



# Adaptació de la càpsida del virus de l'hepatitis A a colls d'ampolla del seu cicle biològic

M. Isabel Costafreda Salvany

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Departament de Microbiologia**

**Facultat de Biologia**



# **Adaptació de la càpsida del virus de l'hepatitis A a colls d'ampolla del seu cicle biològic**

**Memòria presentada per M. Isabel Costafreda Salvany per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona**

Vist-i-plau dels directors

El doctorand

Rosa M. Pintó Solé i Albert Bosch Navarro

M. Isabel Costafreda Salvany

Programa de doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia



*Per a tu, papa*



# ÍNDEX

<b>ÍNDEX</b>	<b>i</b>
<b>AGRAÏMENTS</b>	<b>vii</b>
<b>ABREVIACIONS</b>	<b>ix</b>

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
-----------------------	----------

1.1.	BREU HISTÒRIA DE L'HEPATITIS A	3
1.2.	CLÍNICA DE L'HEPATITIS A	5
1.3.	EPIDEMIOLOGIA DE L'HEPATITIS A	8
1.4.	VACUNES ANTI-HAV	11
1.5.	CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE L'HAV	14
1.6.	ORGANITZACIÓ GENÒMICA	15
1.7.	ESTRUCTURA DEL VIRIÓ	17
1.8.	ESTRUCTURA I VARIABILITAT ANTIGÈNICA DE L'HAV	18
1.9.	CICLE BIOLÒGIC DE L'HAV	21
	1.9.1. Entrada i interacció amb el/s receptor/s	23
	1.9.2. Desencapsidació	25
	1.9.3. Traducció i replicació genòmica	29
	1.9.4. Processament proteic i ensamblatge de la càpsida	31

---

1.9.5. Sortida del virus fora la cèl·lula	33
1.10. L'HAV REPLICA SEGUINT UNA DINÀMICA DE QUASIESPÈCIES	34
1.11. FETS ÚNICS I DIFERENCIALS DE L'HAV	35

<b>2. OBJECTIUS</b>	<b>43</b>
---------------------	-----------

<b>3. CAPÍTOL 1</b>	<b>47</b>
---------------------	-----------

3.1. ANTECEDENTS	49
3.2. MATERIAL I MÈTODES	53
3.2.1. CÈL·LULES I VIRUS	53
3.2.2. OBTENCIÓ DE FRACCIONS PURIFICADES 150S I 70S DE L'HAV	58
3.2.3. ANÀLISI DE LA CAPACITAT D'HEMAGLUTINACIÓ DEL VIRUS PARENTAL I EL MUTANT G1217D	60
3.2.4. PROVES DE RESISTÈNCIA DEL VIRUS PARENTAL PHM175 43C I DEL MUTANT G1217D AL PH ÀCID, SALS BILIARS I TRIPSINA	62
3.2.5. INOCULACIÓ DE L'HAV EN RATA WISTAR I OBTENCIÓ DE MOSTRES	62
3.2.6. ANÀLISI DE L'ELIMINACIÓ DEL VIRUS EN SANG	64
3.2.7. QUANTIFICACIÓ DEL VIRUS EN MOSTRES DE FETGE I MELSA	69
3.2.8. QUANTIFICACIÓ DEL VIRUS EN MOSTRES DE FEMTA	72
3.2.9. ANÀLISI ESTADÍSTIC	72
3.3. RESULTATS	73
3.3.1. EL VIRUS PARENTAL PHM175 43C S'UNEIX ALS ERITRÒCITS AMB MENYS EFICIÈNCIA QUE EL MUTANT G1217D	73
3.3.2. EL VIRUS PARENTAL PHM175 43C I EL MUTANT G1217D MOSTREN LA MATEIXA RESISTÈNCIA DAVANT DE PH ÀCID, SALS BILIARS I TRIPSINA	74
3.3.3. EL VIRUS PARENTAL PHM175 43C ÉS ELIMINAT MÉS LENTAMENT DE SANG QUE EL MUTANT G1217D	76
3.3.4. EL VIRUS PARENTAL PHM175 43C MOSTRA UNA BIODISTRIBUCIÓ MÉS RÀPIDA CAP A FETGE I COMENÇA A REPLICAR ABANS QUE EL MUTANT G1217D	77
3.3.5. EL VIRUS PARENTAL PHM175 43C DESPLAÇA AL MUTANT G1217D <i>IN VIVO</i>	81
3.4. DISCUSSIÓ	85
3.5. CONCLUSIONS	91

---

**4. CAPÍTOL 2****93**

4.1.	ANTECEDENTS	95
4.2.	MATERIAL I MÈTODES	103
4.2.1.	CÈL·LULES I VIRUS	103
4.2.2.	ANÀLISI DEL RECONeixEMENT DE LES POBLACIONS PELS DIFERENTS MAbS	106
4.2.3.	ANÀLISI DE LES PROPIETATS FÍSiques DE LA CàPSIDA	108
4.2.4.	ANÀLISI DE LA INTERACCIó AMB EL RECEPTOR	109
4.2.5.	ANÀLISI DE LA CINÈTICA DE DESENCAPSIDACIó	109
4.2.6.	ANÀLISI DE LA INFECTIVITAT ESPECÍFICA	111
4.2.7.	ANÀLISI DE LES UNITATS MORFOGÈNIQUES EN LES POBLACIONS VÍRIQUES ADAPTADES I NO ADAPTADES A REPLICAR EN PRESENCIA D'AMD	112
4.2.8.	ANÀLISI DE LA MORFOLOGIA DE LES CALBES	113
4.2.9.	ANÀLISI ESTADÍSTIC	115
4.3.	RESULTATS	117
4.3.1.	LA CAIGUDA I LA RECUPERACIó DE <i>FITNESS</i> QUE PRESENTA L'HAV AL REPLICAR EN CONDICIONS DE SILENCIAMENT PARCIAL DE LA SÍNTESI DE PROTEÏNES CEL·LULARS SÓN DEGUDES A CANVIS EN EL PLEGAMENT DE LA CàPSIDA QUE DETERMINEN LA CAIGUDA I LA RECUPERACIó DE LA INTERACCIó AMB EL RECEPTOR	117
4.3.2.	LA CAIGUDA DE <i>FITNESS</i> QUE PRESENTA L'HAV AL REPLICAR EN CONDICIONS D'ALT SILENCIAMENT DE LA SÍNTESI DE PROTEÏNES CEL·LULARS NO ES DEGUDA A UNA INEFICIENT INICIACIó DEL CICLE REPLICATIU, ENCARA QUE LA RECUPERACIó DE <i>FITNESS</i> VE DONADA PER CANVIS EN EL PLEGAMENT DE LA CàPSIDA QUE DETERMINEN UNA MAJOR EFICIÈNCIA DE DESENCAPSICACIó.	128
4.3.3.	LA REGULACIó FINA DE LA CINÈTICA DE TRADUCCIó VS LA SELECCIó TRADUCCIONAL COM A MECANISMES SUBJACENTS A L'EVOLUCIó GENòMICA PER GARANTIR LA INFECTIVITAT ESPECÍFICA MÉS ALTA EN LES CONDICIONS DE SILENCIAMENT DE LA SÍNTESI PROTEÏCA.	139
4.3.4.	DURANT L'ADAPTACIó A LES CONDICIONS DE SILENCIAMENT DE LA SÍNTESI DE PROTEÏNES CEL·LULARS SE SELECCIONEN POBLACIONS DE CREIXEMENT RÀPID	142
4.4.	DISCUSSIó	145
4.5.	CONCLUSIONS	160



## **5. ANNEX: ARTICLES**

5.1.	ARTICLES DERIVATS DEL TREBALL DE TESI	165
5.2.	ARTICLES RELACIONATS AMB EL TREBALL DE TESI	199

## AGRAÏMENTS

Ara que veig que s'acosta el final d'aquesta tesi és el moment de recordar a totes les persones que directa o indirectament hi han tingut alguna cosa a veure i fer-los-hi arribar la meva gratitud.

En primer lloc vull donar les gràcies a l'Albert i la Rosa per haver-me donat la oportunitat de fer aquesta tesi, per tot el que m'han ensenyat i per haver estat al meu costat quan més ho necessitava.

La meva arribada al laboratori 6 no hauria estat la mateixa sense la Glòria i el Santi, a ells no només els hi vull agrair tot el que hem van ensenyar sinó també l'època genial que vaig passar amb ells. Tampoc hauria esta igual sense la Su, la Cris, el Waled, l'Àngels i la Xantal. Ni sense el Xavi i la Islem, als que encara ara trobo a faltar...

Durant tots aquests anys he vist passar pel laboratori persones curioses com la Ann, persones entranyables com el Daisuke... però la que sempre ha estat, amb la que més he compartit, a la que més he d'agrair, és a la Nena!

També són molts anys de laboratori els que he compartit amb la Nupulu, el Lluís, l'Unai, la Nerea i l'Anna. A tots ells gràcies per la seva ajuda i recolzament. I, per descomptat, gràcies al reducte del laboratori 3, el Franky, la Lucía i la Noe, per la seva ajuda inestimable i el seu suport, no existeixen millors companys que ells...

No hem puc oblidar de tots aquells que han proporcionat la nota festiva en el meu pas pel departament, el Carles, l'Ayalke, l'Òscar, el Quim... en fi, a tots els

habituals de les festes quan jo també n'era una, gràcies per tots els moments divertits. I un gràcies molt especial al Carlos per molt més que diversió.

Durant tots aquests anys m'han acompanyat dues persones que per a mi han estat vitals, la Cristina i el Patxi. Gràcies per escoltar-me, pel suport, pels consells, per una pila d'anys d'amistat.

Vull donar les gràcies també a la M. Jose Prieto, per tenir sempre una paraula d'ànims, a la Sílvia, per ser tan estupenda, i al Rafel, al qui vaig conèixer casualment esperant una PCR al Parc i que es va convertir en una persona important en aquesta aventura que està a punt d'acabar.

Tampoc hem puc deixar a tots els que han format part del pis de Casanoves, la Sil, la Xells, el Jose, el Nacho, el Manu, la María, la Geo i l'Anna. Gràcies per tots els anys fantàstics de convivència.

El Lluís i el Joël també han tingut molt a veure amb aquest treball, a ells els hi dono les gràcies per haver-me fet costat en tot moment, per donar-me forces quan a mi em faltaven i per fer que la meva vida fos molt millor al seu costat.

També vull donar les gràcies a la Isabel per la seva incansable ajuda i a la Maribel per l'empenta i els ànims que m'ha donat en la recta final d'aquesta tesi.

Agrair a la meva mare tot el que va lluitar per a que jo pogués arribar fins aquí i a les meves germanes, el meu cunyat i la meva neboda tot el seu recolzament.

