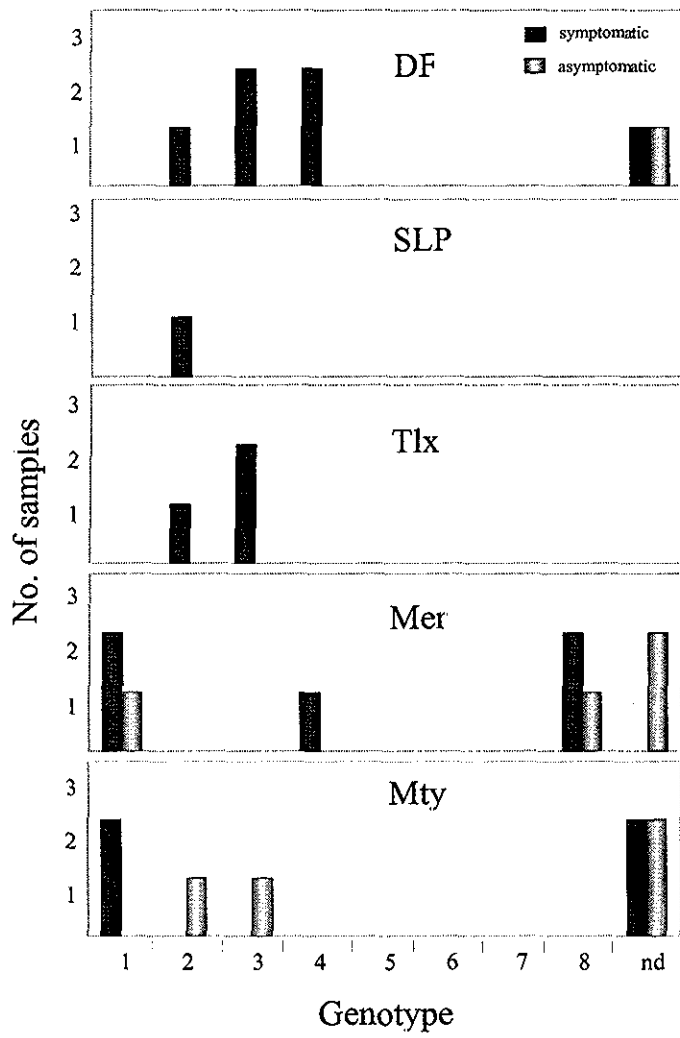


Fig. 3

2. Aislamiento y caracterización del genoma de una cepa de AstH.

Como se mencionó, el conocimiento sobre la biología molecular de los AstH es muy escaso. Así, con la finalidad de comenzar a estudiar a estos virus en nuestro laboratorio, se adaptaron a crecer en la línea celular Caco-2 algunas cepas de AstH, presentes en las muestras de heces analizadas, pertenecientes a los genotipos más comunes (1, 2 y 3) y al genotipo 8. De estas, por ser la cepa que mejor se propagaba en cultivo celular y por pertenecer a un genotipo novedoso, se seleccionó, para caracterizar a la cepa de genotipo 8, la cual se denominó Yuc-8.

Se obtuvo la secuencia del genoma completo de la cepa Yuc-8, que representa la primera secuencia del genoma completo de un AstH de genotipo 8. La comparación de la secuencia completa de Yuc-8 con las otras cuatro secuencias existentes mostró que el genoma de Yuc-8 presenta la organización genómica característica de la familia *Astroviridae*.

La comparación de la región de las poliproteínas no estructurales de Yuc-8, con las secuencias correspondientes de los AstH de genotipo 1, 2 y 3, mostró un alto nivel de conservación entre estas cepas (más del 93% de identidad a nivel de aa). En el ORF 1a se encontró una pequeña región de alta diversidad, alrededor de los aminoácidos 767 y 790 (de acuerdo a la secuencia de Yuc-8), en donde las secuencias de Yuc-8, AstH-1 y AstH-2 carecen de 7 residuos con respecto a la del AstH-3, mientras que las secuencias de Yuc-8, AstH-2 y AstH-3 carecen de 15 aminoácidos con respecto a la del AstH-1 (Fig 1a del artículo II).

Se determinó que el ORF 2 de Yuc-8 codifica para una poliproteína de 782 aminoácidos, cuyo peso molecular es de aproximadamente 86.5 kDa. La comparación de la secuencia de aminoácidos predicha para la poliproteína del ORF 2 de los diferentes genotipos de astrovirus de humano, mostró que entre un mismo genotipo estas secuencias presentan una identidad mayor al 94%. La secuencia de la poliproteína de ORF 2 de la cepa Yuc-8 mostró una identidad del 94% con la correspondiente secuencia de una cepa de genotipo 8 (Z66541) aislada en el Reino Unido (Tabla uno del artículo I).

El alineamiento de las secuencias del ORF 2 de siete genotipos de AstH (Fig 1b del artículo II) mostró la existencia de dos dominios distintos: un dominio muy conservado (> 80%, de identidad) entre los diferentes genotipos, en la región amino terminal (aa 1 a 415), en el cual se observaron sólo dos regiones variables entre los residuos 292 a 319 (VR1) y 386 a 399 (VR2), y un dominio altamente variable (36 a 60% de identidad) entre los diferentes genotipos, en la región carboxilo terminal (aa 416 hasta el final de la poliproteína) (Fig 1b, artículo II).

El análisis filogenético del ORF 2 mostró una relación genética diferente entre los genotipos 1 a 8 al analizar estos dominios por separado. El análisis de la región amino terminal (dominio variable) mostró que los genotipos 2, 4 y 8 se encontraron cercanamente agrupados, mientras que los genotipos 1, 3, 5 y 6 estuvieron relacionados en menor medida con este grupo (Fig 2a del artículo II). Por otro lado, el dendrograma generado al comparar el extremo carboxilo terminal (dominio variable) del ORF 2 fue diferente. Los genotipos 4 y 8 se encontraron entre los menos relacionados (Fig. 2b del artículo II).

Artículo II

**"Análisis molecular del genoma
de un astrovirus de humano de serotipo 8"**

Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome

Martha Méndez-Toss, Pedro Romero-Guido, María Elena Munguía, Ernesto Méndez and Carlos F. Arias

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Human astroviruses are an important cause of gastroenteritis. As part of a molecular epidemiological study carried out in Mexico a human astrovirus isolate, Yuc-8, was adapted to grow in CaCo-2 cells, and its entire genome was sequenced. A 15 amino acid deletion in ORF1a, which has been associated with adaptation of astroviruses to grow in cells other than CaCo-2, was present in Yuc-8. Comparative sequence analysis of the Yuc-8 ORF2 with reported human astrovirus sequences revealed that this isolate belongs to genotype (serotype) 8. Two distinct domains in ORF2 were observed: an amino-terminal domain (residues 1 to 415), with identities higher than 81% among the strains analysed, and a carboxy-terminal domain (residues 416 to 782) with identities between 36 and 60%. Two non-superimposable phylogenetic trees were generated by separate analysis of these two domains, suggesting that a differential selective pressure is exerted along the structural polyprotein.

Human astroviruses are recognized as an important cause of infantile gastroenteritis around the world (Heirmann *et al.*, 1991). Astrovirus virions are formed by a non-enveloped protein capsid which surrounds a genome consisting of a positive-sense, single-stranded RNA molecule of 6.8 to 7.2 kb in length (Jiang *et al.*, 1993). The genomic RNA has three open reading frames (ORFs) designated 1a, 1b and 2. ORF1a and ORF1b code apparently for the nonstructural proteins of the virus; ORF1a contains viral serine protease and nuclear localization signal motifs; ORF1b contains motifs suggestive of an RNA-dependent RNA polymerase (Jiang *et al.*, 1993;

Willcocks *et al.*, 1994b). On the other hand, ORF2 encodes the structural viral polypeptides (Sanchez-Fauquier *et al.*, 1994). The virus genome, which functions as the mRNA for the nonstructural proteins, is translated into two polyproteins. One comprises exclusively ORF1a, while the other includes both ORF1a and ORF1b (Willcocks *et al.*, 1999), and is generated as result of a translational frameshift occurring between these two ORFs (Lewis & Matsui, 1997; Marczinke *et al.*, 1994). It is thought that both nonstructural polyproteins are auto-processed by a viral protease encoded in ORF1a (Willcocks *et al.*, 1999). On the other hand, the structural proteins coded by ORF2 are translated from a subgenomic RNA synthesized during replication of the virus. A 86 to 90 kDa polyprotein is produced that is finally processed into three to five mature polypeptides (Bass & Qiu, 2000; Sanchez-Fauquier *et al.*, 1994). The subgenomic RNA is 3'-collinear with the genomic RNA and both are polyadenylated (Monroe *et al.*, 1991, 1993).

Based on the virus reactivity with polyclonal antibodies, human astroviruses (HAstVs) have been classified into seven serotypes (HAstV-1 to -7) (Heirmann *et al.*, 1988). Phylogenetic grouping of HAstV based on nucleotide sequence analysis of a limited region of ORF2 (Belliot *et al.*, 1997; Noel *et al.*, 1995) showed a good correlation between genotype and serotype, and recently the existence of an eighth HAstV serotype has been suggested based on genotyping of an HAstV strain isolated in UK (Belliot *et al.*, 1997). Only three additional strains of this genotype 8 astrovirus, isolated in Australia, Uganda and Ghaza, have been reported, which is why it is considered to be a rare serotype (Mustafa *et al.*, 2000). In a recent multicentric study carried out in Mexico (unpublished), it was found that six HAstV serotypes (1 to 4, 6 and 8) co-circulated in a single period of 6 months, with serotype 1 being the most frequent, as found in other studies from different geographical regions (Gaggero *et al.*, 1998; Noel & Cubitt, 1994; Palombo & Bishop, 1996; Shastri *et al.*, 1998). In one of the locations (Mérida City, Yucatan) included in the Mexican study, three of the eight HAstV strains detected belonged to genotype 8 (assignment made based on the sequence of the 3'-end of ORF2), suggesting that these strains might be more epidemiologically relevant than previously recognized. In this work, we adapted one of the genotype 8

Author for correspondence: Ernesto Méndez
Fax +52 73 17 2388 e-mail ernesto@ibt.unam.mx

The GenBank accession number of the sequence reported in this paper is AF260508

(a)

Yuc-8	740	GDDVEFDYEVINFDQAKPPAPRTTKP	-----KPCPEPKIEAQPLDLSQKKEKQP	-----EHEQOVAKPTKPKQIEPQPSQTYGKA	818
Hastv-1	739I.....Q.....I.....EV.SSEYEQVVKSTKPOQL.....V.I.....SV.I.....S	832
Hastv-2	739ET.TV.S.....NV.S.....N	817
Hastv-3	739S.QOANTSQ.....R.LEAM.NM.N	824



(b)

Yuc-8	MASKDKQVTVYNNW	--GRSRKSRARSQSRGRSRKLTWVSHNKGRQNGRKNKYQSNQVRKIVNKQRKQVTPGKPAICQATATLGTGSGNTGAFERACILINPVLVDATG	118
Hastv-8N.....S.....N.....DK.....R.RA.....P.D.R.S.....N.....N.....GR.....V.....S.T	118
Hastv-1N.....N.....N.....K.NI.N.N.R.....K.....RSR.....D.....N.TR.....T	118
Hastv-2H.E.....SST.....R.....SN.GSP.....T.....H.....N.....N.....R.....V.....S.T.....GS.T	120
Hastv-4PS.....T.....G.....Q.....R.....R.....N.....N.....K.....K.....ES.T	117
Hastv-5R.P.....DK.....R.....H.....N.....N.....R.....V.....S.T.....GS.T	118
Hastv-6T.....G.....Q.....R.....R.....N.....N.....K.....K.....ES.T	118

Yuc-8	STQFQVQALGAQVMMKLYLNLVLTSMVCGASAVNGTVVRLISLNPSTPSTSWGLGARKHLDTVVGKNAVFKLKPESDLGCPDQWMLTNTNDNASDTLGPSTIHTLQVIMSSVQNT	238
Hastv-8S.....M.V.....T.DAI.....L.V.....N.....I.....D.....H	238
Hastv-1K.....K.....L.....L.....M.....R.....R.....R.....K.E	238
Hastv-2K.....K.....L.....L.....M.....R.....R.....R.....K.E	238
Hastv-3K.....K.....L.....L.....M.....R.....R.....R.....K.E	240
Hastv-4PT.....I.....S.....D.....V.....V.....I.....R.....Q	238
Hastv-5K.....K.....L.....L.....M.....R.....R.....R.....K.E	237
Hastv-6K.....K.....L.....L.....M.....R.....R.....R.....K.E	238

VR1

Yuc-8	QFTGGLFVLELSSNCFYAAANPNLNLVKSTDKSVNVPFEGSAGTFLIMNVPEHSHEARVAVEHSSLSLTSLSRAGGSSDVTWQVLIINVAASAEILVTPPPFNWLVKGGWVFKLIAG	358
Hastv-8W.T.....G.....D.....VLAR.TTP.T.A...ERTT	358
Hastv-1A.E.....A.E.....HE.....K.....Q.....M.EQ.....I.TF.....DAT	358
Hastv-2A.E.....A.E.....Q.....N.....K.....A.....AR.VP.T.A.T.QNTT	360
Hastv-3A.E.....A.E.....Q.....N.....K.....A.....AR.VP.T.A.T.QNTT	360
Hastv-4A.E.....A.E.....Q.....N.....E.V.S.AT.V.AV.AR.T.P.A...ERTT	358
Hastv-5A.E.....A.E.....Q.....N.....E.V.S.AT.V.AV.AR.T.P.A...ERTT	357
Hastv-6A.E.....A.E.....Q.....N.....E.V.S.AT.V.AV.AR.T.P.A...ERTT	358

Fig. i. For legend see facing page.

Table 1. Percentage amino acid identity between human astrovirus structural proteins of different serotypes

Numbers are percentage identity according to a ClustalW analysis. For simplicity, strains of the same serotype were named A, B, C and D. Accession numbers for sequences used to generate the data in this table are Z25771, S68561 and L23513 for strains of HAstV-1; L41395, L06802 and L13745 for strains of HAstV-2; AF141381 and AF117209 for strains of HAstV-3; Z33883 and U15136 for strains of HAstV-4 and HAstV-5, respectively; Z46658, AB031031, AB031030 and AB013618 for HAstV-6 and Z66541 for HAstV-8. The Yuc-8 sequence was determined in this work. Bold letters denote identities between proteins of viruses belonging to the same serotype.

Serotype / Strain	Amino acid percentage identity																		
	Yuc-8	8	1			2			3		4	5	6						
			A	B	C	A	B	C	A	B			A	B	C	D			
Yuc-8	100																		
HAstV-8	94	100																	
HAstV-1	A	70.9	68.5	100															
	B	70.9	68.5	100	100														
	C	70.8	68.5	97.6	97.3	100													
HAstV-2	A	69.6	67.8	68.3	68.3	69.3	100												
	B	69.5	67.6	68.1	68.1	69.1	99.9	100											
	C	69.6	67.8	68.3	68.3	69.3	100	99.9	100										
HAstV-3	A	71.6	69.3	75.3	75.3	75.7	71.8	71.7	71.8	100									
	B	72.1	69.4	75.2	75.2	75.6	71.7	71.6	71.7	98.2	100								
HAstV-4		69.2	67.3	61.2	61.2	60.7	64.1	64	64.1	59.6	60	100							
HAstV-5		73.3	70.6	69.3	69.3	69.5	65	64.9	65	70.4	70.4	61.7	100						
HAstV-6	A	72	70	70.2	70.2	70.3	65.8	65.7	65.8	70.6	71.9	62.6	74	100					
	B	71.7	70.3	71.4	71.4	71.4	66.7	66.6	66.7	70.9	72.3	62.6	75.2	95.5	100				
	C	71.6	70.3	71.3	71.3	71.3	66.6	66.5	66.6	70.8	72.2	62.3	75.1	95.4	99.6	100			
	D	71.7	70.3	71.4	71.4	71.4	66.7	66.6	66.6	70.9	72.3	62.4	75.2	95.5	99.7	99.9	100		

HAstV strains (named Yuc-8) to grow in CaCo-2 cells, and determined its complete genomic nucleotide sequence, the first for an HAstV-8 strain.