I finalment el meu agraïment més sentit, l'últim encara que el primer que vaig escriure, al meu papi, al "were". No existeixen paraules que hem permetin expressar els meus sentiments de gratitud i estimació vers ell, a ell dec tot el que tinc, tot el que sóc...tot és fruit del seu esforç, el seu treball, les seves mans... Gràcies papa, per que tenir un pare com tu sempre m'ha fet sentir la persona més afortunada i més especial del món.

## ABREVIACIONS

HAV	Virus de l'hepatitis A
NCR	Regió no codificant
MAb	Anticòs monoclonal
ASGPR	Receptor hepatocel·lular asialoglicoproteïc
HAVcr-1	Receptor cel·lular 1 de l'HAV
huHAVcr-1	Receptor cel·lular humà 1 de l'HAV
IRES	Lloc intern d'entrada del ribosoma
RNA	Àcid ribonucleic
tRNA	RNA de transferència
mRNA	RNA missatger
eIF4G	Factor d'iniciació de la traducció cel·lular eucariòtica 4G
INF	Interferó
AMD	Actinomicina D
PV	Poliovirus
FMDV	Virus de la febre aftosa
HRV	Rinovirus humà
FRhK-4	Línia cel·lular contínua de ronyó fetal de mico rhesus

## Abreviacions

---

HepG2	Línia cel·lular contínua de carcinoma de fetge humà
CaCo-2	Línia cel·lular contínua de carcinoma de còlon humà
MEM	Medi essencial mínim
FCS	Sèrum fetal de vedella
NEAA	Aminoàcids no essencials
TCID <sub>50</sub>	Dosi que infecta el 50% dels cultius cel·lulars
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
RT	Retrotranscripció
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
m.o.i	Multiplicitat d'infecció

# **1. INTRODUCCIÓ**



### 1.1. BREU HISTÒRIA DE L'HEPATITIS A

Les primeres referències registrades del que avui coneixem com hepatitis daten del segle V abans de Crist. Durant aquesta època eren conegudes les epidèmies d'icterícia en la regió mediterrània, tal i com descriu Hipòcrates (460-350 a. C.) en els seus tractats mèdics.

La primera referència que es troba d'icterícia epidèmica podria ser la que recull Cleghorn en *Epidemic Diseases of Minorca 1744-1749*<sup>1</sup>, tot i que l'absència d'una definició de la seva etiologia va provocar que, des del segle XVIII fins a finals del XIX, l'hepatitis es relacionés amb una obstrucció mecànica del conducte biliar, en lloc d'associar-se a inflamació i dany hepàtic.

A finals del segle XIX, Heilter i Flindt varen publicar que la icterícia era conseqüència d'una infecció generalitzada que arribava al fetge a través de la sang i que podia tenir lloc tant de forma esporàdica com epidèmica<sup>2</sup>.

També a finals del segle XIX apareixen les primeres descripcions del que en aquell moment s'anomenà hepatitis sèrica<sup>2</sup>.

En el 1923, Blumer<sup>3</sup> va recollir el patró que seguia la icterícia epidèmica a partir de dades obtingudes de 63 brots que van tenir lloc als E.E.U.U. entre els anys 1812 i 1922. En aquesta època, Willcox va relacionar l'origen de la malaltia amb una

---

<sup>1</sup> Cockayne, E.A. 1912. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its correlation to acute yellow atrophy of the liver. *Q.J.M.* 6: 1-29.

<sup>2</sup> Zuckerman, A.J. 1983. The history of viral hepatitis from antiquity to the present. En: *Viral hepatitis: laboratory and clinical science*. Eds: Deinhardt, F. & Deinhardt, J. Marcel Decker. New York, USA. pp 3-32.

<sup>3</sup> Blumer, G. Infectious jaundice in the United States. 1923. *JAMA* 81: 353-358.

---



infecció gastrointestinal que es podia adquirir per aliments i aigua contaminats.

Estudis realitzats amb voluntaris durant i després de la Segona Guerra Mundial van demostrar les diferents etiologies de l'hepatitis sèrica i infecciosa, a més d'establir la naturalesa vírica dels agents infecciosos.

Al 1947, MacCallum va assignar el nom d'hepatitis A a l'hepatitis infecciosa i hepatitis B a la sèrica<sup>4</sup>. A principis de la dècada de 1960, Krugman va confirmar que l'hepatitis sèrica i la infecciosa són entitats clíniques i epidemiològiques diferenciades en demostrar que ambdós tipus d'hepatitis presentaven vies d'infecció i períodes d'incubació diferents i que no presentaven immunitat creuada, doncs podien ser transmeses al mateix pacient<sup>5</sup>. Al 1967, Deinhardt va aconseguir propagar el virus causant de l'hepatitis A en micos titís, fet que li permeté estudiar en detall les alteracions bioquímiques i histopatològiques que es produeixen com a conseqüència de la infecció<sup>6</sup>. Al 1972, Hilleman i el seu equip van aïllar la soca vírica CR326 a partir de mostres de sèrum de pacients amb hepatitis A. A més, van demostrar que aquest virus era l'agent etiològic de l'hepatitis A en comprovar que la infectivitat de la soca CR326 era neutralitzada amb sèrum de convalescents d'hepatitis A<sup>7</sup>. L'any següent, gràcies a la microscopia electrònica de femtes d'individus infectats, Feinstone va ser el primer en identificar les partícules sense embolcall d'uns 28 nm que corresponen als virions del virus de l'hepatitis A (HAV)<sup>8</sup>. Posteriorment, l'estudi del virus purificat a partir del fetge de titís infectats va aportar informació sobre les seves característiques generals<sup>9</sup>. També es van desenvolupar assaigs específics per al diagnòstic<sup>10,11</sup>, els quals van permetre els

---

<sup>4</sup> Hilleman, M.R. 1993. Hepatitis and hepatitis A vaccine: a glimpse of history. *J. Hepatol.* 18: S5-S10.

<sup>5</sup> Bradley, D.W. 1993. The diversity of human hepatitis viruses. *Seminars in Virology* 4: 269-271.

<sup>6</sup> Deinhardt, F., Holmes, A.W., Capps, R.B. & Popper, H. 1967. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmosets monkeys. *Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions.* *J. Exp. Med.* 125:673-688.

<sup>7</sup> Provost, P.J., Ittenson, I.L., Villarejos, V.M., Arguedas, J.A. & Hilleman, M.R. 1973. Etiologic relationship of marmoset-propagated CR326 hepatitis A virus to hepatitis in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142:1257-1267.

<sup>8</sup> Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z. & Purcell, R.H. 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-1028.

<sup>9</sup> Provost, P.J., Wolanski, B.S., Ittenson O.L., McAleer W.J. & Hilleman, M.R. 1975. Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148: 532-539.

<sup>10</sup> Miller, W.J., Provost, P.J., McAleer, W.J., Ittenson O.L., Villarejos, V.M. & Hilleman, M.R. 1975. Specific immune adherence assay for human hepatitis A antibody. Application to diagnostic and epidemiologic investigations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149: 254-261.

<sup>11</sup> Purcell, R.H., Wong, D.C., Moritsugu, Y., Dienstag, J.L., Routenberg, R. & Boggs, J.D. 1976. A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. *J. Immunol.* 116:349-356.

---

estudis seroepidemiològics<sup>12</sup>. Molts d'aquests estudis es van dur a terme amb la soca HM-175 de l'HAV, la qual va ser aïllada a partir d'un brot que va tenir lloc a Melbourne, Austràlia, l'any 1976<sup>13</sup>, i amb les variants d'aquesta soca adaptades a replicar en cultiu cel·lular<sup>14,15</sup>.

L'any 1979, Provost i Hilleman van aconseguir propagar l'HAV *in vitro* en cultius cel·lulars d'explants primaris de fetge de tití i en una línia cel·lular de ronyó fetal de mono rhesus<sup>16</sup>. Aquest avenç va contribuir notablement en el desenvolupament de les vacunes i en la consolidació de línies sòlides de treball per a l'estudi de la biologia del virus.

## 1.2. CLÍNICA DE L'HEPATITIS A

La infecció per l'HAV és particularment freqüent en nens i joves, on en la majoria de casos la malaltia és asimptomàtica. En augmentar l'edat de la persona infectada, la severitat dels símptomes s'incrementa.

En la malaltia causada per l'HAV es poden diferenciar quatre fases: incubació, prodròmica, aguda i convalescència<sup>17</sup>.

La fase d'incubació, té una durada d'entre 15 i 50 dies, amb un promig de 30 dies. Aquest període és asimptomàtic, tot i que hi ha replicació vírica.

La fase prodròmica, durant la qual tenen lloc símptomes de caràcter inespecífic (febre, malestar, anorèxia, cansament, nàusees, vòmits, diarrea i miàlgia), té una durada aproximada d'entre 5 i 7 dies.

---

<sup>12</sup> Hilleman, M.R., Provost, P.J., Miller, W.J., Villarejos, V.M., Ittensohn O.L. & McAleer W.J. 1975. Immune adherence and complement-fixation tests for human hepatitis A. Diagnostic and epidemiologic investigations. International Symposium of Viral Hepatitis, Milan. Dev. Biol. Stand. 30, pp 383-389.

<sup>13</sup> Gust, I.D., Lehmann, N.I., Crowe, S., McCrorie, M., Locarini, S.A. & Lucas, C.R. 1985. The origin of the HM175 strain of hepatitis A virus. J. Infect. Dis. 151: 365-367.

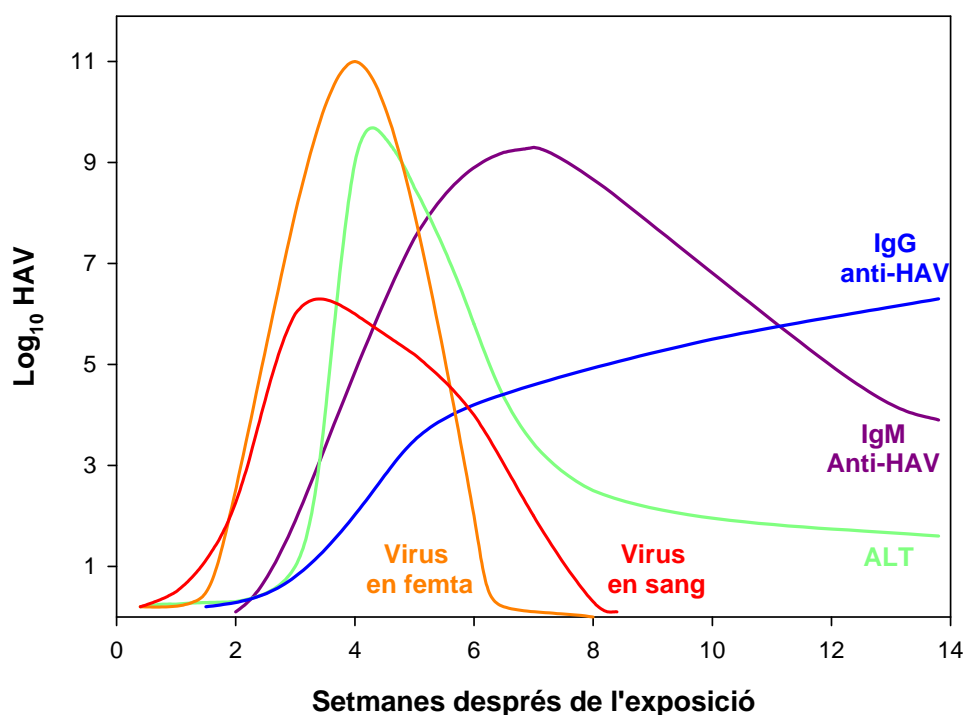
<sup>14</sup> Cromeans, T., Sobsey, M.D. & Fields, H.A. 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. J. Med. Virol. 22: 45-56.

<sup>15</sup> Cohen, J.I., Rosenblum, B., Feinstone, F.M., Ticehurst, J. & Purcell, R.H. 1989. Attenuation and cell culture adaptation of hepatitis A virus (HAV): a genetic analysis with HAV cDNA. J. Virol. 63: 5364-5370.

<sup>16</sup> Provost, P.J. & Hilleman, M.R. 1979. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture *in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160:213-221.

<sup>17</sup> Koff, R.S. 1993. Viral hepatitis. A: Schiff, L., Schiff, E.R., Eds. Diseases of the Liver. Philadelphia: JB Lippincott. pp 492-577.

---



**Fig. 1.2. Representació gràfica de les manifestacions clíniques i bioquímiques i evolució de la resposta immunològica de la infecció amb l'HAV. Extret de Pintó i col·laboradors, 2012<sup>18</sup>.**

La fase aguda es caracteritza per l'aparició d'icterícia i per una orina fosca. La durada d'aquest període és d'entre 4 i 22 dies. Durant aquesta fase hi ha un increment de la bilirubina en sang i orina, arribant a uns nivells de 20-40 mg/l, i també es produeix un augment de les transaminases a sang (500-5000 U/L)<sup>19</sup>. La virèmia acaba poc després del desenvolupament de l'hepatitis, encara que el virus es segueix excretant en femtes 1 o 2 setmanes més. Habitualment el pronòstic és benigne, la infecció no cronifica i s'acaba ressolent. Únicament deriva en hepatitis fulminant en un 0,1% dels casos en menors de 40 anys i en un 7% dels casos en majors de 60 anys<sup>20</sup>. Ocasionalment, es pot produir una necrosi hepàtica durant les primeres 6-8 setmanes, que es manifesta amb febre molt alta, dolor abdominal, vòmits, icterícia i el desenvolupament d'una encefalopatia hepàtica associada a coma. En aquests casos, la mortalitat és del 70-90% dels pacients i està altament correlacionada amb l'edat, essent poc freqüent la supervivència dels pacients amb aquest síndrome de més de 50 anys. A més, la taxa de mortalitat augmenta entre els pacients que presenten hepatitis B o C cròniques o altres problemes hepàtics.

<sup>18</sup> Pintó, R.M., D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, F.J., Costafreda, M.I., Ribes, E., Guix, S. & Bosch, A. 2012. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiol.* 7: 1-15.

<sup>19</sup> Koff, R.S. 1998. Hepatitis A. *The Lancet* 341: 1643-1649.

<sup>20</sup> Crowcroft, N.S., Wash, B., Davidson, K.L. & Gungabissoon, U. 2001. Guidelines for the control of hepatitis A virus infection. *Commun. Dis. Public Health* 41: 213-227.

La fase de convalescència té una durada d'unes quatre setmanes. El desenvolupament més comú de la malaltia és la recuperació i la seroconversió, que ofereix al pacient immunitat de per vida enfront una nova infecció per l'HAV. Algunes vegades poden aparèixer complicacions extrahepàtiques severes com la vasculitis, la crioglobulinèmia, la colestasis o l'artritis<sup>21</sup>. D'altra banda, també es pot donar una hepatitis recurrent, quan, unes setmanes després de la recuperació del pacient, aquest torna a presentar símptomes d'hepatitis i HAV en femtes. El curs d'aquestes hepatitis recurrents és la recuperació i la seroconversió com en el cas d'una hepatitis A de curs normal<sup>19</sup>. La resposta immunològica davant la infecció amb l'HAV és un procés altament efectiu en l'eliminació de la infecció. Tal i com es mostra en la Fig. 1.2, a partir de la segona setmana després de la infecció es detecten els anticossos sèrics neutralitzants de classe IgM, els quals arriben al seu màxim nivell a les 6 setmanes després de la infecció i, més endavant, també se sintetitzen els anticossos sèrics neutralitzants de classe IgA i IgG<sup>22</sup>. Els anticossos IgA, al igual que passa amb els anticossos IgM, assoleixen nivells no detectables transcorreguts 6 mesos des de l'inici dels símptomes. Els anticossos sèrics neutralitzants de classe IgG, comencen a detectar-se a partir de la cinquena setmana postinfecció (Fig. 1.2), adquirint un nivell màxim a les 10 setmanes. Les IgG són els anticossos que confereixen la protecció davant de posteriors infeccions per l'HAV ja que, en principi, persisteixen en sèrum indefinidament. D'altra banda, la destrucció dels hepatòcits infectats està mediada pels limfòcits T citotòxics CD8<sup>+</sup> i per cèl·lules *Natural Killer* (NK) no específiques en un procés estimulat en part per l'INF- $\gamma$ <sup>23</sup>. A més, en ximpanzés infectats amb l'HAV s'ha observat que els limfòcits T CD4<sup>+</sup> tenen també un paper predominant en el control de l'hepatitis aguda<sup>24</sup>. L'acció dels limfòcits és precisament el que provoca la necrosi hepatocel·lular pròpia de la infecció aguda per l'HAV. Tal i com s'explica més endavant, l'HAV presenta una baixa síntesi proteica durant el seu cicle replicatiu, fet que podria aportar-li un avantatge a nivell de resposta cel·lular, evitant les defenses de la cèl·lula hoste. De fet, s'ha demostrat que les soques no citopatogèniques de l'HAV no indueixen apoptosi ni síntesi de INF- $\beta$ , probablement gràcies a la baixa eficiència de replicació i, per tant, a la baixa concentració d'intermediaris d'RNA de doble cadena deguda a

---

<sup>21</sup> Bader, T.F. 1995. Viral Hepatitis. Seattle: Hogrefe and Humber Publishers. pp 248.

<sup>22</sup> Lemon, S.M. & Binn, L.N. 1983. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. J. Infect. Dis. 148:1033-1039.

<sup>23</sup> Siegl, G. & Lemon, S.M. 1990. Recent advancement in hepatitis A vaccine development. Virus Res. 17: 75-92.

<sup>24</sup> Zhou, Y., Callendret, B., Xu, D., Brasky, K.M., Feng, Z., Hensley, L.L., Guedj, J., Perelson, A.S., Lemon, S.M., Landford, R.E. & Walker, C.M. 2012. Dominance of the CD4<sup>+</sup> T helper cell response during acute resolving hepatitis A virus infection. J. Exp. Med. 209: 1481-1492.

---

aquesta baixa taxa de traducció<sup>25</sup>. Si fos així, la baixa eficiència de replicació de l'HAV permetria explicar l'elevada infectivitat específica d'aquest virus en comparació amb altres picornavirus, els qual presenten infectivitats específiques més baixes degudes en part a cicles infecciosos avortats per les defenses antivíriques de la cèl·lula hoste<sup>26</sup>.

La lenta velocitat de traducció i la baixa taxa de replicació que se'n deriva podrien explicar les grans diferències de títol en femtes respecte altres virus entèrics ( $10^{11}$  genomes/g en pacients amb hepatitis A<sup>27</sup>, molt inferiors als més de  $10^{13}$  genomes/g que es poden detectar amb altres virus entèrics<sup>28, 29</sup>).

### 1.3. EPIDEMIOLOGIA DE L'HEPATITIS A

L'hepatitis A és l'hepatitis més freqüent arreu del món<sup>30</sup>. S'estima que cada any hi ha entre 125.000 i 200.000 casos als Estats Units, dels quals entre un 11% i un 22% necessiten hospitalització i al voltant de 100 persones moren per una hepatitis fulminant. Els patrons de distribució de l'hepatitis A en les diferents àrees geogràfiques (Fig.1.3.A) estan altament correlacionats amb el seu desenvolupament socioeconòmic<sup>30</sup>.

Els països amb deficients o baixes condicions sanitàries presenten un nivell de seroprevalença al voltant del 100%, doncs l'hepatitis A és hiperendèmica i gairebé tots els nens són infectats pel virus abans dels 10 anys<sup>31</sup>. Això contrasta amb les societats industrialitzades on, degut a la millora de les condicions higièniques, hi ha hagut una reducció de la prevalença d'anticossos contra l'HAV (Fig.1.3.A).

---

<sup>25</sup> Brack, K., Berk, I., Magulski, T., Lederer, J., Dotzauer, A. & Vallbracht, A. 2002. Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. *J. Virol.* 76: 11920-11930.

<sup>26</sup> Mueller, S., Papamichail, D., Coleman, J.R., Skiena, S., & Wimmer, E. 2006. Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J. Virol.* 80: 9687-9696.