For isolation of the virus, a stool sample was diluted 1:2 in PBS, extracted with Freon, and filtered through a 0.22 µm membrane. This material was treated with trypsin (10 µg/ml) for 1 h at 37 °C, and inoculated into a CaCo-2 cell monolayer. After 60 min, the inoculum was removed, fresh Eagle's minimum essential medium was added, and the cells were incubated at 37 °C for 3 days. The virus was harvested by three freeze-thaw cycles, and was passaged again in the same cells, as described above. After seven passages, the presence of the virus was confirmed by immune electron microscopy with a hyperimmune serum to HAstV-1 (Herrmann *et al.*, 1990); by ELISA (IDEIA Astrovirus, Dako); by immunocytochemistry with monoclonal antibody 8G4, which recognizes HAstV-1 to -7 (Bass & Upadhyayula, 1997); and by RT-PCR with oligonucleotides Mon244 and Mon245 (Noel *et al.*, 1995). Total RNA from Yuc-8-infected cells was obtained with Trizol (Gibco-BRL), and used as template to amplify the astrovirus genome by RT-PCR. Reverse transcriptase SuperScript II (Gibco-BRL) and Vent DNA polymerase (New England

Biolabs) were used for the RT-PCR reactions. Oligonucleotides synthesized were initially based on the previously reported sequence for HAstV-1 (accession no. Z25771), and subsequently based on the sequence obtained from Yuc-8. The amplified DNA fragments were sequenced with an ABI Prism DNA automatic sequencer, model 377-18 (Perkin Elmer). The sequence of the 5' non-translated region (NTR) was determined from a PCR fragment obtained with an upstream 20-mer oligonucleotide corresponding to the 20 5'-end nucleotides which are conserved among astrovirus serotypes 1, 2 and 3. Nucleotide sequence of the 3' NTR was determined from a DNA fragment obtained by RT-PCR with oligo(dT) and oligonucleotide Beg (Saito *et al.*, 1995) as primers. At least three PCR fragments of a given region, amplified independently, were used for determining the consensus sequence.

The full-length genomic RNA of HAstV Yuc-8 consists of 6759 bases, followed by a poly(A) tract. It has a 5' NTR and a 3' NTR of 83 and 85 nucleotides, respectively, and it is organized in three sequential open reading frames corresponding to ORFs 1a, 1b and 2 (Jiang *et al.*, 1993; Willcocks *et al.*, 1994b). The encoded polyproteins have the characteristic motifs described above.

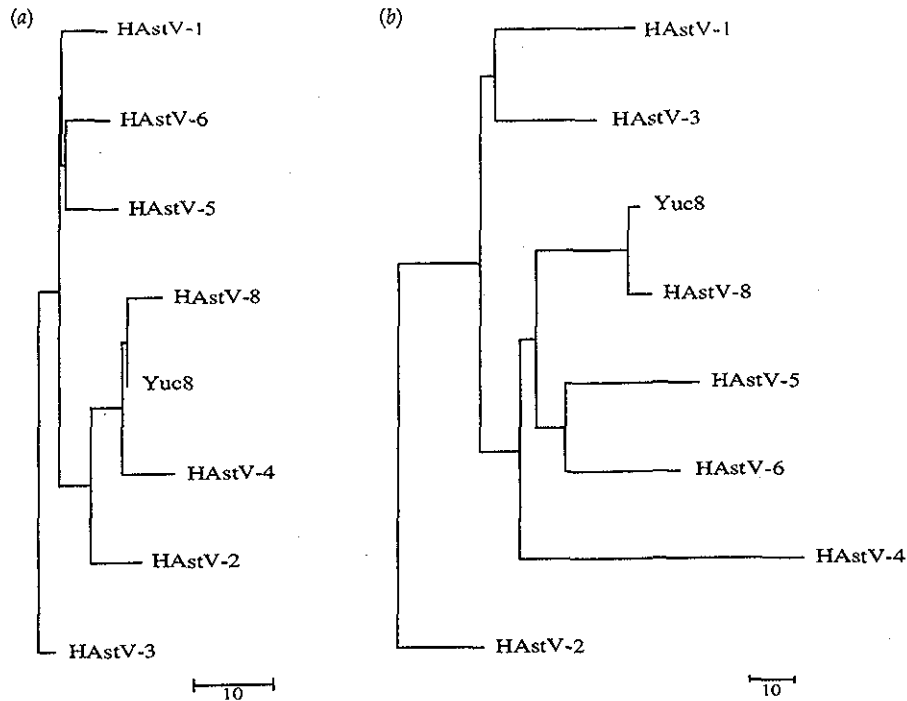


Fig. 2 Dendrograms showing the genetic relatedness of the ORF2 amino acid sequence from astrovirus serotypes 1 to 6 and 8 (a) Conserved domain of ORF2 comprising amino acids 1 to 415 (b) Hypervariable domain of ORF2 comprising amino acids 416 to 782 (Yuc-8 numbering). The scale bars in (a) and (b) represent 10 amino acid substitutions per each 100 residues. The dendrograms were generated with the GrowTree program of the Genetics Computer Group sequence analysis package (<http://gcg.ceingeb.unam.mx/gcg-bin/seqweb.cgi>), using the Kimura distance correction method and the neighbour-joining construction method. Accession numbers of the compared sequences are: L23513 (HAstV-1), A45695 (HAstV-2), AF141381 (HAstV-3), Z33883 (HAstV-4), U15136 (HAstV-5), Z46658 (HAstV-6) and Z66541 (HAstV-8). HAstV-7 was not included in this analysis since its complete sequence has not been reported.

Comparison of the non-structural polyprotein region of astrovirus Yuc-8 with the corresponding sequence of viruses belonging to serotypes 1, 2 and 3 showed a high level of conservation among these strains (higher than 93% identity at amino acid level). A small region of high variability was found around amino acids 767 and 790 in ORF1a (numbering according to the Yuc-8 sequence), where 7 and 15 residues were missing in Yuc-8 and HAstV-2, as compared to HAstV-3 and HAstV-1, respectively (Fig. 1a, regions in/del I and in/del II, respectively). The absence of the 15 amino acid residues at position 790 (region in/del II) has been associated with the adaptation of astroviruses to HEK and LI CMK2 cells, since viruses grown in these cells, but not in CaCo-2 cells, lack that region (Willcocks *et al.*, 1994a). Yuc-8 is also missing those 15 residues despite its having been adapted to grow in CaCo-2 cells, which suggests that the in/del region II, if it plays a role, is not the only factor involved in adaptation of human astroviruses to a specific cell line. A more detailed analysis of field and culture-adapted astrovirus strains is needed to resolve this issue.

ORF2 of Yuc-8 encodes a polyprotein of 782 amino acids, with an estimated molecular mass of 86.5 kDa. Comparison of the predicted full-length ORF2 amino acid sequence from viruses of different serotypes and geographical regions

indicated a good correlation between genotype and serotype. Within one given serotype where more than one ORF2 complete sequence has been reported, the strains were more than 94% identical (Table 1). Yuc-8 was thus confirmed as a genotype (serotype) 8 virus, since it was more closely related to an isolate of HAstV-8 from the United Kingdom (94% identical) than to HAstV serotypes 1 to 6 (between 69 and 73% identity) (Table 1, Fig. 2). Also, comparison of the Yuc-8 sequence with the partial sequence (amino acid residues 82 to 200) reported for HAstV-7 revealed an identity of 90% between these two strains, the lowest value for any pairwise comparison when that specific region was considered (not shown).

Knowledge about processing of the ORF2 structural polyprotein is limited. It has been reported that this polyprotein is first cleaved intracellularly at the conserved lysine residue at position 71, to yield a protein of 79 kDa; in the absence of trypsin in the culture medium this seems to be the end product, which can be incorporated into the mature virions (Bass & Qiu, 2000). On the other hand, products of 34, 29 and 26 kDa (VP34, VP29 and VP26) are consistently found in trypsin-treated purified viruses (Bass & Qiu, 2000; Sanchez-Fauquier *et al.*, 1994). VP29 and VP26 were shown by N-terminal sequence analysis to be generated by cleavage of the

polyprotein of HAstV-2 at arginine residues 361 and 395, respectively (numbers based on the Yuc-8 sequence); thus, these two proteins probably share their carboxy terminus (Sanchez-Fauquier *et al.*, 1994). Arg-361 (but not Arg-395) is totally conserved among all astroviruses sequenced to date, as are other trypsin-susceptible cleavage sites present at amino acid residues 347, 354, 359, 365 and 380, which could potentially serve as processing sites (Fig. 1*b*). This trypsin cleavage region is surrounded by highly conserved regions, which could play a structural role to make the cleavage sites accessible for processing. In rotaviruses, the trypsin cleavage region on the VP4 protein, which is responsible for the enhancement of virus infectivity, is also surrounded by highly conserved regions (Lopez *et al.*, 1986).

Alignment of the ORF2 sequences of seven HAstV serotypes (Fig. 1*b*) showed the existence of two distinct domains, which were first observed by Willcocks *et al.* (1995) who analysed three serotypes only. One conserved amino-terminal domain spans amino acid residues 1 to 415, with identities higher than 81% among the different serotypes. Two short variable regions between residues 292 to 319 (VR1) and 386 to 399 (VR2), not reported previously, were observed in this domain (Fig. 1*b*). The highly variable second domain (identities of 36 to 60% among serotypes) starts at amino acid 416 and extends to the end of the protein, but in contrast to the report of Willcocks *et al.* (1995), the conservation at the end of the ORF2 was not observed among the serotypes (Fig. 1*b*).

Phylogenetic analysis of ORF2 showed a completely different genetic relatedness among serotypes 1 to 8 when either of the two domains described above was analysed. The phylogenetic tree generated by comparison of the conserved domain (Fig. 2*a*) was very similar to the trees reported previously by Belliot *et al.* (1997) and Noel *et al.* (1995), who analysed a region of 137 amino acids (residues 73 to 210 of Yuc-8). Serotypes 2, 4 and 8 were found to be closely grouped, while serotypes 1, 3, 5 and 6 were more distantly related to this group (Fig. 2*a*). On the other hand, the dendrogram generated by comparison of the variable domain of ORF2 (residues 416 to 782) was quite different. Serotypes 4 and 8 were among the least related (Fig. 2*b*), which resulted in a phylogenetic tree similar to that reported in another analysis including part of the 3'-end of the astrovirus genome (Monceyron *et al.*, 1997). It is likely that the variable carboxy-terminal domain of the ORF2 polyprotein is subjected to immunological pressure, which probably contributes to the variability observed. In fact, neutralizing antibodies which recognize VP29 and VP26 have been identified (Bass & Upadhyayula, 1997). Furthermore, it is of interest that the genetic relatedness observed among the various HAstV serotypes, when the variable region was analysed, differs so much from the relationships found in the conserved amino-terminal half of the protein. The selective pressure that created these marked deviations from the mutation rate of astroviruses could operate differentially along the ORF2 polyprotein, most likely as the result of a sum of

factors including, among others, the intrinsic structural constraints of the virus particle and the host immune response of the particular populations infected. On the other hand, the non-superimposable dendrograms shown in Fig. 2 could also be the result of intraserotypic astrovirus recombination, suggested as previously (Belliot *et al.*, 1997; Jonassen *et al.*, 1998). Whatever the reason for the observed variations, it is evident that the genomic region chosen to compare different HAstV strains should take into account the differential variability observed in the astrovirus genome, particularly that of ORF2.

We acknowledge the technical assistance of Paul Gaytan, Eugenio López and René Hernández for the synthesis of oligonucleotides and DNA sequencing. We thank Dorsey Bass (Stanford University) for providing monoclonal antibody 8G4 used in this work. This work was partially supported by grants 75197-527106 from the Howard Hughes Medical Institute, MENSE31739 from the National Council for Science and Technology-Mexico and IN200999 from DGAPA-UNAM.

References

- Bass, D. & Qiu, S. (2000). Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *Journal of Virology* **74**, 1810-1814.
- Bass, D. & Upadhyayula, U. (1997). Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *Journal of Virology* **71**, 8666-8671.
- Belliot, G., Laveran, H. & Monroe, S. (1997). Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Archives of Virology* **142**, 1323-1334.
- Gaggero, A., O'Ryan, M., Noel, J., Glass, R., Monroe, S., Mamani, N., Prado, V. & Avendano, L. (1998). Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3691-3693.
- Herrmann, J., Hudson, R., Perron-Henry, D., Kurtz, J. & Blacklow, N. (1988). Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *Journal of Infectious Diseases* **158**, 182-185.
- Herrmann, J., Cubitt, W., Hudson, R., Perron-Henry, D., Oshiro, L. & Blacklow, N. (1990). Immunological characterization of the Marin County strain of astrovirus. *Archives of Virology* **110**, 213-220.
- Herrmann, J., Taylor, D., Echeverria, P. & Blacklow, N. (1991). Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *New England Journal of Medicine* **324**, 1757-1760.
- Jiang, B., Monroe, S., Koonin, E., Stine, S. & Glass, R. (1993). RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 10539-10543.
- Jonassen, C., Jonassen, T. & Grinde, B. (1998). A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *Journal of General Virology* **79**, 715-718.
- Lewis, T. & Matsui, S. (1997). Studies of the astrovirus signal that induces (-1) ribosomal frameshifting. *Advances in Experimental Medicine Biology* **412**, 323-330.
- Lopez, S., Arias, C., Mendez, E. & Espejo, R. (1986). Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology* **154**, 224-7.
- Marczinke, B., Bloys, A., Brown, T., Willcocks, M., Carter, M. & Brierley, I. (1994). The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase

- coding region is expressed by ribosomal frameshifting *Journal of Virology* **68**, 5588–5595
- Monceyron, C., Grinde, B. & Jonassen, T. (1997). Molecular characterization of the 3'-end of the astrovirus genome *Archives of Virology* **142**, 699–706
- Monroe, S., Stine, S., Gorelkin, L., Herrmann, J., Blacklow, N. & Glass, R. (1991). Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells *Journal of Virology* **65**, 641–648
- Monroe, S., Jiang, B., Stine, S., Koopmans, M. & Glass, R. (1993). Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses *Journal of Virology* **67**, 3611–3614
- Mustafa, H., Palombo, E. & Bishop, R. (2000). Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998 *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1058–1062
- Noel, J. & Cubitt, D. (1994). Identification of astrovirus serotypes from children treated at the Hospitals for Sick Children, London 1981–93. *Epidemiology and Infection* **113**, 153–159
- Noel, J., Lee, T., Kurtz, J., Glass, R. & Monroe, S. (1995). Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 797–801
- Palombo, E. & Bishop, R. (1996). Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1750–1753
- Saito, K., Ushijima, H., Nishio, O., Oseto, M., Motohiro, H., Ueda, Y., Takagi, M., Nakaya, S., Ando, T., Glass, R. and others (1995). Detection of astroviruses from stool samples in Japan using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification *Microbiology and Immunology* **39**, 825–828
- Sanchez-Fauquier, A., Carrascosa, A., Carrascosa, J., Otero, A., Glass, R., Lopez, J., Martin, C. S. & Melerio, J. (1994). Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization *Virology* **201**, 312–320
- Shastri, S., Doane, A., Gonzales, J., Upadhyayula, U. & Bass, D. (1998). Prevalence of astroviruses in a children's hospital *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2571–2574
- Willcocks, M., Ashton, N., Kurtz, J., Cubitt, W. & Carter, M. (1994a). Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion *Journal of Virology* **68**, 6057–6058
- Willcocks, M., Brown, T., Madeley, C. & Carter, M. (1994b). The complete sequence of a human astrovirus. *Journal of General Virology* **75**, 1785–1788
- Willcocks, M., Kurtz, J., Lee, T. W. & Carter, M. (1995). Prevalence of human astrovirus serotype 4: capsid protein sequence and comparison with other strains *Epidemiology and Infection* **114**, 385–394
- Willcocks, M., Boxall, A. & Carter, M. (1999). Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins *Journal of General Virology* **80**, 2607–2611.

Received 9 May 2000; Accepted 8 August 2000

RESULTADOS ADICIONALES

Caracterización de la vía de procesamiento de la poliproteína del ORF 2 de la cepa de AstH "Yuc-8"

Además de los resultados presentados anteriormente, durante mi trabajo de doctorado participé en otro proyecto relacionado con el estudio de la vía del procesamiento de la poliproteína precursora de las proteínas estructurales (poliproteína del ORF2) del AstH aislado en nuestro laboratorio (Yuc-8).

Para la caracterización de la vía del procesamiento de la poliproteína codificada en el ORF 2 de la cepa de AstH Yuc-8 se obtuvieron como productos de fusión al extremo carboxilo terminal de la glutatión-S-transferasa, en *Escherichia coli*, tres regiones de este ORF correspondientes a los aminoácidos 3 a 208 (polipéptido E1), 209 a 341 (polipéptido E2), y 386 a 594 (polipéptido E3). Las proteínas fusionadas se utilizaron para generar sueros hiperinmunes en conejo específicos para cada una de las regiones mencionadas (Fig. 11). Además, se generaron anticuerpos en ratón, dirigidos contra la región correspondiente a los aminoácidos 4 a 20 del ORF 2 de AstH-1, utilizando un péptido sintético (KSN) acoplado a una proteína acarreadora (Fig. 11).