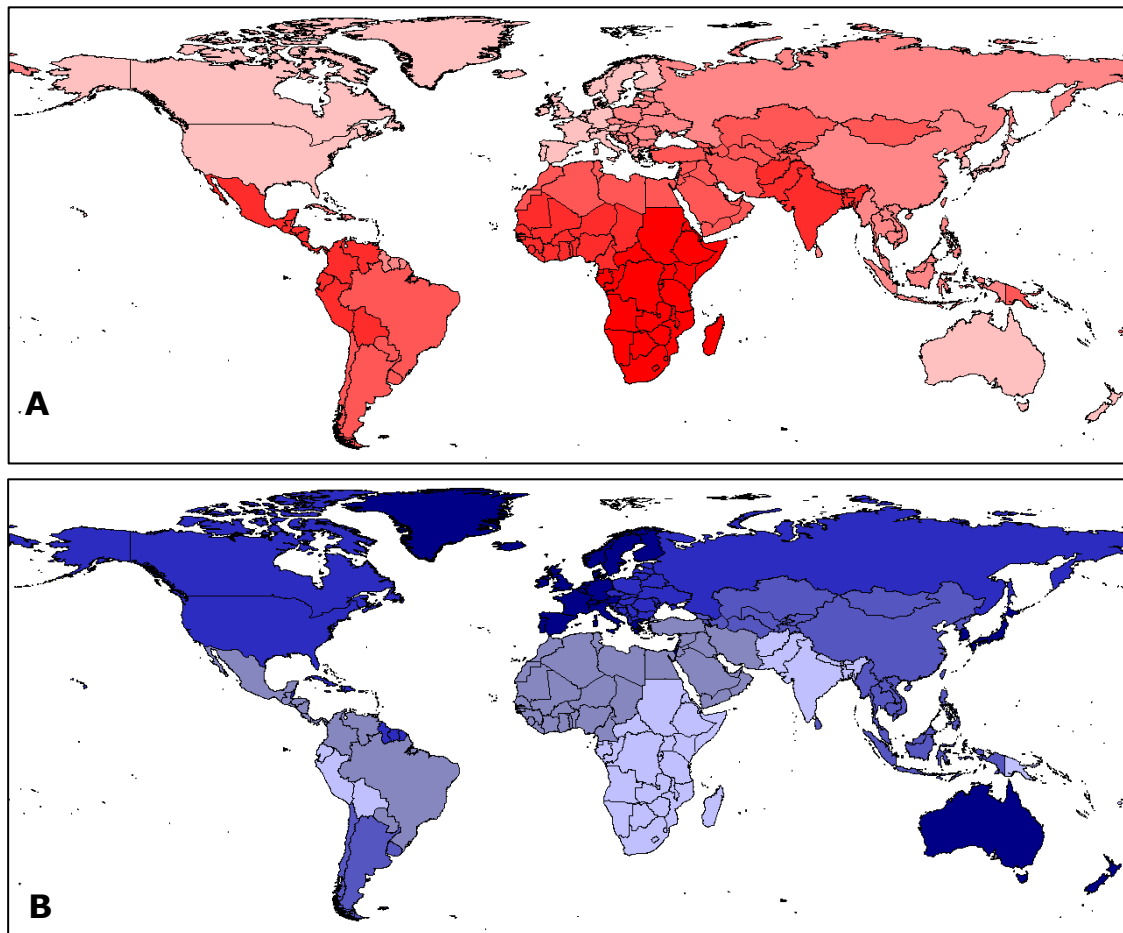
<sup>27</sup> Costafreda, M.I., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2006. Development, evaluation and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3846-3855.

<sup>28</sup> Caballero, S., Guix, S., El-Senousy, W.M., Calicó, I., Pintó, R.M. & Bosch, A. 2003. Persistent gastroenteritis in astrovirus infected children: association with serotype-3 strains. *J. Med. Virol.* 71: 245-250.

<sup>29</sup> Chan, M.V.W., Sung, J.J.Y., Lam, R.K.Y., Chan, P.K.S., Lee, N.L.S., Lai, R.W.M. & Leung, W.K. 2006. Fecal viral load and Norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1278-1280.

<sup>30</sup> Hollinger, F. B. & Emerson, S. U. 2007. Hepatitis A. A: *Fields Virology*, 5th Ed. Eds: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B. & Straus, S. E. Lippincott Williams & Wilkins. pp 911-947.

<sup>31</sup> Das, K., Jain, A., Gupta, S., Kapoor, S., Gupta, R.K., Chakravorty, A & Kar, P. 2000. The changing epidemiological pattern of hepatitis A virus in a urban population of India: Emergence of a trend similar to the European countries. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 507-510.



**Fig. 1.3. Distribució geogràfica de la incidència de les infeccions causades per l'HAV. (A) Nivells d'immunitat en infants: les regions en les que la infecció és endèmica es mostren en vermell mentre que les regions no endèmiques apareixen calorejades en rosa pàlid. (B) Nivells de susceptibilitat en adults: com més intens és el blau més alta és la població d'adults susceptible a la infecció causada per l'HAV. Extret de WHO/IVB/10.01<sup>32</sup>.**

Al territori espanyol el nombre de casos d'hepatitis A ha anat disminuint considerablement els últims anys, deixant de ser un país endèmic per aquesta malaltia. A Suècia només el 2% de la població menor de 55 anys té anticossos contra l'HAV<sup>33</sup> i, en el cas concret de Catalunya, la població amb menys de 40 anys presenta una prevalença d'anticossos anti-HAV de menys del 50%<sup>34</sup>. El fet que la població adulta no es trobi immunoprotegida contra l'HAV, fa que el nombre de brots en persones adultes incrementi<sup>30</sup>. Les persones adultes no immunoprotegides són susceptibles a patir la malaltia si viatgen a països on l'hepatitis A és endèmica, constituint així una via d'entrada d'HAV<sup>35</sup>.

<sup>32</sup> WHO/IVB/10.01. The global prevalence of hepatitis A virus infection and susceptibility: a systematic review. Immunization, vaccines and biological.

<sup>33</sup> Bottiger, M., Christenson, B. & Grillner L. 1997. Hepatitis A immunity in Swedish population: a study of seroprevalence of markers in the Swedish population. Scand. J. Infect. Dis. 29: 99-102.

<sup>34</sup> Oviedo, M., Muñoz, M.P., Domínguez, A. & Carmona, G. 2006. Estimated Incidence of hepatitis A virus infection in Catalonia. Ann. Epidem. 16: 812-819.

<sup>35</sup> Pintó, R.M., Alegre, D., Domínguez, A., El-Senousy, W.M., Sánchez, G., Villena, C., Costafreda, M.I., Aragonés, L. & Bosch, A. 2007. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. Epidemiol. Infect. 135: 270-273.

Una altra possible entrada de l'HAV en zones de prevalença baixa és a través del consum d'aliments procedents de països on l'hepatitis A és endèmica<sup>36,37,38</sup>.

Tenint en compte aquestes diverses vies d'entrada del virus i la gravetat de la malaltia en persones d'edat avançada, s'ha reflexionat sobre la idoneïtat d'incloure la vacuna anti-HAV<sup>39</sup> dins el calendari vacunal. En el cas de Catalunya, l'any 1999 es va iniciar un programa de vacunació massiva amb una combinació de vacunes anti-HAV i anti-HBV en pre-adolescents<sup>40</sup>. Com a conseqüència d'aquest programa de vacunació, s'ha experimentat una reducció de la incidència d'hepatitis A en la població catalana de 5,51/100.000 persones i any durant el període 1992-1998 a 2,98/100.000 persones i any durant el període 1999-2005<sup>41</sup>. En el cas concret de Barcelona, també s'experimentà una reducció del percentatge de detecció d'HAV en aigües residuals<sup>35</sup>. Programes de vacunació anti-HAV similars als de Catalunya també s'han dut a terme a Israel<sup>42</sup>, alguns estats dels EUA i la regió de la Puglia italiana<sup>43</sup>, mentre que en altres països s'ha contemplat la possibilitat d'introduir-la, com és el cas del Canadà<sup>44</sup>. Altres estratègies adoptades han estat la vacunació de grups de risc, com és el cas dels indis americans<sup>45</sup>, els aborígens de Queensland<sup>46</sup> o individus que viatgen a països de risc<sup>47</sup>. Tots els programes de vacunació han vingut acompanyats d'una reducció de la incidència de la malaltia.

---

<sup>36</sup> Bosch, A., Abad, F.X., Gajardo, R. & Pintó, R.M. 1994. Should shellfish be purified before public consumption? *The Lancet* 344: 1024-1025.

<sup>37</sup> Sánchez, G., Pintó, R.M., Vanaclocha, H. & Bosch, A. 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J Clin Microbiol* 40: 4148-4155.

<sup>38</sup> Pintó, R.M., Costafreda, M.I. & Bosch, A. 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7350-7355.

<sup>39</sup> Westblom, I.V., Gudipoti, S., De Rowse, B.R., Madkiff, B.R & Belshoe, R.B. 1994. Safety and immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine: effect dose and vaccination schedule. *J. Infect. Dis.* 169: 996-1001.

<sup>40</sup> Domínguez, A., Salleras, L., Carmona, G. & Batalla, J. 2003. Effectiveness of a program of mass hepatitis A vaccination in preadolescents. *Vaccine* 21: 698-701.

<sup>41</sup> Domínguez, A., Oviedo, M., Carmona, G., Batalla, J., Bruguera, M., Salleras, L. & Plascencia A. 2008. Impact and effectiveness of a mass vaccination programme of preadolescents seven years after introduction. *Vaccine* 26: 1737-1741.

<sup>42</sup> Chodick, G., Green, M.S., Heymann, A.D., Rosenmann, L. & Shalev, V. 2007. The shifting epidemiology of hepatitis A following routine childhood immunisation program in Israel. *Prev. Med.* 45: 386-391.

<sup>43</sup> Wasley, A., Fiore, A. & Bell, B.P. 2006. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol. Rev.* 28: 101-111.

<sup>44</sup> Bauch, C.T., Rao, A.R., Pham, B.Z., Krahn, M., Gilea, V., Duval, B., Chen, M.H. & Tricco, A.C. 2007. A dynamic model for assessing universal hepatitis A vaccination in Canada. *Vaccine* 25: 1719-1726.

<sup>45</sup> Bialek, S.R., Thoroughman, D.A. & Hu, D. 2004. Hepatitis A incidence and hepatitis A vaccination among American Indians and Alaska natives. *Am. J. Public Health* 94: 996-1001.

<sup>46</sup> Hanna, J.N., Hills, S.L. & Humphreys, J.L. 2004. Impact of hepatitis A vaccination of indigenous children on notifications of hepatitis A in north Queensland. *Med. J. Aus.* 181: 482-485.

<sup>47</sup> Sonder, G., Bovee, L., Baayen, T., Coutinho, R. & van den Hoek, J. 2006. Effectiveness of hepatitis A vaccination program for migrant children in Amsterdam, The Netherlands (1992-2004). *Vaccine* 24: 4962-4968.

---

Aquesta reducció també s'ha experimentat en regions on no s'ha dut a terme cap programa de vacunació com és el cas del País Basc<sup>48</sup>. Això ens suggereix que són necessaris estudis més extensos per tal de conèixer quin percentatge de la reducció de la incidència és deguda a la vacunació i quin percentatge es deu a la millora de les condicions higièniques.

En qualsevol cas sembla ser que la tendència general és la d'anar incrementant la població a la que s'hauria de vacunar, com en el cas d'Espanya, on recentment s'ha passat d'aconsejar només la vacunació a la població de Ceuta i Melilla<sup>49</sup>, a incloure també els grups de risc<sup>50</sup>.

#### 1.4. VACUNES ANTI-HAV

Actualment existeixen en el mercat quatre vacunes de diferents formulacions, totes elles basades en virus inactivats: HAVRIX<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline) està basada en la soca HM175<sup>51</sup>, VAQTA<sup>®</sup> (Merck) en la soca CR326<sup>52</sup>, AVAXIM<sup>®</sup> (Aventis Pasteur) en la soca GBM<sup>53</sup> i EPAXAL<sup>®</sup> (Berna Biotech.) en la soca RG-SB incorporada en un virosoma format per fosfolípids i glicoproteïnes del virus de la grip<sup>54</sup>. A més, també existeix la vacuna TWINRIX<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline), la qual combina HAVRIX<sup>®</sup> i la vacuna d'antigen recombinant del virus de l'hepatitis B. Amb totes les vacunes s'ha observat una eficiència de protecció superior al 94%<sup>51,54,55</sup>.

---

<sup>48</sup> Chilla, C., Pérez-Trallero, E., Artiella, J., Serrano-Bergoechea, E., Montes, M. & Vicente, D. 2007. Marked decrease in the incidence and prevalence of hepatitis A in the Basque country, Spain, 1986-2004. *Epidemiol. Infect.* 135: 402-408.

<sup>49</sup> Bernaola Iturbe, E., Giménez Sánchez, F., Baca Cots, M., de Juan Martín, F., Díez Domingo, J., Garcés Sánchez, M., Gómez-Campderá, A., Martínón Torres, F., Picazo, J.J. & Pineda Solás, V. 2007. Vaccination schedule of the Spanish Association of Pediatrics: recommendations 2007. *Ann. Pediatr.* 66: 62-69.

<sup>50</sup> Bernaola Iturbe, E., Giménez Sánchez, F., Baca Cots, M., de Juan Martín, F., Díez Domingo, J., Garcés Sánchez, M., Gómez-Campderá, A., Martínón Torres, F., Picazo, J.J. & Pineda Solás, V. 2008. Immunization schedule of the Spanish Association of Pediatrics: recommendations 2008. *Ann. Pediatr.* 68: 63-69.

<sup>51</sup> Ashur, Y., Adler, R., Rowe, M. & Shouval, D. 1990. Comparison of immunogenicity of two hepatitis A vaccines -VAQTA and HAVRIX- in young adults. *Vaccine* 74: 2290-2296.

<sup>52</sup> Ashur, Y., Adler, R., Rowe, M. & Shouval, D. 1990. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol. Rev.* 28: 101-111.

<sup>53</sup> Castillo de Febres, O., Chacon de Petrola, M., Casanova de Escalaona, L., Naveda, O., Naveda, M., Estopinan, M. Bordonos, G., Zambrano, B., Garcia, A. & Dumas, R. 1999. Safety, immunogenicity and antibody persistence of an inactivated hepatitis A vaccine in 14-15 year old children. *Vaccine* 18: 656-664.

<sup>54</sup> Ambrosch, F., Wiedermann, G., Jonas, S., Althaus, B., Finkel, B., Glück, R. & Herzog, R. 1997. Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine. *Vaccine* 15: 1209-1213.

<sup>55</sup> Bauch, C.T., Rao, A.R., Pham, B.Z., Krahn, M., Gilea, V., Duval, B., Chen, M.H. & Tricco, A.C. 2007. A dynamic model for assessing universal hepatitis A vaccination in Canada. *Vaccine* 25: 1719-1726.

---



El problema de les vacunes és el seu elevat cost de producció, que ronda els 60\$ per cada una de les dues dosis a administrar. Aquests costos són en gran part causats per la baixa producció de l'HAV en cultiu cel·lular<sup>56</sup>. Tanmateix, caldria que el cost de la vacuna fos inferior als 7\$ o que la incidència d'hepatitis A superés els 40/100.000 persones i any, per a què la vacunació universal fos econòmicament efectiva<sup>57</sup>.

D'altra banda, estudis de cost-eficàcia de la vacunació a grups de risc sí resulten econòmicament viables amb els paràmetres actuals<sup>58,59</sup>, i el mateix passa en regions on la incidència de l'hepatitis A és alta<sup>60,61</sup>.

A més de les quatre vacunes esmentades anteriorment, existeix una vacuna viva atenuada basada en la soca H2 de l'HAV<sup>62</sup> (Pukang Biotechnological Co.), la qual dóna una protecció aproximada del 95% amb una sola dosis si és administrada per via parenteral. L'ús d'aquesta vacuna només ha estat aprovat a la Xina, el país de fabricació. No obstant, gràcies a les característiques de dosi única i cost inferior a les vacunes inactivades i, tenint en compte els resultats epidemiològics observats a la Xina, s'ha pensat en la possibilitat d'utilitzar aquesta vacuna a la Índia<sup>63</sup>.

L'opció d'utilitzar pèptids sintètics en la fabricació de vacunes anti-HAV és complicada degut al caràcter conformacional de la majora d'epítops<sup>64</sup>. Tot i això

---

<sup>56</sup> Lemon, S.M. 1985. Type A viral hepatitis. New developments in an old disease. *New Eng. J. Med.* 313: 1059-1067.

<sup>57</sup> O'Connor, J.B., Imperiale, T.F. & Singer, M.E. 1999. Cost-effectiveness analysis of hepatitis A vaccination strategies for adults. *Hepatology* 30: 1077-1081.

<sup>58</sup> Bayas, J.M., González, A., Vilella, A., San-Martín, M., Bertran, M.J. & Adell, C. 2001. Cost analysis of two strategies for preventing hepatitis A virus infection in Spanish travellers to developing countries. *Epidemiol. Infect.* 127: 347-351.

<sup>59</sup> Rein, D.B., Hicks, K.A., Wirth, K.E., Billah, K., Finelli, L., Fiore, A.E., Hoerger, T.J., Bell, B.P. & Armstrong, G.L. 2007. Cost-effectiveness of routine childhood vaccination for hepatitis A. *Pediatrics* 119: 12-21.

<sup>60</sup> Valenzuela, M.T., Jacobs, R.J., Arteaga, O., Navarrete, M.S., Meyerhoff, A.S. & Innis, B.L. 2005. Cost-effectiveness of universal childhood hepatitis A vaccination in Chile. *Vaccine* 23: 4110-4119.

<sup>61</sup> Lopez, E., Derbag, R., Coudeville, L., Baron-Papillon, F., Armoni, J. 2007. The cost-effectiveness of universal vaccination of children against hepatitis A in Argentina: results of a dynamic health-economic analysis. *J. Gastroenterol.* 42: 152-160.

<sup>62</sup> Mao, J.S., Dong, D.X., Zheng, H.Y., Chen, N.L., Zhang, X.Y., Huang, X.Y., Xie, R.Y., Zhou, T.J., Wan, A.J. & Wang, Y.Z. 1989. Primary study of attenuated live hepatitis A vaccine (H2 strain) in humans. *J. Infect. Dis.* 159: 621-624.

<sup>63</sup> Bhave, S., Barduar, A., Madan, Z., Jha, R., Bhura, S., Chaudhari, J. & Pandit, A. 2006. Evaluation of immunogenicity and tolerability of a live attenuated vaccine in Indian children. *Indian Pediatrics* 43: 983-987.

<sup>64</sup> D'Hondt, E. 1992. Possible approaches to develop vaccines against hepatitis A. *vaccine* 10: S48.

---

s'han pogut obtenir pèptids sintètics immunogènics de 2 epítops continus<sup>65</sup>, epítops capaços d'induir la síntesi d'anticossos neutralitzants de la infectivitat vírica *in vitro*. Tanmateix no s'ha comprovat la seva eficàcia *in vivo*.

Una diferent aproximació és la d'expressar els gens de les subunitats de la càpsida en sistemes d'expressió heteròlegs, ja sigui en *Escherichia coli*<sup>66,67</sup>, o en baculovirus<sup>68</sup>, però es necessiten grans quantitats d'antigen per tal de produir una lleu resposta immune. S'ha provat també d'expressar càpsides buides (Virus-Like-Particles) en sistemes d'expressió heteròlegs com *Escherichia coli*<sup>69</sup>, baculovirus<sup>70</sup> i mitjançant l'ús de vectors derivats dels virus vaccínia<sup>71</sup>, però la producció és baixa en tots els casos. En el cas de l'ús de vectors derivats de Vaccínia, la majoria d'antigen es produeix en forma de pentàmers (subunitat amb coeficient de sedimentació 14S), que no conserven les característiques immunològiques de la càpsida sencera.

Finalment, també s'ha provat d'utilitzar virus vius quimera, portadors d'antígens d'HAV. En aquest sentit s'han construït dos sistemes: un utilitzant poliovirus i l'altre amb el virus vaccínia. El primer sistema no va proporcionar una resposta antigènica satisfactòria en animals<sup>72</sup>. En canvi, l'ús del virus vaccínia recombinant portador dels antígens d'HAV sí que va donar lloc a una resposta immunològica protectora enfront l'HAV en micos tamarins<sup>73</sup>. No obstant, l'ús del virus vaccínia és perillós si

---

<sup>65</sup> Pintó, R.M., González-Dankaart, J.F., Sánchez, G., Guix, S., Gómara, M.J., García, M., Haro, I. & Bosch, A. 1998. Enhancement of the immunogenicity of a synthetic peptide bearing a VP3 epitope of hepatitis A. *FEBS Lett.* 438: 106-110.

<sup>66</sup> Powdrill, T.F. & Johnston, J.M. 1991. Immunologic priming with recombinant hepatitis A virus capsid proteins produced in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 65: 2686-2690.

<sup>67</sup> Johnston, J.M., Harmon, S.A., Binn, L.N., Richards, O.C., Ehrenfeld, E. & Summers, D.F. 1988. Antigenic and immunogenic properties of a hepatitis A virus capsid protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Infec. Dis.* 157: 1203-1211.

<sup>68</sup> Harmon, S.A., Johnston, J.M., Ziegelhoffer, T., Richards, O.C., Summers, D.F. & Ehrenfeld, E. 1988. Expression of hepatitis A virus capsid sequences in insect cells. *Virus Res.* 10: 273-280.

<sup>69</sup> Sánchez, G., Caballero, S., Guix, S., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2003. Antigenic hepatitis A virus structures may be produced in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1840-1843.

<sup>70</sup> Rosen, E., Stapleton, J.T. & McLinden, J. 1993. Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. *Vaccine* 11: 706-712.

<sup>71</sup> Winokur, P.L., McLinden, J.H. & Stapleton, J.T. 1991. The hepatitis A virus polyprotein expressed by a recombinant vaccinia virus undergoes proteolytic processing and assembly into virus-like particles. *J. Virol.* 65: 5029-5036.

<sup>72</sup> Lemon, S.M., Barclay, W., Ferguson, M., Murphy, P., Wood, D., Katrak, K., Sangar, D. & Minor, P.D. 1992. Immunogenicity and antigenicity of chimeric Picornaviruses which express hepatitis A virus (HAV) peptide sequences: evidence for a neutralization domain near the amino terminus of VP1 of HAV. *Virology* 188: 285-295.

<sup>73</sup> Karayiannis, P., O'Rourke, S., McGarvey, M.J., Luther, S., Waters, J., Goldin, R. & Thomas, H.C. 1991. A recombinant vaccinia virus expressing hepatitis A virus structural polypeptides: characterization and demonstration of protective immunogenicity. *J. Gen. Virol.* 72: 2167-2172.