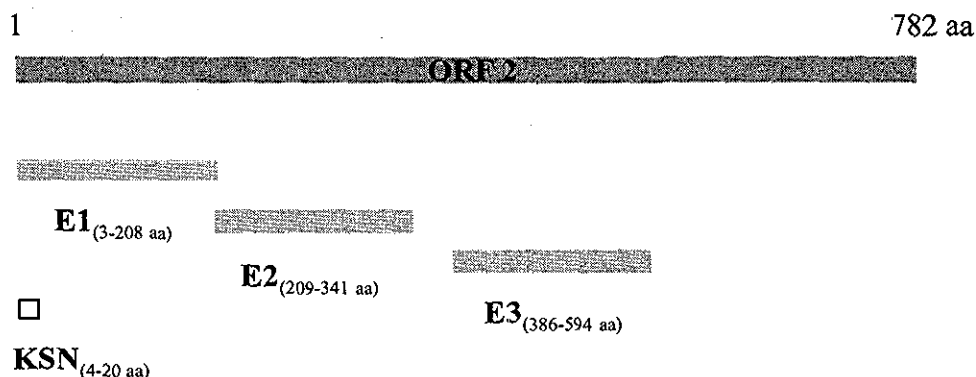


Fig. 11. Diagrama de las regiones del ORF 2 utilizadas para la obtención de las proteínas recombinantes de AstH contra las cuales se obtuvieron los anticuerpos anti E1, anti E2 y anti E3 y, del péptido KSN utilizado para la obtención del anticuerpo anti KSN. Los subíndices entre paréntesis indican la posición de los residuos de aminoácidos incluidos en cada una de las proteínas.

Se infectaron células Caco-2 con Yuc-8 y se recolectaron a diferentes tiempos postinfección. Las proteínas totales de las células infectadas se analizaron por inmunotransferencia utilizando los sueros anti-E1, anti-E2, anti-E3 y anti-KSN. Los anticuerpos anti-E1, anti-E2 y anti-E3 reconocieron en las células infectadas proteínas de 90 y 70 kDa (VP90 y VP70, respectivamente) las cuales no se encontraron presentes en células con infección simulada (Fig. 1 del manuscrito III). Parece ser que la proteína VP90 representa el producto primario de la traducción del ORF 2 (cuyo peso molecular calculado en base a la composición de su secuencia de aminoácidos es de 87 kDa) y que VP70 se deriva de VP90. El procesamiento proteolítico de VP90 para dar origen a VP70 parece encontrarse asociado a la célula ya que las muestras utilizadas en este ensayo se recolectaron después de haber eliminado el medio de cultivo. El suero anti-KSN detectó también a VP90 y VP70

(no se muestra). Dado que VP70 es reconocida por el suero anti-KSN dirigido contra los residuos 4 a 20, localizados en el extremo amino terminal de la poliproteína del ORF 2, el procesamiento observado de VP90 no es equivalente al reportado por Bass (3) quien reportó que el producto primario de la traducción del ORF2 se procesa en su extremo amino terminal.

Se sabe que la infectividad de los AstH depende del tratamiento con tripsina (29); sin embargo, el conocimiento acerca del procesamiento de la poliproteína estructural del ORF2 con tripsina es limitado. Se ha reportado la presencia en las partículas virales de proteínas que van desde 20 hasta 90 kDa (3, 6, 46, 61). Bass y colaboradores reportaron que el producto inicial del ORF 2 (una proteína de 90 kDa) se corta intracelularmente en el residuo Arg₇₀ para dar origen a una proteína de 79 kDa (3). En ausencia de tripsina en el medio de cultivo se encontró esta proteína en las partículas de astrovirus; sin embargo, en presencia de tripsina, las proteínas detectadas fueron de 26, 29 y 34 kDa (3). Se demostró que los productos de 29 y 26 kDa (VP29 y VP26), que han sido identificados por diferentes autores de manera consistente en los virus tratados con tripsina (3, 6, 46, 61), se generan por el corte de la poliproteína primaria del ORF 2 de AstH-2 en los residuos Arg₃₆₁ y Arg₃₉₅, respectivamente, y que estas proteínas comparten su extremo carboxilo terminal (61).

Con la finalidad de conocer si las proteínas VP90 y VP70, identificadas durante la infección de Yuc-8 en células Caco-2, se encuentran presentes en el virus maduro y cuál es su procesamiento posterior al ser tratadas con tripsina, se purificaron partículas virales de Yuc-8 obtenidas en ausencia de tripsina y se encontró que contenían únicamente VP70 (Fig. 2 del manuscrito III). Al tratar a los

virus con tripsina (10 $\mu\text{g/ml}$) se observaron varios polipéptidos con pesos moleculares desde 25 hasta 41 kDa (Fig. 2A del manuscrito III). Con el tratamiento de los virus con la máxima concentración de tripsina utilizada (400 $\mu\text{g/ml}$) se acumularon tres productos predominantes de 34, 27 y 25 kDa. Al determinar el efecto del tratamiento con tripsina sobre la infectividad del virus se encontró que los virus que contenían únicamente VP70 presentaban una infectividad basal, la cual varió alrededor de 10^4 unidades de focos fluorescentes/ml en diferentes experimentos. El tratamiento de los virus con diferentes concentraciones de tripsina mostró que la infectividad se incrementa en más de 100 veces al utilizar concentraciones por encima de los 100 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2B del manuscrito 3). Es decir, la mayor infectividad del virus alcanzada correlaciona con la presencia de las proteínas VP34, VP27 y VP25 que, al parecer, son los productos finales del procesamiento de la poliproteína precursora VP90.

Para determinar la vía del procesamiento de VP70, las partículas virales purificadas se trataron con concentraciones de tripsina que se iban incrementando en 10 veces (comenzando a 0.1 $\mu\text{g/ml}$) y los intermediarios proteicos del procesamiento se identificaron por inmunotransferencia utilizando los sueros obtenidos contra las proteínas recombinantes E1, E2 y E3. El tratamiento de las partículas de Yuc-8 purificadas con diferentes cantidades de tripsina reveló que VP70 se procesa de manera ordenada (Fig. 3 del manuscrito III). Los primeros dos productos del corte detectados (con 1 $\mu\text{g/ml}$) fueron VP41 y VP28 los cuales representan los extremos amino y carboxilo terminales, respectivamente, de VP70. La proteína VP41 fue reconocida por los anticuerpos KSN (Fig. 3A del manuscrito III), anti E1 (no se muestra), y anti E2 (Fig. 3B del manuscrito III) mientras que la proteína VP28 fue

detectada por el anticuerpo anti E3 (Fig. 3C del manuscrito III). Posteriormente VP41 se procesó para dar origen a VP38.5 y VP35 (Fig. 3A y 3B, línea 10µg/ml, del manuscrito III) Con 100 µg/ml de tripsina, VP41 y VP38.5 desaparecieron para dar origen a los polipéptidos VP35 y VP34 (Fig. 3A y B del manuscrito III), mientras que a la concentración más alta de tripsina utilizada (400 µg/ml [Fig. 2A del manuscrito III]), VP34 fue el único producto derivado de VP41 que se detectó. La reactividad de todos estos polipéptidos con el antisero KSN dirigido contra los residuos 4 a 20 del ORF 2, indica que estas proteínas se producen por el procesamiento del extremo carboxilo terminal de VP41 (Fig. 3A del manuscrito III).

El corte posterior de VP28 con tripsina resultó en la generación de los polipéptidos VP27 y VP25 (Fig. 3C, 10 y 100 µg de tripsina/ml). Estas proteínas fueron reconocidas por el suero anti-E3 y no por los anticuerpos contra E2 o KSN (Fig. 3C).

Para determinar los sitios exactos del corte con tripsina en VP70, las proteínas VP70, VP34, VP28, VP27, y VP25 se trataron para secuenciar sus extremos amino terminales. Se encontró que VP70 y VP34 tienen el extremo amino terminal bloqueado. Las proteínas VP28 y VP27 presentan la misma secuencia amino terminal lo cual indica que el corte que las genera ocurre en el residuo Arg₃₉₃ y que la diferencia entre ellas se encuentra en su extremo carboxilo terminal. La secuencia amino terminal de VP25 reveló que esta proteína se deriva de VP28 como resultado de un corte en el residuo Arg₄₂₃. A pesar de que VP25 y la tripsina comigran, la secuenciación de la banda de 25 kDa reveló solamente a la proteína de astrovirus debido, probablemente a que el extremo amino terminal de la tripsina se

encuentra bloqueado. La figura 4 del manuscrito III muestra la secuencia aminoterminal de VP28, VP27 y VP25 de Yuc-8 en el contexto de las secuencias de los ocho serotipos de astrovirus de humano alineadas.

Finalmente, en la Figura 5, se muestra el esquema de la vía del procesamiento propuesta para la poliproteína VP90.

Artículo III

**"Procesamiento proteolítico de la poliproteína del
ORF2 de un astrovirus de humano de serotipo 8"**

Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein

Ernesto Méndez,* Teresa Fernández-Luna, Susana López,
Martha Méndez-Toss, and Carlos F. Arias

*Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Colonia Miraval,
Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico*

Received 14 January 2002/Accepted 7 May 2002

Astroviruses require the proteolytic cleavage of the capsid protein to infect the host cell. Here we describe the processing pathway of the primary translation product of the structural polyprotein (ORF2) encoded by a human astrovirus serotype 8 (strain Yuc8). The primary translation product of ORF2 is of approximately 90 kDa, which is subsequently cleaved to yield a 70-kDa protein (VP70) which is assembled into the viral particles. Limited trypsin treatment of purified particles containing VP70 results in the generation of polypeptides VP41 and VP28, which are then further processed to proteins of 38.5, 35, and 34 kDa and 27, 26, and 25 kDa, respectively. VP34, VP27 and VP25 are the predominant proteins in fully cleaved virions, which correlate with the highest level of infectivity. Processing of the VP41 protein to yield VP38.5 to VP34 polypeptides occurred at its carboxy terminus, as suggested by immunoblot analysis using hyperimmune sera to different regions of the ORF2, while processing of VP28 to generate VP27 and VP25 occurred at its carboxy and amino terminus, respectively, as determined by immunoblot, as well as by N-terminal sequencing of those products. Based on these data, the processing pathway for the 90-kDa primary product of astrovirus Yuc8 ORF2 is presented.

Human astroviruses (HAstV) have been found to be a frequent cause of gastroenteritis among young children worldwide (5, 7, 8, 15). The virions are formed by a nonenveloped protein capsid and a positive-stranded RNA genome of approximately 7 kb (9, 22). The RNA genome has three open reading frames (ORFs) (ORF1a, -1b, and -2), each encoding at least one polyprotein. The ORF1a contains viral serine protease and nuclear localization signal motifs, whereas the ORF1b has an RNA-dependent RNA polymerase motif (9, 22). The products of ORF1a and ORF1b are synthesized from the genomic RNA as two polyproteins, with the latter being produced as a polyprotein 1a-1b (approximately 160 kDa) through a frameshift translational mechanism (12-14). It is believed that the products of these ORFs, processed to smaller polypeptides by the viral protease, are involved in the viral RNA replication. ORF2, of approximately 780 amino acid residues, depending on the strain (21), codes for the structural virus polypeptides (18). The structural polyprotein is translated from a polyadenylated subgenomic RNA produced at high levels during infection, which is 3'-colinear with the genomic RNA (17). Based on the homology among strains belonging to different serotypes, at least two domains in the product of this ORF have been predicted (16, 21). The first domain includes amino acid residues 1 to 415, and it is highly conserved among all the human serotypes and some viruses from animal origin; the second domain (amino acid 416 to the end) is highly divergent among human serotypes (10, 16, 21, 23). Neutralizing

epitopes have been mapped to the second domain (3, 20); therefore, it is likely that this hypervariable region is exposed on the viral particle. It is known that astrovirus infectivity is dependent on trypsin treatment (11); however, knowledge about the processing of the ORF2 structural polyprotein with trypsin is limited. Proteins of 20 to 90 kDa (2, 4, 18, 20) have been reported to be present in viral particles. Bass et al. reported that the initial product of ORF2 (a 90-kDa protein) is cleaved intracellularly at Arg₇₀ to yield a protein of 79 kDa (2). In the absence of trypsin in the culture medium this protein was found in the astrovirus particles; however, in the presence of trypsin, the proteins found in the particles were 26, 29, and 34 kDa (2). The products of 29 and 26 kDa (VP29 and VP26), which have been consistently found in trypsin-treated viruses by several authors (2, 4, 18, 20), were shown to be generated by cleavage of the primary ORF2 HAstV-2 polyprotein at Arg₃₆₁ and Arg₃₉₅, respectively, sharing their carboxy terminus (20). Given this observation, the products of 34 and 29 kDa would not represent the whole protein of 79 kDa found in untreated particles, suggesting that additional polypeptides, which have not been identified, should result after trypsin treatment of the particles. In order to contribute to a better understanding of the processing of the ORF2 polyprotein of HAstV we have characterized the proteolytic pathway of the ORF2 polyprotein of a serotype 8 human astrovirus.

MATERIALS AND METHODS

Virus and cells. The colon carcinoma cell line Caco-2, obtained from the American Type Culture Collection, was used throughout this work. The cells were cultured in a CO₂ atmosphere at 37°C with minimum essential medium (Eagle's salts) (MEM) supplemented with glutamine, penicillin, streptomycin, and 15% fetal bovine serum. The astrovirus strain Yuc8 was isolated from a natural infection and adapted to grow in Caco-2 cells (16). During this work virus passages 7 to 11 were used. To propagate the virus, cells were washed twice

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Phone: (52)(7)329-1612. Fax: (52)(7)317-2388. E-mail: ernesto@ibt.unam.mx

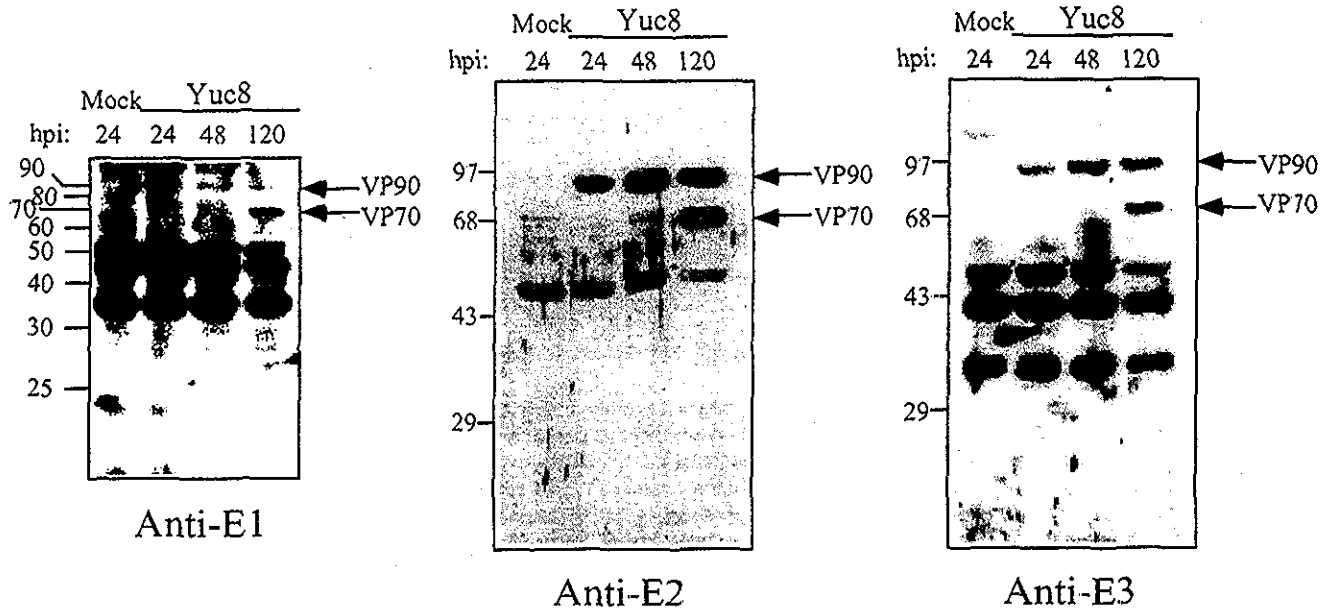


FIG. 1 Sera to recombinant Yuc8 proteins recognize 90- and 70-kDa proteins in Yuc8-infected cells. A monolayer of Yuc8-infected Caco-2 cells was washed with PBS twice at 24, 48, and 120 h postinfection (hpi) and lysed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.5% SDS, plus phenylmethylsulfonyl fluoride and leupeptin as protease inhibitors. A lysate of mock-infected cells was included as a control. Cell lysates were homogenized and centrifuged at 14,000 × g to discard the pellet. Supernatant was collected and loaded in an SDS-15% polyacrylamide gel for immunoblot analysis with the indicated sera. The migration of the molecular mass markers (in kilodaltons) (indicated by a protein ladder [GIBCO] for anti-E1 and prestained protein standards [GIBCO] for anti-E2 and anti-E3) and of the viral proteins is indicated

with MEM without fetal bovine serum and inoculated with Yuc8 previously treated with 10 µg of trypsin/ml for 30 min at 37°C (Trypsin 1:250; GIBCO), resulting in multiplicities of infection lower than 0.01. Adsorption of the virus to the cells was for 1 h at 37°C, the inoculum was removed, and MEM without serum containing 3.3 µg of trypsin/ml was added. Under our conditions, normal Caco-2 cells detached at higher trypsin concentrations for long incubation periods. The infected cells were incubated at 37°C and harvested 3 days postinfection, or when cytopathic effect was evident.