---

s'administra a persones immunodeprimides i, a més, es desconeix l'eficàcia d'aquesta vacuna en individus seropositius contra el virus vaccinia. Tenint en compte totes aquestes aproximacions realitzades i els resultats obtinguts, sembla que el futur desenvolupament d'una vacuna més econòmica i més segura passa per l'optimització de la producció de VPLs en sistemes d'expressió heteròlegs o per un increment de la producció del virus en cultiu cel·lular.

### 1.5. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE L'HAV

Tal i com va ser descrit inicialment per Feinstone<sup>8</sup>, l'HAV és un virus nu, d'estructura icosaèdrica i una mida d'entre 27 i 32 nm. La seva càpsida està formada per 60 còpies de les proteïnes víriques, VP2, VP3 i VP1 i, a diferència de la resta de picornavirus, la proteïna VP4 no s'ha trobat en la càpsida dels virions madurs<sup>74</sup>, possiblement per que és molt petita. Una de les principals característiques de l'HAV és l'elevada resistència que aquesta càpsida li proporciona a condicions extremes de pH<sup>75</sup> i temperatura<sup>30,76</sup>.

Com el de la resta de membres de la família *Picornaviridae*, el genoma de l'HAV és un RNA de cadena senzilla i polaritat positiva, amb un coeficient de sedimentació de 33S i una densitat de 1,64 g/cm<sup>3</sup><sup>77,78</sup> i una longitud de 7.4 Kb.

Inicialment es va classificar com a *Enterovirus 72*, dins la família *Picornaviridae*, però degut a les moltes característiques que el distingeixen de la resta de picornavirus, posteriorment es va classificar dins un nou gènere, *Hepatovirus*<sup>79</sup>. Actualment, tot i haver-se descrit nous virus, l'HAV segueix sent un virus que presenta, com es veure més endavant, unes característiques úniques dins la família i que el defineixen com a membre tipus del gènere *Hepatovirus*.

---

<sup>74</sup> Lemon, S.M. & Robertson, B.H. 1993. Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Seminars in Virology* 4: 285-295.

<sup>75</sup> Sholz, E., Heinring, U. & Flehmig, B. 1989. Acid Stability of hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.* 70:2481-2485.

<sup>76</sup> Parry, J.V. & Mortimer P.P. 1984. The heat sensitivity of hepatitis A virus determined by a single tissue culture method. *J. Med. Virol.* 14: 277-283.

<sup>77</sup> Coulepis, A.G., Tannock, G.A., Locarini, S.A. & Gust, I.D. 1981. Evidence that the genome of hepatitis A virus consists of single-stranded RNA. *J. Virol.* 37: 473-477.

<sup>78</sup> Siegl, G., Frösner, G.G., Gauss-Müller, V., Tratschin, J.D. & Deinhardt, F. 1981. The physicochemical properties of infectious hepatitis A virions. *J. Gen. Virol.* 57: 331-341.

<sup>79</sup> van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., Mc Geoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. Eds. 2000. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Academic Press.

---

## 1.6. ORGANITZACIÓ GENÒMICA

L'HAV presenta una organització genòmica molt similar a la de la resta de membres de la família *Picornaviridae*<sup>74</sup>. El seu àcid nucleic, d'una mida aproximada de 7.4 Kb, compren dues regions 5' i 3' no codificants, la regió P1 que codifica per les proteïnes estructurals VP0, VP3 i VP1 i les regions P2 i P3 que codifiquen per proteïnes no estructurals (Fig. 1.6).

La regió 5' no codificant (5' NCR) representa aproximadament el 10% del genoma i està formada per uns 700 nucleòtids situats a l'extrem 5' del genoma. Al extrem 5' terminal d'aquesta regió es troba unida la proteïna vírica VPg. Tot i ser la regió més conservada del genoma, presenta una regió variable rica en pirimidines i conté l'IRES (lloc d'entrada del ribosoma), regió que és reconeguda pel ribosoma i altres factors cel·lulars per a iniciar la traducció a partir d'un dels dos codons d'inici, normalment el segon<sup>80</sup>. La regió 5' no codificant sembla estar relacionada, juntament amb altres regions, amb la adaptació del virus a cultiu cel·lular i amb capacitat de virulència<sup>81</sup>.

La regió codificant presenta una única pauta oberta de lectura que codifica per una poliproteïna de 2.227 aminoàcids en el cas de la soca tipus HM175. Aquesta poliproteïna, formada per les regions P1, P2 i P3, és processada donant lloc a les proteïnes víriques madures. Aquest processament proteolític s'inicia amb el tall entre la regió 2A i la regió 2B que realitza en *cis* la proteasa 3C, codificada a la regió P3, i que separa P1-2A de P2-P3. A continuació, aquesta proteasa 3C efectua, en *trans*, la resta de talls de la poliproteïna (Fig. 1.6), excepte el tall entre VP1 i 2A i el tall de VP0 en VP2 i VP4. S'ha postulat que el tall entre VP1 i 2A té lloc degut a l'acció de proteases cel·lulars<sup>82,83</sup>. En canvi, el tall de VP0 es creu que podria ser degut a un processament autocatalític o bé per l'efecte del pH<sup>84</sup>.

La regió P1 codifica per les proteïnes estructurals VP4, VP2, VP3 i VP1. A diferència

<sup>80</sup> Tesar, M., Harmon, S.A., Summers, D.F. & Ehrenfeld, E. 1992. Hepatitis A virus polyprotein synthesis initiated from two alternatives AUG codons. *Virology* 186: 609-618.

<sup>81</sup> Brown, E.A., Day, S.P., Jansen, R.W. & Lemon, S.L. 1991. The 5' nontranslated region of hepatitis A virus: secondary structure and elements required for translation *in vitro*. *J. Virol.* 65:5828-5838.

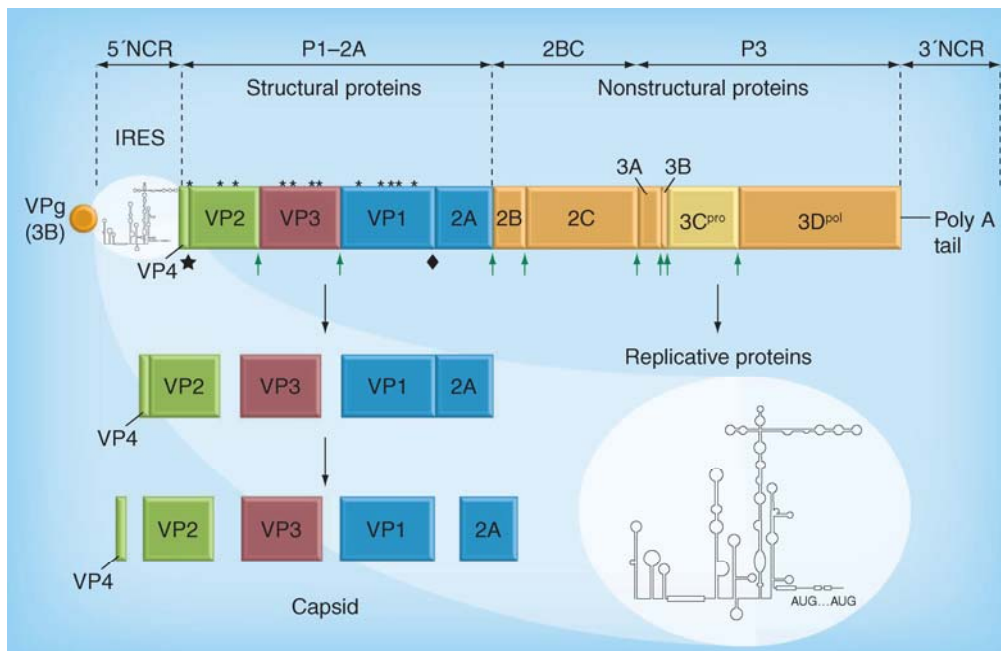
<sup>82</sup> Graff, J., Richards, O.C., Swiderek, K.M., Davies, M.T., Rusnak, F., Harmon, S.A., Jia, X.Y., Summers, D.F. & Ehrenfeld, E. 1997. Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogeneous terminus. *J. Virol.* 73: 6015-6023.

<sup>83</sup> Martin, A., Bénichou, D., Chao, S.F., Cohen, L.M. & Lemon, S.L. 1999. Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3C<sup>pro</sup> proteinase. *J. Virol.* 73: 6220-6227.

<sup>84</sup> Bishop, N.E. 1999. Effect of low pH on the hepatitis A virus maturation cleavage. *Acta Virol.* 43: 291-296.

de la resta de picornavirus, la regió VP4 de l'HAV no està miristilada<sup>85</sup> i, tot i no trobar-se en els virions madurs, és necessària per a la formació de la càpsida<sup>86</sup>.

La regió P2 comprèn les regions 2A, 2B i 2C. La regió 2A no té activitat proteàsica, tret diferencial respecte altres picornavirus, sinó que té una funció estructural, essent necessària per a la formació del pentàmer<sup>86</sup>. Pel que fa a les regions 2B i 2C, s'ha vist que aquestes són importants per l'adaptació del virus a la replicació en cultiu cel·lular<sup>87</sup>.



**Fig. 1.6. Organització genòmica i processament de la poliproteïna de l'HAV. Extret de Pintó i col·laboradors, 2012<sup>18</sup>.**

La regió P3 està formada per les regions 3A, 3B, 3C i 3D. La regió 3B codifica per la proteïna VPg, mentre que la regió 3C codifica per la proteasa i la 3D per la polimerasa. La funció de la proteïna 3A és desconeguda<sup>30</sup>.

La regió 3' no codificant (3' NCR) té una longitud de 40 a 80 nucleòtids i, a diferència de la regió 5'NCR, presenta una elevada variabilitat entre soques, en alguns casos per sobre del 20%<sup>30,88</sup>. S'ha postulat que la unió de proteïnes cel·lulars a aquesta regió induïx persistència en cultiu cel·lular<sup>88</sup>.

<sup>85</sup> Tesar, M., Xia, X.Y., Summers, D.F. & Ehrenfeld, E. 1993. Analysis of a potential myristoylation site in hepatitis A virus capsid protein VP4. *Virology* 194: 616-626.