Purification of Yuc8. Yuc8-infected Caco-2 cells were frozen and thawed three times, and the cell lysate was centrifuged at 25,000 rpm for 4 h (Beckman SW28 rotor). All the steps during viral purification were carried out at 4°C. The pellet was resuspended in TNE buffer (50 mM Tris [pH 7.4], 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA) and extracted once with Genetron (trichlorotrifluoromethane), and the supernatant was collected after centrifugation at 6,000 rpm for 30 min (16F6-38 rotor; Brinkmann); this was further ultracentrifuged at 40,000 rpm for 2 h (SW50.1 rotor; Beckman), and the resulting pellet was resuspended in TNE buffer and loaded in a cesium chloride solution (initial density 1.36). A density gradient was formed during ultracentrifugation for 16 to 18 h at 35,000 rpm (SW50.1 rotor; Beckman), and the opalescent band corresponding to viral particles was collected with a syringe and diluted in TNE buffer. This suspension was again ultracentrifuged at 40,000 rpm for 2.5 h (SW50.1 rotor; Beckman), and finally the pellet was resuspended in TNE buffer and stored at 4°C. Infectivity assays were performed to assure the identity of the purified particles. This preparation was used for further studies.

Astrovirus recombinant proteins and sera. Clones expressing the recombinant astrovirus proteins were constructed in the pGEX4T vectors (Pharmacia), using standard methods (19). Proteins E1 (including amino acid residues 3 to 208 of ORF2), E2 (residues 209 to 341), and E3 (residues 386 to 594) were fused to the carboxy-terminus of glutathione-S-transferase (GST) and expressed in *Escherichia coli*. Since recombinant proteins were insoluble, they were purified by electroelution from sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and quantified. Approximately 100 µg of each protein was mixed with Freund's complete adjuvant and subcutaneously inoculated into New Zealand rabbits. Three further inoculations of the protein into Freund's incomplete adjuvant were done at 15-day intervals. A peptide with the sequence KSNKQVTVEVSNRNC (named KSN), corresponding to residues 4 to 20 of HAstV-1 ORF2 (synthesized by Research Genetics Co.) was coupled with keyhole limpet hemocyanin (KLH) (Inject malcimid activated-KLH; Pierce) following the manufacturer's recom-

mendations. The KLH-conjugated peptide was inoculated into BALB/c mice, following the same protocol used for the recombinant proteins. Sera were collected 2 weeks after the fourth inoculation.

Viral infectivity. Caco-2 cells were grown on glass slides and infected as mentioned above. Sixteen to eighteen hours postinfection, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 2% *p*-formaldehyde for 15 min at room temperature. Cells were permeabilized with 0.05% Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature and blocked for 1 h with 1% bovine serum albumin (fraction V; GIBCO). The serum raised against the E2 astrovirus protein described above was used as the primary antibody, and a secondary antibody conjugated to Alexa (goat anti-rabbit immunoglobulin G-Alexa488; Molecular Probes) was used for detection. Cells were washed four times with PBS-NH₄Cl (50 mM) after every incubation step. The infectivity of the purified Yuc8 virus was determined by counting the infected cells and reported as fluorescent focus units per milliliter.

Trypsin digestion of purified virus and protein analysis. Purified virus was treated with different trypsin concentrations (0 to 400 µg/ml) [L-(tosylamido-2-phenyl)ethyl chloromethyl ketone (TPCK) treated, >180 U/mg; Worthington] for 1 h at room temperature. Each treated sample was split into fractions and used as follows: one fraction was employed to determine the viral infectivity immediately after trypsin treatment, and the other fractions were run in SDS-polyacrylamide gels. One gel was stained with silver, and the others were used for immunoblot analysis using the sera raised against the recombinant astrovirus proteins (each diluted 1:4,000 in PBS); a horseradish peroxidase-linked antibody to rabbit or mouse immunoglobulin G was then added for 1 h, and the antibody-antigen complex was detected with the Western blot chemiluminescence reagent (Renaissance; NEN Life Science Products). As a control, one well in each of the polyacrylamide gels was loaded with no virus but with the highest amount of trypsin used for virus digestion.

N-terminal protein sequencing. Purified virus particles were treated with 10 and 200 µg/ml of trypsin, as described above. Samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF-Plus 0.1 µm; Osmonics) for 1 h at 50 V in CAPS [3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonic acid] buffer (10 mM CAPS [pH 11], 10% methanol). All reagents used were freshly prepared and filtered through a 0.22-µm-pore-size membrane. Gels were allowed to polymerize overnight at room temperature. Transferred proteins were visualized by staining with Ponceau-S, and the bands were excised, washed thoroughly with MilliQ water, and dried in

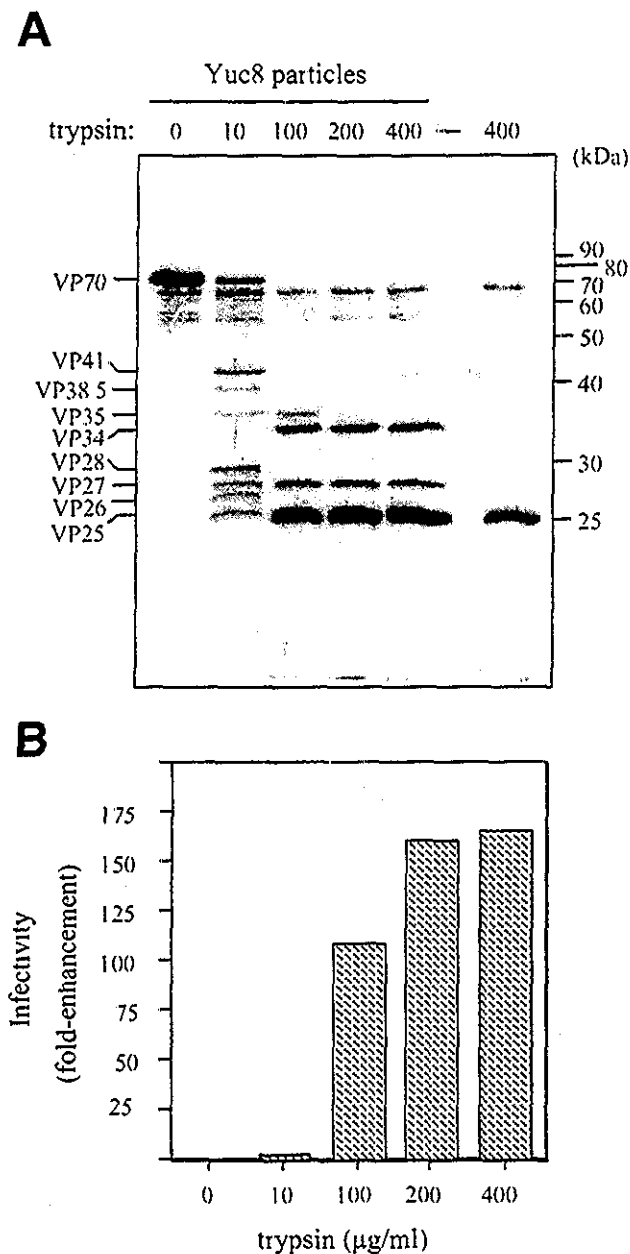


FIG 2. Trypsin treatment of purified Yuc8 particles cleaves VP70 into several polypeptides and enhances the virus infectivity. Purified Yuc8 astrovirus was treated with the indicated concentrations of IPCK-treated trypsin for 1 h at room temperature. Each sample was then divided in two portions which were either run in an SDS-12.5% polyacrylamide gel and stained with silver (A) or used to determine viral infectivity (B). (A) Trypsin alone (400 µg/ml) was used as a control, migrating as a 25-kDa protein (rightmost lane). The molecular mass standards (in kilodaltons) (protein ladder; GIBCO) and the positions of the viral proteins are marked. The assignment of the average molecular mass for the viral proteins was made based on their average migration in several experiments and different standards, as reference. The infectivity was determined by quantification of the infected cells detected by immunofluorescence and expressed as *n*-fold enhancement.

a dust-free environment PVDF membranes were sent for sequencing to the Harvard Microchemistry Facility (Harvard University). VP70 was obtained from samples with no trypsin treatment; VP28 was obtained from digestion of purified particles with 10 µg of trypsin/ml; and VP34, VP27, and VP25 were obtained from samples treated with 200 µg of trypsin/ml (see Fig. 2).

RESULTS

The intracellular processing of the ORF2 primary product of Yuc8 is limited. To study the cleavage pathway of the primary product encoded by a HAstV serotype 8 (strain Yuc8) ORF2, three regions of this ORF containing either amino acid residues 3 to 208 (polypeptide E1), 209 to 341 (E2), or 386 to 594 (E3) were synthesized in bacteria as C-terminal fusion products with GST, and the fusion proteins were used to generate region-specific hyperimmune rabbit sera (see Fig. 5A). Also, antibodies to a synthetic peptide (named KSN) comprising amino acids 4 to 20 of the HAstV-1 ORF2 were generated in mice.

Total proteins of Yuc8-infected cells, harvested at different times postinfection, were analyzed by immunoblotting with the sera mentioned above. The anti-E1, anti-E2, and anti-E3 sera recognized proteins of 90 and 70 kDa (hereafter named with the prefix VP) in infected, but not in mock-infected, cells (Fig. 1). VP90 most probably represents the primary translation product of ORF2 (whose calculated molecular mass based in its amino acid sequence is 87 kDa), while VP70 appears to be derived from VP90. The cleavage of VP90 to yield VP70 seems to be cell-associated since the protein samples used in this analysis were harvested after removing the culture medium; however, it does not represent a cleavage equivalent to that previously reported by Bass (2), based on the VP70 recognition by antibodies to the residues 4 to 20 of ORF2 (anti-KSN; see next section and Fig. 3A). The 20-kDa polypeptide that is presumably cleaved off from VP90 was not detected with any of the available sera. The antibodies to KSN detected the same viral proteins as the antibodies to E1, E2, and E3 (not shown).

Trypsin treatment of Yuc8 virus results in an ordered processing of VP70 and enhancement of the viral infectivity. Cesium chloride-purified untreated Yuc8 virus particles were found to contain exclusively VP70 (Fig. 2); however, when the virions were treated with trypsin (10 µg/ml), seven polypeptides in the range of 25 to 41 kDa were observed (Fig. 2A). At the highest trypsin concentration used, three predominant products of 34, 27, and 25 kDa accumulated. No products below 25 kDa were detected in gels with a higher concentration of polyacrylamide (not shown). When the effect of trypsin treatment on viral infectivity was determined, we found that the virus containing only VP70 showed a low basal infectivity, which varied around 10^4 fluorescent focus units/ml in the various experiments. The virus infectivity increased only slightly when the virions were treated with trypsin at 10 µg/ml, but it was enhanced more than 100-fold after digestion with trypsin concentrations higher than 100 µg/ml (Fig. 2B). Thus, the highest viral infectivity reached correlated with the presence of proteins VP34, VP27, and VP25, which seem to be the final trypsin processing products of the VP90 polyprotein precursor.

To determine the processing pathway of VP70, purified virus particles were treated with 10-fold-increasing trypsin concentrations (starting at 0.1 µg/ml) and the processing protein intermediates were identified by immunoblot using the sera to the GST-fusion proteins described above. Treatment of Yuc8

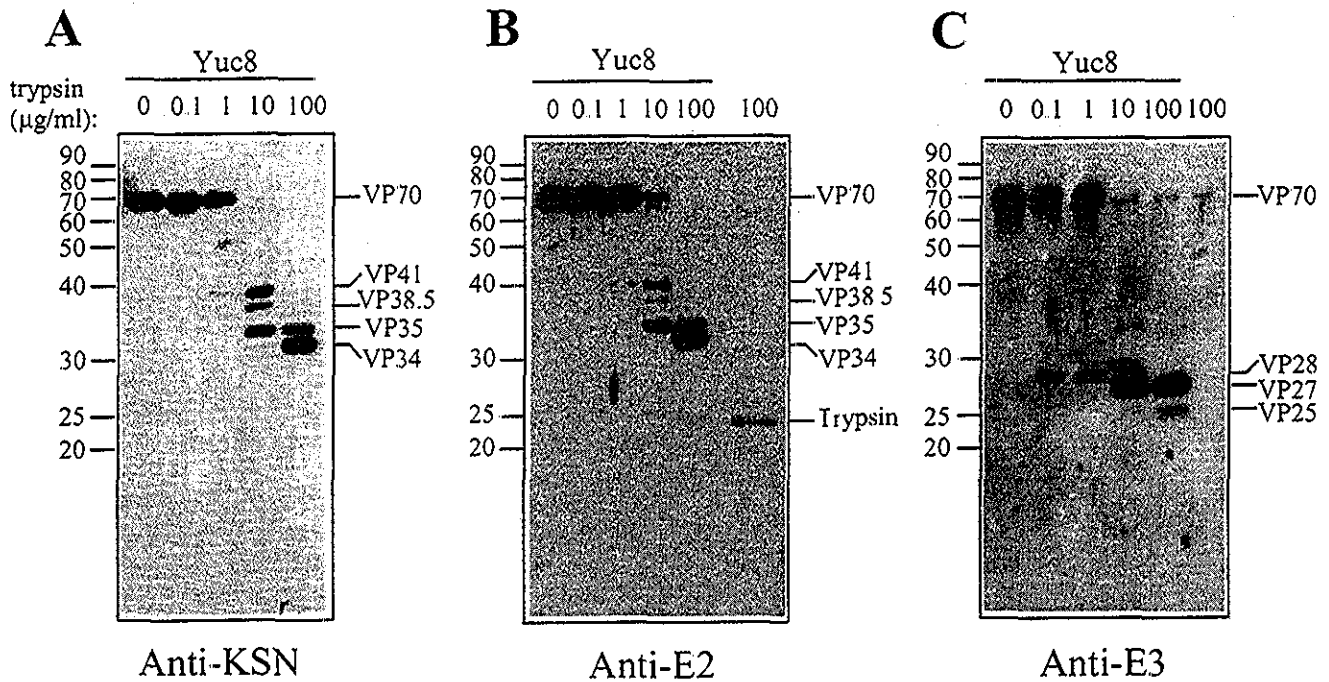


FIG. 3 Processing of the VP70 protein by trypsin is ordered. Purified Yuc8 astrovirus particles were treated with the indicated trypsin concentrations, as mentioned in Fig. 2, and each sample was divided in equal parts to run three independent SDS-12.5% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose. Each blot was incubated with either anti-KSN (A), anti-E2 (B), or anti-E3 (C) antibodies. As a control, 100 μg of trypsin/ml was included (rightmost lane in panels B and C). Note that anti-E2 (B), but not anti-E3 (C), partially cross-reacts with trypsin (25 kDa). An additional ~69-kDa band detected by anti-E3 (C) is not of viral origin, since it appears in the trypsin-alone lane. The position of the viral proteins and of trypsin are indicated as well as of the molecular mass markers (protein ladder; GIBCO). The infectivities of these samples were also determined, confirming that the enhancement of infectivity increased slightly with trypsin at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and was higher at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, as shown in Fig. 2.

purified particles with various trypsin amounts revealed that VP70 was processed in an orderly fashion (Fig. 3). The first two detected cleavage products (at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were VP41 and VP28, which represent the amino and carboxy termini of VP70, respectively, since VP41 was recognized by the antibodies to KSN (Fig. 3A), E1 (not shown), and E2 (Fig. 3B), while VP28 was detected by the anti-E3 serum (Fig. 3C). VP41 was further processed into the polypeptides VP38.5 and VP35 (Fig. 3A and B, lane 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). With trypsin at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, VP41 and VP38.5 disappeared to yield polypeptides VP35 and VP34 (Fig. 3A and B), while at the highest trypsin concentration employed (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [Fig. 2A]), VP34 was the only product derived from VP41 that was detected. The reactivity of all these polypeptides with the KSN antiserum, raised to residues 4 to 20 of ORF2, indicates that they are produced by processing of the carboxy terminus of VP41 (Fig. 3A). Antibodies to E2 recognized a 25-kDa band with trypsin at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; however, that band seems to correspond to trypsin, based on the signal observed in the well loaded with the enzyme alone (Fig. 3B).

Further cleavage of VP28 by trypsin resulted in the generation of polypeptides VP27 and VP25 (Fig. 3C, 10 and 100 μg of trypsin/ml). These proteins were recognized by the anti-E3 serum and not by antibodies to E2 or KSN. In Fig. 3C, the lower band recognized by anti-E3 seems to correspond to VP25 and not to VP26, since the latter protein was in very low amounts and transiently produced (detected only at 10 μg of trypsin/ml). The VP25 protein observed by silver staining in

Fig. 2A comigrates with trypsin, which raised the possibility that this protein was not of viral origin. However, as observed in Fig. 3C, that band is recognized by antibodies to E3 when virus was present (lane Yuc8, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), but not when trypsin alone was loaded into the gel (Fig. 3C, the rightmost lane).

N-terminal sequence of the viral proteins. To determine the exact trypsin cleavage sites in VP70, proteins VP70, VP34, VP28, VP27, and VP25 were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes for N-terminal sequencing. VP70 and VP34 were found to have a blocked amino terminus. VP28 and VP27 were found to have the same amino-terminal sequence (QSNPVRTTLQFT), indicating that the cleavage that generates them occurs at Arg₃₉₃ and that the difference between them is at their carboxy-end. The N-terminal sequence of VP25 (SIPEPG EQFRVL...) revealed that this protein is in fact derived from VP28 as a result of a cleavage at Arg₄₂₃. Although VP25 and trypsin comigrate, sequencing of the 25-kDa band by Edman degradation revealed exclusively the astrovirus protein, probably because the N terminus of trypsin may be blocked. Figure 4 shows the N-terminal sequence of VP28, VP27, and VP25 of Yuc8 in the context of the aligned sequences of eight human astrovirus serotypes.

DISCUSSION

In this study we describe the processing pathway of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. The initial pro-

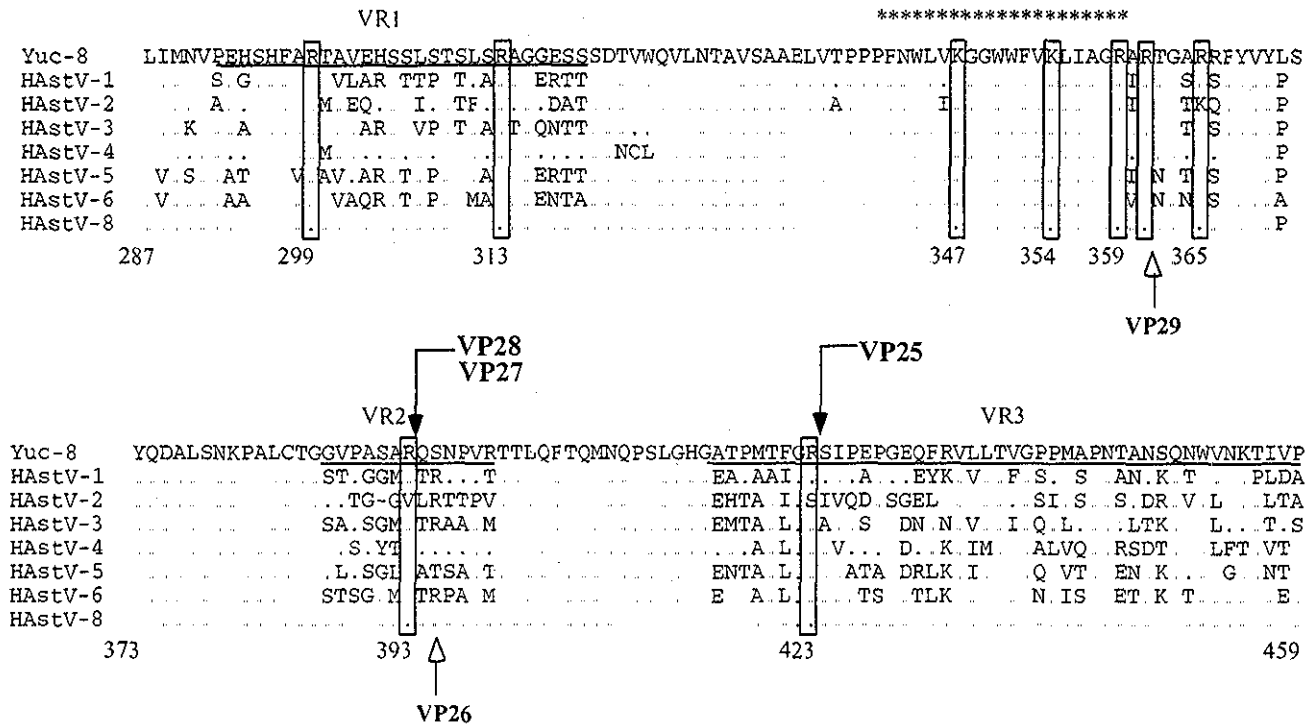


FIG. 4. N-terminal sequence of VP28-derived proteins. Purified Yuc8 particles were trypsin treated and electroblotted to PVDF membranes. VP28, VP27, and VP25 were purified, and the N termini were sequenced. The sequence alignment of eight HAstV serotypes between residues 287 and 459 of ORF2 is shown. The cleavage sites for the proteins VP28, VP27, and VP25 (boxes marked by black arrows) and the amino acid residues which could potentially represent the carboxy end of the VP41-derived proteins (boxes at the amino acid residues 299, 313, 347, 354, 359, 361, and 365) are indicated. The cleavage sites for the proteins VP29 and VP26 of HAstV-2, previously described (20), are also indicated (white arrows). The dots along the sequence denote identity, and only amino acid changes are marked. The previously described variable regions VR1 and VR2 and part of VR3 (16) are underlined. The common astrovirus epitope predicted (21) is marked with asterisks. The numbers below the sequences indicate the amino acid position based on the Yuc8 sequence. Sequence alignment was made by Clustalw analysis (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) using sequences with accession numbers L23513 (HAstV-1), A45695 (HAstV-2), AF141381 (HAstV-3), Z33883 (HAstV-4), U15136 (HAstV-5), Z46658 (HAstV-6), Z66541 (HAstV-8), and AF260508 (Yuc8).

cessing of the primary product, VP90, seems to be cell associated and yields VP70, which is assembled to form the virion. In contrast to what was described by Bass and Qiu for a serotype 1 strain (2), the cell-associated processing of Yuc8 VP90 does not occur at Arg₇₀ but rather occurs at its carboxy terminus, since VP90 and VP70 are both recognized by the KSN antiserum, which is directed to the residues 4 to 20 of the ORF2. Processing at Arg₇₀ in HAstV-1 (2) would eliminate an arginine-rich fragment from the mature capsid protein, which is highly conserved among astroviruses. Arginine residues have a high affinity for RNA (24), and similar basic regions have been suggested to be important for genome encapsidation in some RNA viruses, like alfalfa mosaic (1) and Sindbis (6) viruses. Thus, it makes sense that this fragment is preserved in VP70, where it may play an important structural role in the mature particle, by interacting with the RNA genome. The 20-kDa protein, which would be cleaved off from the carboxy-terminus of VP90 in Yuc8, to yield VP70, was not detected with the available sera, and further studies are required to determine the fate of this polypeptide. It also remains to be identified which protease is responsible for the VP90 cleavage. Although intracellular processing of VP90 to VP70 seems to be slow, given that VP70 is barely detected at 48 h with anti-E2 but clearly detected at 120 h with all sera (Fig. 1), it is possible that

VP70, once produced, is assembled and released to the supernatant. Accordingly, Sanchez-Fauquier (20) reported that the protein assembled in the virion is mainly present in the culture supernatant.

Based on the present work, we propose a processing pathway for VP90 (Fig. 5). VP90 yields VP70, which is present in the virions. Trypsin treatment of purified Yuc8 virions results in the ordered processing of VP70 with a concomitant enhancement of the viral infectivity. Based on the reactivity of the trypsin cleavage products with the sera to peptide KSN and to the recombinant proteins E1, E2, and E3, and on the N-terminal sequence of VP28, the first cleavage seems to occur at Arg₃₉₃, to yield proteins VP41 and VP28, which represent the amino and the carboxy termini of VP70, respectively. VP41 is further cleaved to yield VP38.5, VP35, and VP34. Protein VP38.5 seems to be processed quickly, since it was barely detected by silver staining (Fig. 2) and it was a minor band by immunoblotting with anti-KSN and anti-E2 sera (Fig. 3). Since VP34, VP35, VP38.5, VP41, and VP70 are all recognized by anti-KSN antibodies, we propose that the processing of VP90, VP70, and VP41 occurs at their carboxy termini. There are several trypsin susceptible sites upstream to Arg₃₉₃ (including amino acid residues 299, 313, 347, 354, 361, and 366 [Fig. 4]), where cleavages could yield proteins with sizes similar to those

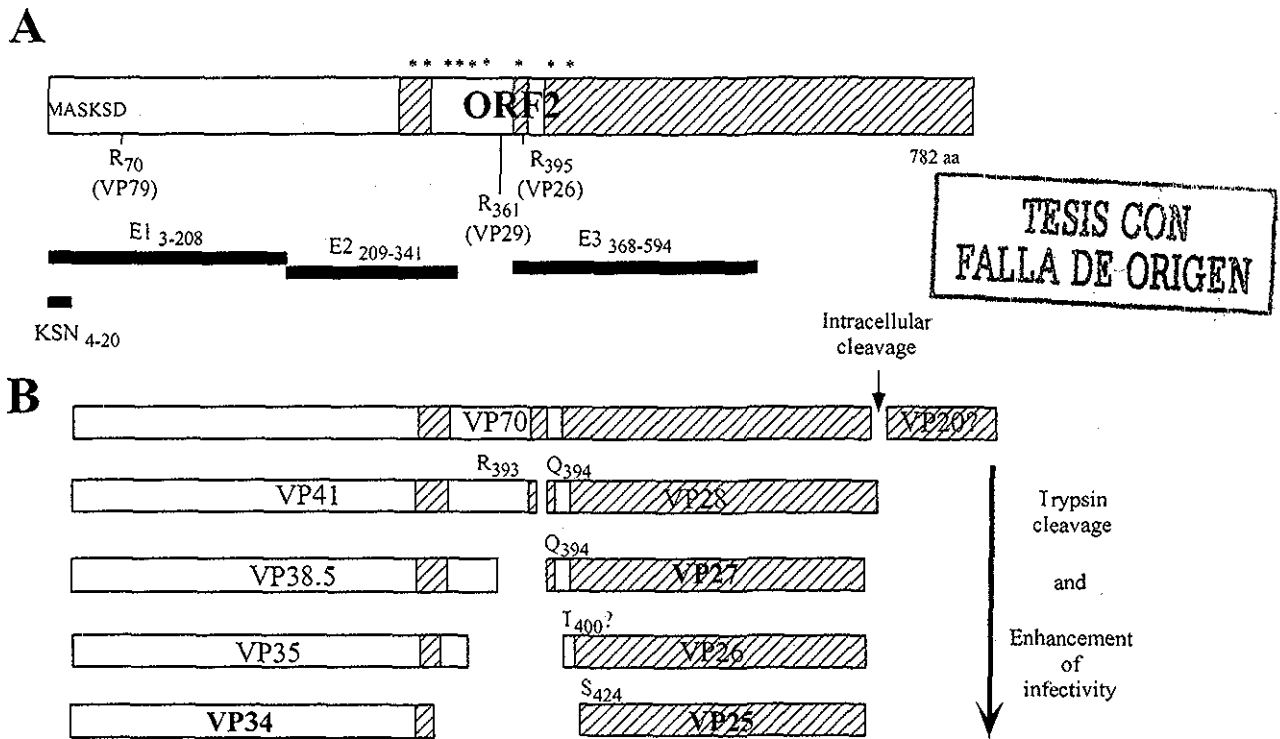


FIG. 5. (A) Diagram of the ORF2 of HAsTV and recombinant astrovirus proteins. ORF2 is represented as a box, and the recombinant proteins and the KSN peptide are represented as thick black lines. The diagram is to scale, and the relative positions of the astrovirus Yuc8 recombinant proteins E1, E2, and E3 and the peptide KSN is shown (subscripts indicate the amino acid residues included in each protein). The hypervariable regions found among human astrovirus serotypes (16) are shown as striped boxes. The arginine (R) residues identified by Bass (2) and Sanchez-Fauquier (20) as cleavage sites in the capsid polyprotein of HAsTV-1 and HAsTV-2 and the protein products proposed (in parentheses) to be generated by these cleavages are indicated. Asterisks represent susceptible trypsin sites conserved among astroviruses belonging to different serotypes, which could be cleaved to yield the VP41- and VP28-derived polypeptides. (B) Proposed trypsin processing pathway for the ORF2 polyprotein of astrovirus Yuc8. Boxes represent the products observed during virus activation; the final products, present in fully activated particles, are indicated in boldface type. The N-terminal amino acid residue of the VP28-derived products is shown. See details in the text.

of the observed products. In fact, it is known that Arg₃₆₁ is used as a cleavage site in HAsTV-2 (20). It is not known if the small peptides cleaved off from the carboxy termini of these proteins remain associated to the virion or are released from it.

The residue Arg₃₉₃ is conserved in all human astrovirus serotype strains but in serotype 2, in which cleavage at Arg₃₉₅ occurs to generate a 26-kDa protein (20); in this virus, an additional cleavage to generate a 29-kDa polypeptide was shown to occur at Arg₃₆₁. In Yuc8, we found two proteins (VP28 and VP27) of similar size to those reported by Sanchez-Fauquier (20), which have the same amino-terminal sequence, indicating that they differ in the carboxy-end, and not in the amino terminus, as reported for VP29 and VP26 (20). Thus, VP27 seems to be a product of processing at the carboxy region of VP28. Given that the nature of the protease that cleaves VP90 to yield VP70 is not known, the exact carboxy-end of VP70, and therefore of VP28, cannot be predicted; however, considering the size of these two proteins, that cleavage could occur around amino acid residue 635. In Yuc8, susceptible trypsin sites which could yield carboxy-truncated VP28 protein are located at positions 586 and 618.

VP25 is produced by cleavage at Arg₄₂₃ and is one of the predominant viral products when the purified viral particles show the highest infectivity. A protein equivalent to VP25 (one

cleaved at Arg₄₂₃) has not been described before as a component of the activated virus. Based on the viral products observed after complete activation of HAsTV-2 and Yuc8 with trypsin, VP29 and VP26 (20) could be functionally equivalent to VP27 and VP25 (this work), respectively; however, differences in the N termini between VP26 and VP25 suggest that processing, and possibly conformation, is partially different between these strains. The product of 26 kDa observed in Fig 2, when the virus was treated with trypsin at 10 µg/ml, was not analyzed by sequence since it was transiently produced and barely detected; however, it could be an intermediate product of cleavage at Arg₄₀₀ and therefore not equivalent to VP26 of HAsTV-2 (20).

Bass and Qiu (2) reported that cleavage of the HAsTV-1 capsid precursor to yield a protein of 29 kDa occurs at Arg₃₉₅ and not at residue 361, as reported by Sanchez-Fauquier (20) for a protein of a similar size. Thus, the cleavage that yielded the 29-kDa protein of HAsTV-1 does seem to be equivalent to the cleavage that generates VP28 and VP27 in Yuc8. Unfortunately, the amino terminus of the 26-kDa protein of HAsTV-1 was not determined, so that it is not known if in the case of HAsTV-1 both proteins have the same amino (as described in this study for Yuc8) or the same carboxy (as described for HAsTV-2 [20]) terminus.