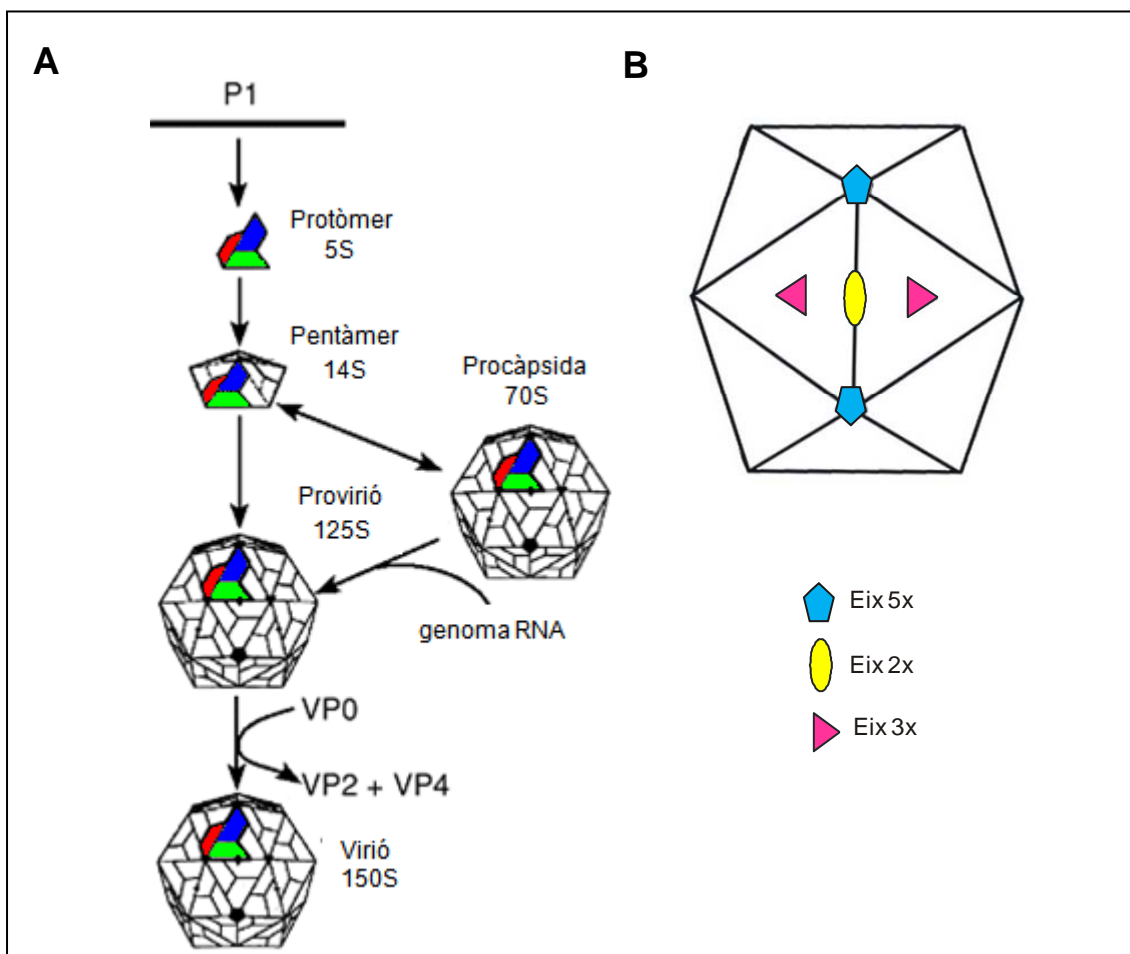
<sup>86</sup> Probst, C., Jecht, M. & Gauss-Müller, V. 1999. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles: role of structural proteins VP4 and 2A. *J. Biol. Chem.* 274: 4527-4531.

<sup>87</sup> Emerson, S.U., Huang, Y.K., McRill, C., Lewis, M. & Purcell, R.H. 1992. Mutations in both the 2B and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaptation to growth in cell culture. *J. Virol.* 66:650-654.

<sup>88</sup> Cohen, J.L., Rosenblum, B., Ticehurst, J.R., Daemer, R.J., Feinstone, S.M. & Purcell, R.H. 1987. Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2497:2501.

## 1.7. ESTRUCTURA DEL VIRIÓ

La càpsida de l'HAV, de simetria icosaèdrica, està formada per 60 còpies de les proteïnes VP2, VP3 i VP1. La unitat bàsica de la càpsida és el protòmer, amb un coeficient de sedimentació de 5S, el qual presenta una còpia de cadascuna de les proteïnes (Fig. 1.7.A). Els protòmers s'uneixen de 5 en 5 per donar lloc als pentàmers, que presenten un coeficient de sedimentació de 14S. La unió de 12 pentàmers dóna lloc a la càpsida buida, amb un coeficient de sedimentació de 70S.



**Fig. 1.7. Estructura icosaèdrica de la càpsida dels picornavirus. A. Morfogènesi de la càpsida vírica a partir d'un protòmer format per una còpia de cada una de les proteïnes VP1, VP2 i VP3. Adaptat de Racaniello, 2001<sup>89</sup>. B. Representació esquemàtica d'una partícula vírica amb els diferents eixos de simetria.**

<sup>89</sup> Racaniello, V. 2007. Picornaviridae: The viruses and their replication. Fields Virology, 5th Ed. Eds: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. & Straus, S.D. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 826-838.

Finalment, la càpsida buida incorpora l'àcid nucleic i esdevé un virus infecciós, amb un coeficient de sedimentació de 150S, un cop s'ha donat el tall de VP0 en VP2 i VP4 (Fig. 1.7.A).

Tanmateix, recentment Lemon i col·laboradors han observat que en propagar l'HAV en cèl·lules d'hepatoma es produeixen dues poblacions de virus infecciosos que es diferencien segons els seus coeficients de sedimentació: una població minoritària que correspon a les partícules víriques nues i una població majoritària, amb un coeficient de sedimentació inferior, formada per vesícules membranoses, cada una de les quals conté entre 1 i 3 partícules víriques<sup>90</sup>. També han observat aquesta forma embolcallada en sang de ximpanzés infectats amb l'HAV<sup>90</sup>.

L'estructura tridimensional de l'HAV està encara per resoldre degut a que fins al moment no s'ha aconseguit cristal·litzar. Per aquest motiu l'estructura tridimensional de l'HAV es basa en extrapolacions de les informacions obtingudes amb les cristal·litzacions d'altres picornavirus. Per homologia amb aquestes, cada proteïna de la càpsida de l'HAV presentaria una estructura terciària de 8 barres  $\beta$  antiparal·leles que s'organitzen en una càpsida amb triangulació de 3 ( $T=3$ ) (Fig. 1.4.B). Aquestes barres  $\beta$  (classificades de la B fins la I) estan connectades a través de *loops*, que són les regions més superficials de la càpsida i contenen els llocs antigènics<sup>91,92</sup>.

## 1.8. ESTRUCTURA I VARIABILITAT ANTIGÈNICA DE L'HAV

Els models d'estructura tridimensional generats per l'HAV (Fig. 1.8) s'han realitzat per comparació amb altres picornavirus i amb l'ajut de mutants d'escapament a anticossos monoclonals (MAbs) generats contra la càpsida de l'HAV. Mitjançant els mutants d'escapament als anticossos i els assajos de competència entre els diferents MAbs per a la neutralització del virus, s'ha aconseguit definir tres epítops antigènics discontinus. Un d'ells és l'epítop immunodominant, definit com a tal per que s'hi uneixen la majoria d'anticossos. Els virus que perden una part o la totalitat del reconeixement pels anticossos dirigits contra l'epítop immunodominant mostren

---

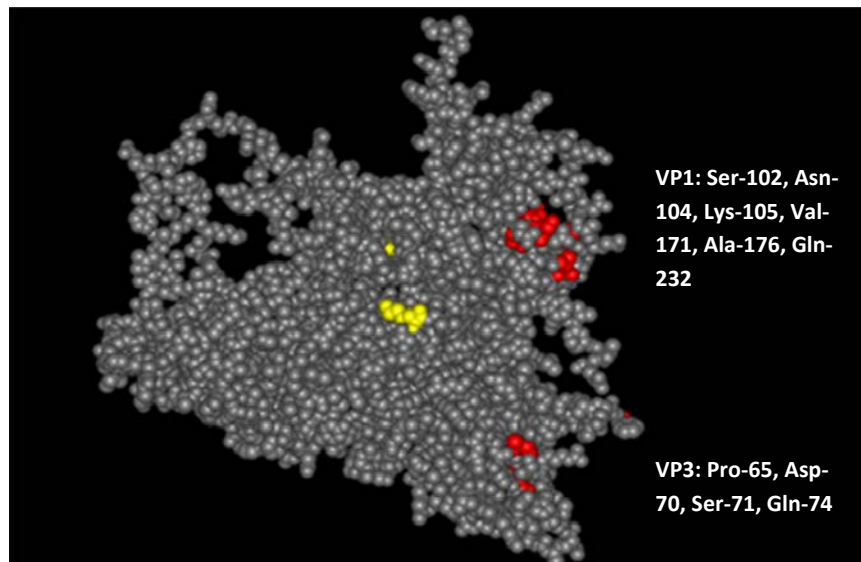
<sup>90</sup> Lemon, S.M. & Feng, Z. 2012. Membrane hijacking: biogenesis of enveloped hepatoviruses and their role in pathogenesis of hepatitis A. EuroPic, oral comunicació.

<sup>91</sup> Luo, M., Rossmann, M.G. & Palmenberg, A.C. 1988. Prediction of three-dimensional models for foot-and-mouth disease virus and hepatitis A virus. *Virology* 166: 503-514.

<sup>92</sup> Harrison, S.C. 2001. Principles of virus structure. A: *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> Ed. Eds: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. & Straus, S.D. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 53-58.

---

canvis en els aminoàcids Pro-65, Asp-70, Ser-71 o Gln-74 de VP3, o Ser-102, Asn-104, Lys-105, Val-171, Ala-176 o Gln-232 de VP1<sup>93,94,95</sup>, que en els models d'estructura de la càpsida queden molt allunyats entre sí (Fig. 1.8) i no poden interaccionar conjuntament amb un únic paràtop. Aquest fet indueix a pensar que l'estructura de la càpsida es tal que el canvi d'un residu en un punt genera un canvi d'estructura en un altre punt de la càpsida.



**Fig. 1.8. Representació d'un model de protòmer de l'HAV cedit per Ming Luo (Universitat d'Alabama, Birmingham, EUA). Els residus representats en vermell corresponen a l'epítot immunodominant, en groc els de l'epítot al que s'uneixen l'anticòs monoclonal H7C27 i la glicoforina A.**

Un segon epítot antigènic és el que coincideix amb el lloc d'unió a la glicoforina A<sup>96</sup>, tal i com ho demostra la competència que s'estableix entre l'anticòs que reconeix aquest epítot, l'H7C27, i la glicoforina A per tal d'unir-se al virus. S'han obtingut diferents virus que perden el reconeixement per part de l'anticòs H7C27; un amb canvi en la Lys-221 de VP1<sup>93</sup>, un altre amb canvi en la Gly-217 de VP1<sup>97</sup> i l'altre

<sup>93</sup> Ping, L.H. & Lemon, S.M. 1992. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J. Virol.* 66: 2208-2216.