In contrast to previous observations with other astrovirus strains (2, 18, 20), purification of Yuc8 particles cultivated in the presence of trypsin resulted in a virus containing a single polypeptide (VP70), and not in virus containing the smaller VP34, VP27, and VP25 proteins. These proteins were only observed after treatment of the purified Yuc8 particles with high trypsin concentrations (more than 200 $\mu\text{g/ml}$), via protein intermediates. The fact that VP70 or the protein intermediates leading to the smaller protein products were not detected in other reports (2, 4, 20) might be due to differences in the susceptibility of the astrovirus strains analyzed to trypsin or to the specific activity of the trypsin preparation used.

The study of the processing pathway of the astrovirus Yuc8 by trypsin has revealed a complex and ordered process, which may be partially different in different astrovirus strains. This is supported by the fact that the smallest cleavage products of two astrovirus strains after complete trypsin digestion of the capsid, VP25 of Yuc8 and VP26 of HAstV-2 (20), have a different N terminus. The different cleavage products could be the result of the protein assembled in the capsid (i.e., VP70 in Yuc8 versus VP79 in HAstV-1) or the consequence of alternative trypsin cleavage sites present in two equivalent proteins having different amino acid sequence.

Although the mechanism of the enhancement of astrovirus infectivity by trypsin remains to be determined, we know now that the largest enhancement of Yuc8 infectivity by trypsin was observed only after several cleavages occurred, when VP34, VP27, and VP25 accumulated. The cleavages responsible for the enhancement of Yuc8 infectivity seem to be dependent on previous cleavages of VP70, which probably expose new trypsin-susceptible sites, suggesting that conformational changes occur during virus activation. In agreement with this idea, Bass and Qiu (2) observed that trypsin-treated and -untreated HAstV-1 particles show different reactivity to monoclonal antibodies directed to different epitopes of the structural protein. It is possible that trypsin-treated particles gradually change their conformation to favor a better attachment, entry, or uncoating of the virions during infection.

The processing of the Yuc8 ORF2 polyprotein by trypsin to yield infectious particles seems to be a complex event regulated in a cascade. Understanding of this event and the mechanism by which trypsin enhances astrovirus infectivity should help to elucidate the initial interactions of the virus with the host cell.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Maria P. E. Salas for technical assistance and Elizabeth Mata for assistance with animal care. We also thank Pavel Isa for critical reading of the manuscript.

This work was partially supported by grants MENSE31739 from the National Council for Science and Technology—Mexico, grant IN200999 from DGAPA-UNAM, and grants 75197-527106 and 55000613 from Howard Hughes Medical Institute.

REFERENCES

- Baer, M., F. Houser, L. Loesch-Fries, and L. Gehrke. 1994. Specific RNA binding by amino-terminal peptides of alfalfa mosaic virus coat protein. *EMBO J.* 13:727-735.
- Bass, D. M., and S. Qiu. 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J. Virol.* 74:1810-1814.
- Bass, D. M., and U. Upadhyayula. 1997. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J. Virol.* 71:8666-8671.
- Belliot, G., H. Laveran, and S. S. Monroe. 1997. Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses. *Virus Res.* 49:49-57.
- Dennehy, P. H., S. M. Nelson, S. Spangenberg, J. S. Noel, S. S. Monroe, and R. I. Glass. 2001. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. *J. Infect. Dis.* 184:10-15.
- Geigenmuller-Gnirke, U., H. Nitschko, and S. Schlesinger. 1993. Deletion analysis of the capsid protein of Sindbis virus: identification of the RNA binding region. *J. Virol.* 67:1620-1626.
- Guerrero, M. L., J. S. Noel, D. K. Mitchell, J. J. Calva, A. L. Morrow, J. Martinez, G. Rosales, F. R. Velazquez, S. S. Monroe, R. I. Glass, L. K. Pickering, and G. M. Ruiz-Palacios. 1998. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17:723-727.
- Herrmann, J. E., D. N. Taylor, P. Echeverria, and N. R. Blacklow. 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N. Engl. J. Med.* 324:1757-1760.
- Jiang, B., S. S. Monroe, E. V. Koonin, S. E. Stine, and R. I. Glass. 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:10539-10543.
- Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, Y. M. Saif, D. R. Snodgrass, H. Ushijima, M. Shimizu, and B. Grinde. 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J. Gen. Virol.* 82:1061-1067.
- Lee, T. W., and J. B. Kurtz. 1981. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *J. Gen. Virol.* 57:421-424.
- Lewis, T. L., and S. M. Matsui. 1996. Astrovirus ribosomal frameshifting in an infection-transfection transient expression system. *J. Virol.* 70:2869-2875.
- Lewis, T. L., and S. M. Matsui. 1997. Studies of the astrovirus signal that induces (-1) ribosomal frameshifting. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412:323-330.
- Marczinke, B., A. J. Bloys, T. D. Brown, M. M. Willcocks, M. J. Carter, and I. Brierley. 1994. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J. Virol.* 68:5588-5595.
- McIver, C. J., G. Hansman, P. White, J. C. Dooltree, M. Catton, and W. D. Rawlinson. 2001. Diagnosis of enteric pathogens in children with gastroenteritis. *Pathology.* 33:353-358.
- Mendez-Toss, M., P. Romero-Guido, M. E. Munguia, E. Mendez, and C. F. Arias. 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J. Gen. Virol.* 81:2891-2897.
- Monroe, S. S., B. Jiang, S. E. Stine, M. Koopmans, and R. I. Glass. 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of *Astroviridae* as a new family of RNA viruses. *J. Virol.* 67:3611-3614.
- Monroe, S. S., S. E. Stine, L. Gorelkin, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, and R. I. Glass. 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *J. Virol.* 65:641-648.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez-Fauquier, A., A. L. Carrascosa, J. L. Carrascosa, A. Otero, R. I. Glass, J. A. Lopez, C. San Martin, and J. A. Melero. 1994. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology.* 201:312-320.
- Wang, Q. H., J. Kakizawa, L. Y. Wen, M. Shimizu, O. Nishio, Z. Y. Fang, and H. Ushijima. 2001. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J. Med. Virol.* 64:245-255.
- Willcocks, M. M., T. D. Brown, C. R. Madeley, and M. J. Carter. 1994. The complete sequence of a human astrovirus. *J. Gen. Virol.* 75:1785-1788.
- Willcocks, M. M., J. B. Kurtz, T. W. Lee, and M. J. Carter. 1995. Prevalence of human astrovirus serotype 4: capsid protein sequence and comparison with other strains. *Epidemiol. Infect.* 114:385-391.
- Yarus, M. 1993. An RNA-amino acid affinity, p. 205-217. In R. F. Gesteland and J. F. Atkins (ed.), *The RNA world* vol. 24. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

DISCUSION

Prevalencia y diversidad genotípica de AstH en México

Durante el periodo de octubre de 1994 a marzo de 1995 se colectaron muestras de heces de niños menores de cinco años de edad provenientes de cinco localidades diferentes de México. Esta colección de muestras se utilizó originalmente, en un estudio previo al presente, para determinar la prevalencia de los RvH tanto en niños con diarrea como en niños sin diarrea, la cual resultó ser del 54.4% y 7.3%, respectivamente (54). Dado que los AstH son el segundo agente de diarrea viral aguda infantil y que el conocimiento sobre su comportamiento epidemiológico en niños mexicanos es muy limitado, se estudió la prevalencia y diversidad serotípica de estos virus utilizando las muestras de heces negativas para RvH de dicha colección. Asimismo, se determinó la prevalencia de los AdH, que se encuentran entre los principales agentes virales de diarrea infantil.

Los AstH se detectaron en las cinco localidades de México estudiadas (Ciudad de México, Tlaxcala, San Luis Potosí, Mérida y Monterrey) indicando que se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del país. Estos hallazgos son similares a los reportados en otros estudios, donde se ha visto que estos virus se encuentran presentes en diversas regiones geográficas del mundo localizadas en los cinco Continentes, incluidas dos de México (5, 9, 10, 17-19, 36, 40, 48, 57, 60, 65, 67). De manera similar a nuestros resultados, en un estudio realizado en Japón se

observó que durante un mismo periodo de tiempo los AstH se encontraron presentes en cinco ciudades localizadas a lo largo del país (60).

Se ha observado que la prevalencia de AstH durante un mismo periodo de tiempo varía de un lugar a otro (9, 48, 60) y, de manera particular, un estudio realizado en cinco ciudades de Japón en donde la prevalencia de AstH varió de una región a otra del 0.5 al 10.4% (60). En nuestro estudio se observó que la prevalencia de los AstH en niños con diarrea varió de una región a otra del 3.0 al 11.3% aunque, dado el número limitado de muestras de heces analizadas dentro de cada una de las localidades estudiadas, no fue posible determinar si estas diferencias son estadísticamente significativas.

Asimismo, se ha observado en Melbourne, Australia (49), y en cuatro ciudades de Japón: Kurume, Maizuru, Sapporo y Tokyo (60), que durante un periodo de tres años la prevalencia de AstH varió de un año a otro. La estacionalidad de los AstH no es clara pues, mientras que en algunas regiones del mundo la frecuencia de AstH ha presentado sus mayores picos en los meses de otoño e invierno (18, 48), en otras se ha observado una mayor frecuencia en los meses de primavera y verano (10, 36, 50). En México, un estudio previo realizado en la Ciudad de México, mostró que de julio de 1989 a diciembre de 1991, la diarrea infantil ocasionada por AstH se presentó a lo largo de todo el año con una frecuencia mayor en los meses de primavera y verano (17). Sin embargo, se desconoce si la prevalencia de AstH en otras localidades del país presenta las mismas características. Los datos obtenidos en el presente estudio, el cual se limitó a un periodo de seis meses, no

permiten determinar si la prevalencia de AstH varía o se mantiene estable a lo largo del año en la población infantil de las localidades analizadas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, aunados a los obtenidos en el estudio previo realizado en la Ciudad de México (67), sugieren que el comportamiento de los AstH en nuestro país, en general, se apega al observado en la mayoría de los países, donde su prevalencia fluctúa entre el 2 y el 16% (66).

Los datos reportados en la literatura muestran que las coinfecciones de AstH con RvH son comunes en los niños con diarrea (9, 14). En el presente estudio se determinó que en el 3.0% de los niños con diarrea positivos para RvH estuvieron presentes los AstH. No hay reportes que indiquen si la presencia de alguno de estos dos virus pudiese inducir de alguna forma la susceptibilidad por el otro. Sin embargo, el hecho de que en nuestro estudio la frecuencia de AstH en muestras negativas y positivas para RvH fue similar sugiere que una infección por RvH no hace al huésped más susceptible de ser infectado por AstH.

Dentro de los AstH se han identificado ocho serotipos (AstH-1 a 8) los cuales son enteramente consistentes con el grupo genicos (genotipos) determinados en base a la región de 348 pb localizada en el extremo 5' del ORF2 (52) y, al parecer, también con los genotipos determinados en base a la región 3' del ORF2 (44, 67). En el presente estudio, todas las cepas de AstH tipificadas presentaron secuencias relacionadas con uno de los ocho serotipos conocidos (Fig. alineamiento), y el análisis filogenético de todas las secuencias disponibles de la región carboxilo terminal del ORF2 de astrovirus mostró que cada cepa mexicana se agrupó con uno

de los ocho genogrupos descritos (Fig 10). Así, se encontraron en México, en los niños con diarrea, seis (1 a 4, 6 y 8) de los ocho genotipos de AstH. Estos resultados, aunados a los obtenidos por Walter y colaboradores (67), quienes detectaron (por EIA y RT-PCR del extremo 3' terminal del ORF2) la presencia de los serotipos y/o genotipos 1 al 5 y del serotipo 7, en niños con diarrea provenientes de la Ciudad de México, sugieren que en nuestro país la diversidad serotípica de AstH está dada, al menos, por los ocho serotipos conocidos. Resultados parecidos se han observado en países como Bangladesh, Egipto, España e Inglaterra, donde se ha detectado también una gran diversidad serotípica de AstH (≥ 5 serotipos) (Tabla 1).

Se ha observado que la distribución geográfica de los diferentes serotipos de AstH varía de una región a otra (Tabla 1). Mientras que, como se mencionó en el párrafo anterior, existen regiones donde se han identificado cinco o más serotipos, hay otras en las que durante periodos de hasta tres años se ha identificado únicamente la presencia de dos serotipos (serotipos 1 y 3 ó 1 y 4) (Tabla 1) (60). En el presente estudio, la mayor diversidad genotípica se identificó en Monterrey, donde se encontraron cuatro de los seis genotipos de AstH identificados, incluyendo muestras positivas y negativas para RvH. En las demás localidades en donde se detectaron más de dos cepas se encontró que estuvieron presentes por lo menos dos genotipos. La distribución geográfica de los diferentes genotipos varió también de una región a otra teniendo así, que el genotipo 1 se detectó únicamente en Mérida y Monterrey, el 3 sólo en Tlaxcala y en la Ciudad de México y el genotipo 8 únicamente en Mérida. Cada uno de los genotipos 1 a 4 se detectaron en por lo menos dos localidades, mientras que los genotipos 6 y 8 únicamente en Monterrey y

Mérida, respectivamente, indicando que en México los genotipos 1, 2, 3 y 4, en general, son los más comunes y ampliamente distribuidos.

El genotipo 2 de AstH estuvo presente en tres (Ciudad de México, Tlaxcala y San Luis Potosí) de las cinco regiones de México analizadas, siendo el genotipo de mayor distribución geográfica durante el periodo estudiado. Un estudio previo realizado durante tres años consecutivos en la región de San Pedro Mártir, en la Ciudad de México, mostró que el serotipo 2 fue el serotipo más prevalente (42.0 %) (67), aunque sólo se detectó durante los meses de abril a agosto de 1990 y 1991 y en septiembre de 1991. El periodo de tiempo estudiado en el presente trabajo (octubre a marzo) corresponde precisamente a los meses en que el serotipo 2 no fue detectado en el estudio de San Pedro Mártir, lo cual pudiese indicar un desplazamiento en el tiempo de la ocurrencia de este serotipo, en la Ciudad de México.

Otra observación interesante es la de la ocurrencia del genotipo 3 en la región del DF, donde se determinó que estuvo presente de octubre de 1994 a marzo de 1995 ocupando, junto con el genotipo 4, el primer lugar en prevalencia. Los resultados obtenidos en el estudio previo realizado en esta misma región (67) muestran que el serotipo 3 se encontró presente en la Ciudad de México, únicamente durante los períodos de octubre de 1989 a marzo de 1990 y de octubre a diciembre de 1991, siendo en ambos el serotipo predominante, mientras que en el periodo intermedio (octubre de 1990 a marzo de 1991) no se detectó su presencia. Estas observaciones sugieren la posibilidad de un comportamiento epidemiológico bienal del serotipo 3, por lo menos en la región de la Ciudad de México, como se ha sugerido para el serotipo 1 en Oxford, Inglaterra (28) y en Melbourne, Australia (48).

Sobresale la presencia del genotipo 8 en la región de Mérida donde fue tan frecuente como el 1 (40 %), en las muestras de los niños con diarrea. Este genotipo hasta hace poco se encontraba considerado como "raro", ya que sólo se le había identificado de manera unitaria en otras cuatro regiones del mundo (48). Sin embargo, fue encontrado recientemente en Egipto, en España (18, 50) y durante el presente estudio en Mérida, indicando que es más frecuente de lo reportado previamente en la literatura.

Las observaciones previas (28, 48, 51, 60) y los resultados obtenidos en este trabajo, parecen indicar que en el transcurso del tiempo un serotipo es desplazado por otro, debido probablemente a que los serotipos de mayor prevalencia confieren inmunidad contra ellos mismos, pero no contra los serotipos nuevos o las variantes que aparecen posteriormente. Estudios que abarquen periodos de tiempo más amplios, así como el análisis del estado inmunológico de los niños involucrados, ayudarían a establecer el comportamiento epidemiológico de los AstH en México así como las causas que lo originan.

A pesar de que los AstH son agente causal de diarrea infantil como lo muestran los estudios realizados en voluntarios (26), estos virus se han identificado también en las heces de niños sin síntomas diarreicos (9, 10, 19, 65). En nuestro trabajo, se determinó también la prevalencia de AstH en los niños asintomáticos y se encontró que esta fue del 2.5%. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en otras regiones del mundo: Bangladesh (65), Francia (9), Guatemala (10) y Tailandia, (19), donde la prevalencia de los AstH en los niños asintomáticos ha sido del 2 al 2.4

%, nuestros resultados quedan dentro del margen reportado. En las regiones de Mérida y Monterrey la prevalencia de AstH en los niños asintomáticos fue muy cercana o igual a la determinada para los niños con diarrea. Desconocemos las causas que originan este comportamiento pero pudiesen estar relacionadas con la estacionalidad de AstH en estas localidades, es decir, si la frecuencia de AstH fue muy alta en los meses precedentes a los estudiados, es factible que los niños asintomáticos hayan adquirido inmunidad contra ellos. En general, las infecciones asintomáticas pudiesen ser resultado de una previa infección sintomática y/o del estado inmunológico del huésped y/o de la virulencia de la cepa. Para comprender las causas de dicho comportamiento, es necesario realizar estudios más amplios en los cuales se de seguimiento a los niños evaluados desde su nacimiento hasta, por lo menos, los cinco años de edad y los cuales permitan establecer el comportamiento epidemiológico de AstH a lo largo de todo el año en las localidades estudiadas.

En la literatura no existen datos sobre la frecuencia de las infecciones duales de AstH con RvH en niños sin diarrea. En el presente estudio se determinó que el 2.7% de los niños asintomáticos excretó ambos virus, siendo este el pimer reporte al respecto.

No se ha estudiado la diversidad serotípica de AstH en los niños sin diarrea, por lo cual tampoco se ha analizado si existe alguna correlación entre el serotipo infectante y la presencia o ausencia de síntomas diarréicos. En el presente estudio nosotros encontramos que entre las cepas de AstH detectadas en los niños asintomáticos estuvieron presentes los genotipos 1, 2, 3 y 8. De los resultados obtenidos no se encontró una asociación, entre un genotipo de AstH particular y la

presencia o ausencia de síntomas diarreicos. Sin embargo, no se puede descartar que cepas pertenecientes a un mismo genotipo detectadas en ambos tipos de niños tengan algunas diferencias, de tal manera que los AstH detectados en las muestras de los niños asintomáticos representen cepas atenuadas por algún(os) cambio(s) específicos en otra región del mismo ORF 2 y/o en otra(s) regiones del genoma que le(s) confiera(n) dicha característica. Además, el número limitado de muestras analizadas en el presente estudio, así como el hecho de que no se determinó la presencia de otros agentes enteropatógenos en las muestras de heces analizadas y la posibilidad de que los niños al momento de la infección hayan tenido protección inmune contra algún(os) serotipo(s) de AstH, no permiten llegar a una conclusión al respecto.

Dado que la región del ORF2 analizada para la determinación de los genotipos de AstH es muy variable entre los diferentes serotipos (Fig. 5), y con la finalidad de conocer la relación genética entre ellos, se analizó la diversidad genética intra- e intertipo de AstH utilizando todas las secuencias reportadas (de la región del ORF 2 analizada), así como las obtenidas en el presente estudio. Los resultados obtenidos mostraron que, de manera similar a lo observado por Monceyron y colaboradores (44), quienes analizaron la región 3' terminal del genoma de los AstH, incluida la región no traducida, el grupo genéticamente más alejado y con mayor diversidad genética intraserotípica fue el de los AstH-4, seguido por el de los AstH-6 y el de los AstH-1, mientras que el grupo más conservado fue el de los AstH-7, seguido por los genotipos 5 y 8 y, finalmente por el 2.

Es interesante mencionar que en la región carboxilo terminal de la poliproteína codificada por el ORF2, la divergencia genética encontrada entre los genotipos 3 y 7 y entre los genotipos 5 y 8 es limitada, siendo menor a la encontrada entre dos cepas de astrovirus de genotipo 4. Sin embargo, es claro que la diversidad genética intratipo de cada uno de éstos genotipos es lo suficientemente baja como para no clasificar erróneamente a las cepas pertenecientes a ellos (Tab 2), por lo cual la asignación del genotipo en base a la región analizada parece ser adecuada.

Se sabe que, además de los AstH y los RvH, los AdH de serotipo 40 y 41 son agentes etiológicos de diarrea infantil (20). Con la finalidad de enriquecer el conocimiento sobre el comportamiento epidemiológico de los principales agentes de diarrea viral infantil en México, se estudió también la prevalencia de AdH, en niños mexicanos menores de cinco años de edad, utilizando las mismas muestras de heces en las que se determinó la prevalencia de AstH. Los AdH se encontraron presentes con una prevalencia que, en términos generales, fue aproximadamente dos veces menor a la encontrada para AstH, tanto en los niños con diarrea (2.8 vs 5.4%) como en los niños sin síntomas diarreicos (1.1 vs 2.5). Sin embargo, en los niños con diarrea provenientes de Mérida y Monterrey, la prevalencia de AdH fue igual a la encontrada para AstH, lo cual sugiere que el comportamiento epidemiológico de los AdH en México varía también de una región a otra y, posiblemente, dependiendo del periodo de tiempo estudiado.

Aislamiento y caracterización molecular del genoma de una cepa de AstH

Tomando en cuenta que la información sobre la biología molecular de los AstH es escasa y con la finalidad de comenzar a estudiar a estos virus en nuestro laboratorio, se adaptaron a crecer en cultivo celular algunas cepas de AstH, presentes en las muestras de heces analizadas, pertenecientes a los serotipos más comunes (1, 2 y 3) y al serotipo 8. De estas, por ser la cepa que mejor se propagaba en cultivo celular y por pertenecer a un tipo novedoso, se seleccionó para ser caracterizada a la cepa de genotipo 8, la cual se denominó Yuc-8.

Previo al aislamiento de la cepa Yuc-8, se habían descrito únicamente las secuencias del genoma completo de dos cepas de AstH-1 (L23513 y Z25771), de una de AstH-2 (L13745) y de una de AstH-3 (AF141381). Así, la secuencia del genoma de la cepa Yuc-8 representa la primera secuencia del genoma completo de un AstH de este serotipo, del cual sólo se conocía la secuencia del ORF2 de una cepa identificada en el Reino Unido (Z66541). La comparación de la secuencia completa (6759 bases) de Yuc-8 con las otras cuatro secuencias existentes mostró que el genoma de Yuc-8 se encuentra organizado en tres marcos de lectura abierta (ORF1a, ORF1b y ORF2), flanqueado por una región no traducida en cada uno de sus extremos 5' y 3' terminales y poliadenilado en su extremo 3' terminal. En el ORF 1a se identificaron los aminoácidos de la triada catalítica de proteasas de serina de tipo 3C presentes en proteasas virales de este tipo; en el ORF 1b los correspondientes a motivos de polimerasas de RNA dependientes de RNA; se determinó también la presencia de la secuencia heptamérica de deslizamiento necesaria para que ocurra el

cambio de marco de lectura ribosomal de -1 requerido para la expresión del ORF 1b. (21). Estos resultados permitieron establecer que Yuc-8 es un astrovirus de serotipo 8 que presenta la organización genómica característica de la familia *Astroviridae*.

La comparación de la región de la poliproteína no estructural del ORF 1a de Yuc-8 con la secuencia correspondiente de los AstH de serotipo 1, 2 y 3 mostró un alto nivel de conservación entre estas cepas (>93% de identidad a nivel de aa). Sin embargo, se encontró una pequeña región de alta diversidad alrededor de los aminoácidos 767 y 790 (numeración de acuerdo a la secuencia de Yuc-8), en donde Yuc-8 y AstH-2 carecen de 7 residuos en comparación con el AstH-3 y de 15 aminoácidos con respecto al AstH-1, respectivamente (Fig 1a del artículo II). La ausencia de 15 residuos de aminoácidos en la posición 790 se ha asociado con la adaptación de los AstH al cultivo en células HEK y LLCMK2, ya que los virus crecen en estas células, pero no con su adaptación al cultivo en células Caco-2 (69). La cepa Yuc-8, a pesar de haber sido adaptada al cultivo en células Caco-2, carece de estos 15 aminoácidos, lo cual sugiere que si esta región (in/del II en la Fig. 1a del artículo II) juega un papel durante la adaptación del virus a cultivo en una línea de células específica, no es el único factor involucrado en esto. Para resolver este punto es necesario un análisis más detallado de las cepas de astrovirus silvestres y las adaptadas a cultivo de células.

El ORF 2 de Yuc-8 codifica para una poliproteína de 782 aminoácidos, cuyo peso molecular es de aproximadamente 86.5 kDa. La comparación de la secuencia de aminoácidos predicha para la poliproteína del ORF 2 de los diferentes serotipos de astrovirus de humano mostró que entre un mismo serotipo estas secuencias

presentan una identidad mayor al 94%. La secuencia de la poliproteína de ORF 2 de la cepa Yuc-8 mostró una identidad del 94% con la correspondiente secuencia de una cepa de serotipo 8 (Z66541) aislada en el Reino Unido (Tabla uno del artículo I), indicando que la cepa Yuc-8 es un AstH de genotipo (serotipo) 8.

El alineamiento de las secuencias del ORF 2 de siete serotipos de AstH (Fig 1b del artículo II) mostró la existencia de dos dominios distintos, previamente observados por Willcocks et al (1995) quienes analizaron únicamente tres serotipos. Un dominio muy conservado (> 80%, de identidad) entre los diferentes serotipos, en la región amino terminal (aa 1 a 415), en el cual se observaron sólo dos regiones variables entre los residuos 292 a 319 (VR1) y 386 a 399 (VR2). Y, un dominio altamente variable (36 a 60% de identidad) entre los diferentes serotipos, en la región carboxilo terminal (aa 416 hasta el final de la poliproteína) en el que, a diferencia de lo reportado por Willcocks et al (74), no se observó la conservación de aminoácidos al final del ORF 2 (Fig. 1b, artículo II).

El análisis filogenético del ORF 2 mostró una relación genética diferente entre los serotipos 1 a 8 al analizar estos dominios por separado. El árbol filogenético generado al comparar el dominio conservado fue muy similar a los árboles reportados previamente por Belliot *et al* (7) y Noel *et al* (52), quienes analizaron una región de 137 aminoácidos (residuos 73 a 210 en ORF 2 de Yuc-8). Los serotipos 2, 4 y 8 se encontraron cercanamente agrupados mientras que los serotipos 1, 3, 5 y 6 estuvieron relacionados en menor medida con este grupo (Fig 2a del artículo II). Por otro lado, el dendrograma generado al comparar el dominio variable del ORF 2 fue diferente. Los serotipos 4 y 8 se encontraron entre los menos

relacionados (Fig. 2b del artículo II), lo cual resultó en un árbol filogenético similar al reportado en otro análisis que incluyó parte de la región 3' terminal del genoma de los AstH (44). Estos resultados sugieren que el dominio variable carboxilo terminal de la poliproteína de ORF 2 se encuentra sometido a una presión inmunológica, lo cual probablemente contribuye a la diversidad observada. De hecho, se han identificado anticuerpos neutralizantes que reconocen a esta región (4). Además, es interesante el hecho de que la relación genética observada al analizar la región variable difiera tanto de la relación encontrada en la región conservada de la proteína. Es posible que la presión selectiva sobre esta última región opere de manera diferencial a lo largo de la poliproteína del ORF 2, como resultado de la suma de varios factores entre los cuales estarían incluidas las características intrínsecas de la estructura de la partícula viral así como las de la respuesta inmune del huésped. Por otro lado, esto pudiese ser también el resultado de una recombinación intraserotípica de los AstH, como se ha sugerido previamente (7, 22, 23).

Caracterización de la vía de procesamiento de la poliproteína del ORF2 de la cepa de AstH "Yuc-8"

Con la finalidad de contribuir al conocimiento sobre el procesamiento de la proteína precursora de las proteínas estructurales de los AstH se procedió a caracterizar la vía del procesamiento de la poliproteína del ORF 2 de la cepa de AstH "Yuc-8".

Los resultados obtenidos muestran que el procesamiento del producto primario (VP90) de la traducción del ORF 2 de Yuc-8 para dar origen a VP70 se encuentra asociado a la célula huésped. Se encontró que el procesamiento de VP90 ocurre en su extremo carboxilo terminal, lo cual difiere de lo reportado previamente por Bass y Qiu quienes determinaron que el corte intracelular de VP90 ocurre en el residuo 70 de la poliproteína del ORF 2 de AstH-1 (3), es decir, en el extremo amino terminal de VP90. El procesamiento en el residuo Arg₇₀ en AstH-1 (3) eliminaría una región rica en argininas del precursor de las proteínas estructurales, la cual se encuentra altamente conservada entre los diferentes astrovirus. Se sabe que los residuos de arginina presentan una alta afinidad por el RNA (76) y se ha sugerido que regiones básicas similares son importantes para la encapsidación del genoma viral de algunos virus de RNA (2, 15). Así, el hecho de que VP70 conserve esta región rica en argininas tiene sentido ya que pudiese desempeñar un papel importante en la partícula viral madura al interactuar con el genoma de RNA. En lo que respecta a la región carboxilo terminal de VP90, proteína de 20 kDa, que se libera de VP90 para dar origen a VP70 queda por determinar cuál es su destino.

Se propone que la vía del procesamiento para el precursor de las proteínas estructurales de Yuc-8 (VP90) es la descrita en la Fig. 5 del manuscrito III en donde a partir de VP90 se genera VP70 la cual se encuentra presente en los viriones. El tratamiento con tripsina de los viriones de Yuc-8 purificados da como resultado el procesamiento ordenado de VP70. En base a la secuencia del extremo amino terminal de VP28 y a la reactividad de los sueros dirigidos contra el péptido KSN y las proteínas recombinantes E1, E2 y E3, parece que el primer corte con tripsina ocurre en el residuo Arg₃₉₃ dando origen a las proteínas VP41 y VP28 que

representan los extremos amino y carboxilo terminales de VP70, respectivamente. La proteína VP41 se procesa posteriormente para dar origen finalmente a la proteína VP34 mientras que la proteína VP28 da origen a las proteínas VP27 y VP25. Los resultados obtenidos indican que el procesamiento de VP41 y de los intermediarios que se originan antes de VP34 ocurre en el extremo carboxilo terminal de ellos mientras que el procesamiento de VP28 se da, al parecer, en su extremo carboxilo terminal para dar origen a VP27 la cual posteriormente se procesa en su extremo amino terminal para producir, al ser cortada en el residuo Arg₄₂₃, a la proteína VP25. Los productos finales del procesamiento de VP70 con tripsina son las proteínas VP34, VP27 y VP25 cuya aparición está relacionada con el incremento de la infectividad del virus. En una cepa de AstH-2 se determinó que el corte en el residuo Arg₃₉₅ ocurre para generar una proteína de 26 kDa (61) y un corte adicional en el residuo Arg₃₆₁ da origen a un polipéptido de 29 kDa. Tomando en cuenta los productos que se observan después de la activación completa del virus con tripsina, es posible que las proteínas VP29 y VP26 de AstH-2 (61) y las proteínas VP27 y VP25 de Yuc-8 sean productos funcionalmente equivalentes. Sin embargo, el hecho de que VP27 y VP28 de Yuc-8 sean idénticas en el extremo amino terminal a diferencia de VP27 y VP26 de AstH-2 que al parecer comparten el extremo carboxilo terminal y no el amino terminal indica que el procesamiento es parcialmente diferente entre estas cepas.

El procesamiento de la poliproteína del ORF 2 de Yuc-8 es un proceso complejo y ordenado que puede ser parcialmente diferente en las distintas cepas de astrovirus. Esta observación se basa en el hecho de que los productos más pequeños de la digestión completa con tripsina del precursor de las proteínas estructurales,

VP25 de Yuc-8 y VP26 de AstH-2 (61), son diferentes en sus extremo amino terminal. Las diferencias en los productos de la digestión con tripsina pueden ser el resultado de la proteína ensamblada en el virión, VP70 en Yuc-8 y VP90 en HAst-2, o bien, la consecuencia de sitios de corte con tripsina alternativos presentes en dos proteínas equivalentes cuyas secuencias de aminoácidos difieren.

El presente trabajo representa el primer estudio realizado simultáneamente en cinco regiones geográficas de México sobre el comportamiento epidemiológico de los AstH, en niños menores de 5 años de edad con y sin diarrea, el cual refleja en pequeña escala la amplia distribución y diversidad de estos agentes en la población infantil de nuestro país. El aislamiento y caracterización molecular del genoma de Yuc-8 dieron inicio al estudio de las características moleculares de los AstH en nuestro laboratorio de las cuales poco se conoce.

Los datos aquí reportados deberán servir como marco de referencia para estudios posteriores ya sea sobre la epidemiología de los AstH o bien, sobre la biología molecular de estos virus.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos hasta el momento nos han permitido establecer que los AstH se encuentran ampliamente distribuidos en México y sugieren, además, que la frecuencia con la cual se presentan en la población infantil mexicana es similar a la observada en otras regiones del mundo. Sin embargo, es necesario determinar la incidencia de éstos virus en las diversas regiones de nuestro país lo cual se logrará con la realización de estudios epidemiológicos prospectivos, que abarquen periodos de tiempo de cuando menos tres años, y con el establecimiento de una vigilancia epidemiológica continúa.

En nuestro país se ha detectado la presencia de los ocho serotipos de AstH establecidos. Sin embargo, queda por determinar cuál es la incidencia de cada uno de ellos, tanto en niños sintomáticos como en asintomáticos, a lo largo del año y en las diferentes regiones de México. Con esto se podría establecer si existe una correlación entre algún(os) serotipo(s) en particular y la diarrea infantil y/o con la severidad de la misma.

En el presente trabajo, se aisló una cepa de AstH de serotipo 8 (Yuc-8) y se obtuvo la secuencia completa de su genoma. En nuestro laboratorio se determinó también, la vía del procesamiento de su poliproteína VP90. Sin embargo, queda mucho por aprender sobre la biología molecular de estos virus. Entre los aspectos importantes por determinar se encuentran el mecanismo de entrada del virus a la célula; la determinación del número y función de las proteínas no estructurales del virus; la caracterización de los procesos de replicación, transcripción y traducción del

genoma viral; la caracterización de la morfogénesis y salida de la célula de los virus maduros.

Estos conocimientos serán importantes para poder eventualmente diseñar medidas de control racionales contra el virus, o manipular su genoma para utilizarlo como vector de expresión específico para el tracto gastrointestinal. Por estas razones, una de las líneas de investigación de nuestro laboratorio está actualmente enfocada a la caracterización molecular de estos virus, utilizando como modelo a la cepa Yuc-8.

BIBLIOGRAFIA

1. **Appleton, H., and P. G. Higgins.** 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*. **1**:1297.
2. **Baer, M. L., F. Houser, L. S. Loesch-Fries, and L. Gehrke.** 1994. Specific RNA binding by amino-terminal peptides of alfalfa mosaic virus coat protein. *EMBO Journal*:727-735.
3. **Bass, D. M., and S. Qiu** 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J Virol*. **74**:1810-4.
4. **Bass, D. M., and U. Upadhyayula.** 1997. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J Virol*. **71**:8666-71.
5. **Bates, P. R., A. S. Bailey, D. J. Wood, D. J. Morris, and J. M. Couriel.** 1993. Comparative epidemiology of rotavirus, subgenus F (types 40 and 41) adenovirus and astrovirus gastroenteritis in children. *J Med Virol*. **39**:224-8.
6. **Belliot, G., H. Laveran, and S. S. Monroe.** 1997a. Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses. *Virus Res*. **49**:49-57.
7. **Belliot, G., H. Laveran, and S. S. Monroe.** 1997. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol*. **142**:1323-34.
8. **Belliot, G., H. Laveran, and S. S. Monroe.** 1997b. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virol*. **51**:101-6.
9. **Bon, F., P. Fascia, M. Dauvergne, D. Tenenbaum, H. Planson, A. M. Petion, P. Pothier, and E. Kohli.** 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol*. **37**:3055-8.
10. **Cruz, J. R., A. V. Bartlett, J. E. Herrmann, P. Caceres, N. R. Blacklow, and F. Cano.** 1992. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol*. **30**:1140-4.
11. **Cubitt, W. D., D. K. Mitchell, M. J. Carter, M. M. Willcocks, and H. Holzel.** 1999. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol*. **57**:313-21.
12. **Cunliffe, N. A., and R. I. Glass.** 1996. Gastrointestinal manifestations of HIV infection. *Lancet*. **348**:1037.
13. **Esahli, H., K. Breback, R. Bennet, A. Ehrnst, M. Eriksson, and K. O. Hedlund.** 1991. Astroviruses as a cause of nosocomial outbreaks of infant diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*. **10**:511-5.
14. **Gaggero, A., M. O'Ryan, J. S. Noel, R. I. Glass, S. S. Monroe, N. Mamani, V. Prado, and L. F. Avendano.** 1998. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. **36**:3691-3.
15. **Geigenmuller, U., H. Nitschko, and S. Schlesinger.** 1993. Deletion analysis of the capsid protein of Sindbis virus: identification of the RNA binding region. *J Virol*. **67**:1620-1626.

16. **Glass, R. I., J. Noel, D. Mitchell, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, L. K. Pickering, P. Dennehy, G. Ruiz-Palacios, M. L. de Guerrero, and S. S. Monroe.** 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol Suppl.* **12**:287-300.
17. **Guerrero, M. L., J. S. Noel, D. K. Mitchell, J. J. Calva, A. L. Morrow, J. Martinez, G. Rosales, F. R. Velazquez, S. S. Monroe, R. I. Glass, L. K. Pickering, and G. M. Ruiz-Palacios.** 1998. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr Infect Dis J.* **17**:723-7.
18. **Guix, S., S. Caballero, C. Villena, R. Bartolomé, C. Latorre, N. Rabella, M. Simó, A. Bosch, and R. M. Pinto.** 2002. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol.* **40**:133-139.
19. **Herrmann, J. E., D. N. Taylor, P. Echeverria, and N. R. Blacklow.** 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med.* **324**:1757-60.
20. **Horwitz, M. S.** 1996. Adenoviruses, p. 2149-2171. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds), *Field's Virology*, vol. 2. Lippincott, Raven, Philadelphia.
21. **Jiang, B., S. S. Monroe, E. V. Koonin, S. E. Stine, and R. I. Glass.** 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:10539-43.
22. **Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, and B. Grinde.** 1998. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *J Gen Virol.* **79**:715-8.
23. **Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, Y. M. Saif, D. R. Snodgrass, H. Ushijima, M. Shimizu, and B. Grinde.** 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol.* **82**:1061-7.
24. **Koopmans, M. P., M. H. Bijen, S. S. Monroe, and J. Vinje.** 1998. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clin Diagn Lab Immunol.* **5**:33-7.
25. **Kurtz, J. B., and T. W. Lee.** 1984. Human astrovirus serotypes. *Lancet.* **2**:1405.
26. **Kurtz, J. B., T. W. Lee, J. W. Craig, and S. E. Reed.** 1979. Astrovirus infection in volunteers. *J Med Virol.* **3**:221-30.
27. **Lee, T. W., and J. B. Kurtz.** 1982. Human astrovirus serotypes. *J Hyg (Lond).* **89**:539-40.
28. **Lee, T. W., and J. B. Kurtz.** 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect.* **112**:187-93.
29. **Lee, T. W., and J. B. Kurtz.** 1981. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *J Gen Virol.* **57**:421-4.
30. **Lew, J. F., C. L. Moe, S. S. Monroe, J. R. Allen, B. M. Harrison, B. D. Forrester, S. E. Stine, P. A. Woods, J. C. Hierholzer, J. E. Herrmann, and et al.** 1991. Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. *J Infect Dis.* **164**:673-8.
31. **Lewis, T. L., H. B. Greenberg, J. E. Herrmann, L. S. Smith, and S. M. Matsui.** 1994. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA,

- identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *J Virol.* **68**:77-83.
32. **Lewis, T. L., and S. M. Matsui.** 1995. An astrovirus frameshift signal induces ribosomal frameshifting in vitro. *Arch Virol.* **140**:1127-35.
33. **Lewis, T. L., and S. M. Matsui.** 1996. Astrovirus ribosomal frameshifting in an infection-transfection transient expression system. *J Virol.* **70**:2869-75.
34. **Lewis, T. L., and S. M. Matsui.** 1997. Studies of the astrovirus signal that induces (-1) ribosomal frameshifting. *Adv Exp Med Biol.* **412**:323-30.
35. **Madeley, C. R., B. P. Cosgrove, E. J. Bell, and e. al** 1977. Stool viruses in babies in Glasgow. *J Hyg [Camb].* **78**:261-73.
36. **Maldonado, Y., M. Cantwell, M. Old, D. Hill, M. L. Sanchez, L. Logan, F. Millan-Velasco, J. L. Valdespino, J. Sepulveda, and S. Matsui.** 1998. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J Infect Dis.* **178**:334-9.
37. **Marczinke, B., A. J. Bloys, T. D. Brown, M. M. Willcocks, M. J. Carter, and I. Brierley.** 1994. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J Virol.* **68**:5588-95.
38. **Matsui, S., and H. B. Greenberg.** 1996. Astroviruses, p. 811-824. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds), *Field's Virology*, vol. 1. Lippincott, Raven, Philadelphia.
39. **Matsui, S. M., D. Kiang, N. Ginzton, T. Chew, and U. Geigenmuller-Gnirke.** 2001. Molecular biology of astroviruses: selected highlights Novartis Found Symp. **238**:219-33; discussion 233-6.
40. **Medina, S. M., M. F. Gutierrez, F. Liprandi, and J. E. Ludert** 2000. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J Clin Microbiol.* **38**:3481-3.
41. **Mitchell, D. K., D. O. Matson, X. Jiang, T. Berke, S. S. Monroe, M. J. Carter, M. M. Willcocks, and L. K. Pickering.** 1999b. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J Infect Dis.* **180**:514-7.
42. **Mitchell, D. K., S. S. Monroe, X. Jiang, D. O. Matson, R. I. Glass, and L. K. Pickering.** 1995. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* **172**:1437-44.
43. **Mitchell, D. K., R. Van, A. L. Morrow, S. S. Monroe, R. I. Glass, and L. K. Pickering.** 1993. Outbreaks of astrovirus gastroenteritis in day care centers. *J Pediatr.* **123**:725-32.
44. **Monceyron, C., B. Grinde, and T. O. Jonassen.** 1997. Molecular characterisation of the 3'-end of the astrovirus genome. *Arch Virol.* **142**:699-706.
45. **Monroe, S. S., B. Jiang, S. E. Stine, M. Koopmans, and R. I. Glass.** 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J Virol.* **67**:3611-4.

46. **Monroe, S. S., S. E. Stine, L. Gorelkin, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, and R. I. Glass.** 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *J Virol.* **65**:641-8.
47. **Mota-Hernández, F., C. Gutiérrez-Camacho, S. Villa-Contreras, J. J. Calva, C. Arias, L. Padilla-Noriega, H. Guiscafré-Gallardo, M. L. Guerrero, S. López, O. Muñoz, J. F. Contreras, R. Cedillo, I. Herrera, and F. Puerto.** 2002. Diarrhea Severity by Different VP4 and VP7 Rotavirus Serptypes. *J Clin Microbiol.* **Submitted**.
48. **Mustafa, H., E. A. Palombo, and R. F. Bishop.** 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol.* **38**:1058-62.
49. **Mustafa, H., E. A. Palombo, and R. F. Bishop.** 1998. Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCO-2 cells. *J Clin Virol.* **11**:103-7.
50. **Naficy, A. B., M. R. Rao, J. L. Holmes, R. Abu-Elyazeed, S. J. Savarino, T. F. Wierzbza, R. W. Frenck, S. S. Monroe, R. I. Glass, and J. D. Clemens.** 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J Infect Dis.* **182**:685-90.
51. **Noel, J., and D. Cubitt.** 1994. Identification of astrovirus serotypes from children treated at the Hospitals for Sick Children, London 1981-93. *Epidemiol Infect.* **113**:153-9.
52. **Noel, J. S., T. W. Lee, J. B. Kurtz, R. I. Glass, and S. S. Monroe** 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol.* **33**:797-801.
53. **Oishi, I., K. Yamazaki, T. Kimoto, Y. Minekawa, E. Utagawa, S. Yamazaki, S. Inouye, G. S. Grohmann, S. S. Monroe, S. E. Stine, and et al.** 1994. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J Infect Dis.* **170**:439-43.
54. **Padilla-Noriega, L., M. Méndez-Toss, G. Menchaca, J. Contreras, P. Romero-Guido, F. Puerto, H. Guiscafré, F. Mota, I. Herrera, R. Cedillo, O. Muñoz, J. Calva, M. L. Guerrero, B. S. Coulson, H. B. Greenberg, S. López, and C. F. Arias.** 1998. Antigenic and Genomic Diversity of Human Rotavirus in Two Consecutive Epidemic Seasons in Mexico. *J Clin Microbiol.* **36**:1688-1692.
55. **Palombo, E. A., and R. F. Bishop.** 1996. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol.* **34**:1750-3.
56. **Pang, X. L., and T. Vesikari.** 1999. Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Acta Paediatr.* **88**:532-6.
57. **Qiao, H., M. Nilsson, E. R. Abreu, K. O. Hedlund, K. Johansen, G. Zaori, and L. Svensson.** 1999. Viral diarrhea in children in Beijing, China. *J Med Virol.* **57**:390-6.
58. **Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, R. F. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner.** 2000. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of viruses:741-746.

59. Saito, K., H. Ushijima, O. Nishio, M. Oseto, H. Motohiro, Y. Ueda, M. Takagi, S. Nakaya, T. Ando, R. Glass, and et al. 1995. Detection of astroviruses from stool samples in Japan using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *Microbiol Immunol.* **39**:825-8.
60. Sakamoto, T., H. Negishi, Q. H. Wang, S. Akihara, B. Kim, S. Nishimura, K. Kaneshi, S. Nakaya, Y. Ueda, K. Sugita, T. Motohiro, T. Nishimura, and H. Ushijima. 2000. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J Med Virol.* **61**:326-31.
61. Sanchez-Fauquier, A., A. L. Carrascosa, J. L. Carrascosa, A. Otero, R. I. Glass, J. A. Lopez, C. San Martin, and J. A. Melero. 1994. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology.* **201**:312-20.
62. Shastri, S., A. M. Doane, J. Gonzales, U. Upadhyayula, and D. M. Bass. 1998. Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol.* **36**:2571-4.
63. Taylor, M. B., F. E. Marx, and W. O. Grabow. 1997. Rotavirus, astrovirus and adenovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in a South African child care centre. *Epidemiol Infect.* **119**:227-30.
64. Taylor, M. B., J. Walter, T. Berke, W. D. Cubitt, D. K. Mitchell, and D. O. Matson. 2001. Characterisation of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. *J Med Virol.* **64**:256-61.
65. Unicomb, L. E., N. N. Banu, T. Azim, A. Islam, P. K. Bardhan, A. S. Faruque, A. Hall, C. L. Moe, J. S. Noel, S. S. Monroe, M. J. Albert, and R. I. Glass. 1998. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J.* **17**:611-4.
66. Walter, J. E., and D. K. Mitchell. 2000. Role of astroviruses in childhood diarrhea. *Curr Opin Pediatr.* **12**:275-9.
67. Walter, J. E., D. K. Mitchell, M. L. Guerrero, T. Berke, D. O. Matson, S. S. Monroe, L. K. Pickering, and G. Ruiz-Palacios. 2001. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. *J Infect Dis.* **183**:681-6.
68. Wang, Q. H., J. Kakizawa, L. Y. Wen, M. Shimizu, O. Nishio, Z. Y. Fang, and H. Ushijima. 2001. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J Med Virol.* **64**:245-55.
69. Willcocks, M. M., N. Ashton, J. B. Kurtz, W. D. Cubitt, and M. J. Carter. 1994. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J Virol.* **68**:6057-8.
70. Willcocks, M. M., A. S. Boxall, and M. J. Carter. 1999. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *J Gen Virol.* **80**:2607-11.
71. Willcocks, M. M., T. D. Brown, C. R. Madeley, and M. J. Carter. 1994. The complete sequence of a human astrovirus. *J Gen Virol.* **75**:1785-8.

72. **Willcocks, M. M., and M. J. Carter.** 1993. Identification and sequence determination of the capsid protein gene of human astrovirus serotype 1. *FEMS Microbiol Lett.* **114**:1-7.
73. **Willcocks, M. M., M. J. Carter, F. R. Laidler, and C. R. Madeley.** 1990. Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. *Arch Virol.* **113**:73-81.
74. **Willcocks, M. M., J. B. Kurtz, T. W. Lee, and M. J. Carter.** 1995. Prevalence of human astrovirus serotype 4: capsid protein sequence and comparison with other strains. *Epidemiol Infect.* **114**:385-91.
75. **Woode, G. N., J. F. Pohlenz, N. K. Gourley, and J. A. Fagerland.** 1984. Astrovirus and Breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. *J. Clin. Microbiol.* **19**:623-630.
76. **Yarus, M.** 1993. An RNA-aminoacid affinity, p. 205-217. *In* R. F. Gesteland, and J. F. Atkins (eds), *The RNA world*, vol. 24. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.