<sup>94</sup> Ping, L.H., Jansen, R.W., Stapleton, J.T., Cohen, J.I. & Lemon, S.M. 1988. Identification of an immunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8281-8285.

<sup>95</sup> Nainan, O., Brinton, M. & Margolis, H. 1992. Identification of aminoacids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus. *Virology* 191: 984-987.

<sup>96</sup> Sánchez, G., Aragonès, Ll., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2004. Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycoprotein A of the erythrocyte membrane. *J. Virol.* 78: 9807-9813.

<sup>97</sup> Aragonès, Ll., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2008. Hepatitis A mutant spectra under selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constrains limit capsid variability. *J. Virol.* 82: 1688-1700.



amb canvi en la Ser-114 de VP1<sup>98</sup>, aquest últim mutant només amb una resistència parcial a l'anticòs.

Per últim, el tercer epítot, al qual s'uneix l'anticòs 4E7, no ha presentat cap mutant d'escapament i, per tant, no es coneix la localització exacta d'aquest epítot<sup>93</sup>.

Tradicionalment les úniques variants antigèniques naturals conegudes de l'HAV eren soques de simi amb substitucions en l'Asp-70 de VP3 i la Ser-102 de VP1. Posteriorment es van detectar canvis en l'Asp-70 de VP3, la Ser-102 i la Ser-114 de VP1 en soques procedents de malalts d'hepatitis A<sup>99</sup>. Recentment s'han detectat noves variants antigèniques en pacients. Una amb una substitució en la Val-72 de VP3 que causava la pèrdua de reconeixement per part del MAb K34C8<sup>100</sup>; una altra amb una deleció de 15 aminoàcids (VP1 95-109)<sup>101</sup>, com altres variants detectades també amb delecions<sup>102,103</sup>. Tanmateix, les variants de l'HAV amb delecions ja s'havien observat en algunes variants adaptades a replicar en cultiu cel·lular<sup>104</sup>.

Tot i que s'han pogut aïllar variants antigèniques de l'HAV, només s'ha descrit un únic serotip<sup>30</sup>, a diferència d'altres picornavirus com poliovirus que presenta 3 serotips<sup>105</sup> i rinovirus que en té 101<sup>106</sup>. Tenint en compte que l'HAV replica seguint

---

<sup>98</sup> Cox, E.M., Emerson, S.U. & Lemon, S.M. 1991. Use of oligonucleotide-direct mutagenesis to define the immunodominant neutralization site of HAV: Vaccines 90: Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS. Eds: Brown, F., Chanock, R.M., & Ginsbrg, H.S. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 169-173.

<sup>99</sup> Day, S.P., Sharpe, D. & Stapleton J.T. 1991. Evaluation of the human B lymphocyte response to hepatitis A virus: Viral hepatitis and liver disease. Eds: Hollinger, F.B., Lemon, S.M. & Margolis, H.S. Philadelphia: William and Wilkins, pp. 69-71.

<sup>100</sup> Sánchez, G., Pintó, R.M., Vanaclocha, H. & Bosch, A. 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfishborne outbreak. *J. Clin. Microbiology*. 40:4148-4155.

<sup>101</sup> Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Perez-Bercof, R., Casane, D., Colina, R., Garcia, L., Vega, I., Glikman, G., Romanowsky, V., Castello, A., Nicand, E., Gassin, M., Billaudel, S., & Ferre, V. 2002. Molecular evolution of hepatitis A virus: A new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol.* 76: 9516-9525.

<sup>102</sup> Gharbi-Khelifi, H., Sdiri, K., Harrath, R., Fki, L., Hakim, H., Berthomé, M., Billaudel, S., Ferre, V. & Aouni, M. 2007. Genetic analysis of HAV strains in Tunisia reveals two new antigenic variants. *Virus Genes* 35: 155-159.

<sup>103</sup> Comunicació personal Norder, H., Karolinska Institute, Estocolm, Suècia.

<sup>104</sup> Graff, J., Normann, A., Feinstone, S.M. & Flehmig, B. 1994. Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *J. Virol.* 68:548-554.

<sup>105</sup> Pallansch M.A. & Roos, R.P. 2001. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and newer Enteroviruses. *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> Ed. Eds: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. & Straus, S.D. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 723-797.

<sup>106</sup> Laine, P., Savolainen, C., Blomqvist, S. & Hovi, T. 2005. Phylogenetic analysis of human Rhinovirus capsid protein VP1 and 2A protease coding sequence confirms shared genus-like relationship with human Enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 86: 697-706.

---

una distribució de quasiespècies<sup>107</sup>, es probable que la manca de variabilitat antigènica sigui deguda a constriccions estructurals de la càpsida<sup>108</sup>, constriccions que podrien guardar relació amb l'elevada estabilitat d'aquesta davant condicions extremes de pH<sup>75</sup> i temperatura<sup>76</sup> i front la dessecació<sup>109</sup>. La complexitat del cicle biològic del virus explicaria la selecció d'aquesta elevada resistència del virus a una gran varietat de condicions.

A banda de les constriccions estructurals pròpies dels aminoàcids de la càpsida, un altre factor que pot contribuir a la baixa variabilitat antigènica és el fet de que el 15% dels residus de la superfície de la càpsida estan codificats per codons rars<sup>108</sup>, els quals es troben localitzats prop dels epítops antigènics i tendeixen a la invariabilitat<sup>97</sup>. Per altra banda, s'ha postulat també la existència de constriccions imposades pel cicle biològic que contribueixen a la baixa variabilitat<sup>110</sup>.

### 1.9. CICLE BIOLÒGIC DE L'HAV

La via principal de transmissió de l'HAV és la via fecal-oral<sup>111</sup>, essent el contacte persona-persona i la ingestió d'aigua o aliments contaminats la forma més comú de transmissió. Encara que en aproximadament el 40% dels casos descrits d'hepatitis A la font de la infecció no s'arriba a identificar<sup>30</sup>, s'han descrit brots deguts al consum d'aigua<sup>112</sup> i aliments contaminats<sup>113,114</sup>. Dins aquesta última categoria, el marisc que ha estat en contacte amb aigües que reben contaminants humans és una causa freqüent d'infecció<sup>37,38,115,116</sup>. Amb molta menys freqüència també s'han

<sup>107</sup> Sánchez, G., Bosch, A., Gómez-Mariano, G., Domingo, E. and Pintó, R.M. 2003. Evidence for quasiespecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology*. 315:34-42.

<sup>108</sup> Sánchez, G., Bosch, A., & Pintó, R.M. 2003. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J. Virol.* 77:452-459.

<sup>109</sup> Abad, F.X., Pintó, R.M. & Bosch, A. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3704-3710.

<sup>110</sup> Costafreda, M.I., Ribes, E., Franch, A., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2012. A single mutation in the glycoporphine A binding site of hepatitis A virus enhances virus clearance from the blood and results in a lower fitness variant. *J. Virol.* 86: 7887-7895.

<sup>111</sup> Mast, E.E., & Alter, M.J. 1993. Epidemiology of viral hepatitis: an overview. *Seminars in Virology* 4:273-283.

<sup>112</sup> Cuthbert, J.A. 2001. Hepatitis A: old and new. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 38-58.

<sup>113</sup> Reid, T.M. S., & Robinson, H.M. 1987. Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiol. Infect.* 98: 109-112.

<sup>114</sup> Roseblum, L.S., Mirkin, I.R., Allen, D.T., Safford, S. & Hadler, S.C. 1990. A multistate outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *Am. J. Public Health* 80: 1075-1080.

<sup>115</sup> Halliday, M.L., Kang, L.-Y., Zhou, T.-Z., Hu, M.-D., Pan, Q.-C., Fu, T.-Y., Huang, Y. S. & Hu, S.L.. 1991. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis.* 164: 852-859.

<sup>116</sup> Mele, A., Rastelli, M.G., Gill, O.N., DiBisceglie, D., Rosmini, F., Pardelli, G., Valtriani, C. & Patriarchi, P. 1989. Recurrent epidemic hepatitis A associated with the consumption of raw shellfish, probably controlled through public health measures. *Am. J. Epidemiol.* 130: 540-546.

descriu casos de transmissió parenteral, a través de transfusions<sup>117,118</sup>, l'ús de drogues injectables<sup>119</sup> o l'administració de productes derivats de sang<sup>120</sup>, i també de transmissió fecal-oral, a través de pràctiques sexuals oro-anals, més freqüent entre la població homosexual masculina<sup>121,122,123</sup>.

El cicle biològic s'inicia, habitualment, mitjançant la ingestió del virus i, un cop en l'aparell digestiu, el virus probablement replicaria a nivell de mucosa estomacal o intestinal per tal d'amplificar l'inòcul<sup>124</sup>. Posteriorment, el virus és absorbit a través de la mucosa de l'intestí prim fins arribar al torrent sanguini, produint una fase virèmica. A través de la vena porta arriba al seu òrgan diana, el fetge, on replica massivament. Encara que el mecanisme que utilitza el virus per expandir-se fins a fetge té molts interrogants, està força acceptada la existència d'un cicle enterohepàtic en el que la progènie vírica surt de l'hepatòcit mitjançant el conducte biliar i arriba novament a l'intestí des d'on els virus poden ser de nou absorbits o excretats en la femta (Fig. 1.9).

Aquesta idea s'ha vist reforçada després d'observar que la virèmia no és baixa i curta com es pensava, sinó que s'arriben a detectar títols de fins 10<sup>4</sup> genomes/ml un mes després de l'inici dels símptomes<sup>27,125,126</sup>.

---

<sup>117</sup> Noble, R.C., Kane, M.A., Reeves, S.A. & Roedel, I. 1984. Posttransfusional hepatitis A in neonatal intensive care unit. *JAMA* 252:2711-2715.

<sup>118</sup> Sheretz, R.J., Russell, B.A. & Reuman, P.D. 1984. Transmission of hepatitis A by transfusion of blood products. *Arch. Intern. Med.* 144:1579-1580.

<sup>119</sup> Ngui, S.L., Granerod, J., Jewes, L.A., Crowcroft, N.S. & Teo. 2008. Outbreaks of hepatitis A in England and Wales associated with two co-circulating hepatitis A virus strains. *J. Med. Virol.* 80: 1181-1188.

<sup>120</sup> Rosenberg, S.A., Lotze, M.T. & Muul, L.U. 1987. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin 2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316: 889-897.

<sup>121</sup> Tjon, G., Xiridou, M., Coutinho, R. & Bruisten, S. 2007. Different transmission patterns of hepatitis A virus for two main risk groups as evidenced by molecular cluster analysis. *J. Med. Virol.* 79: 488-494.

<sup>122</sup> Pérez-Sautu, U., Costafreda, M.I., Caylà, J., Tortajada, C., Lite, J., Bosch, A. & Pintó RM. 2011. Hepatitis A virus vaccine escape mutants and potential new serotype emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 734-737.

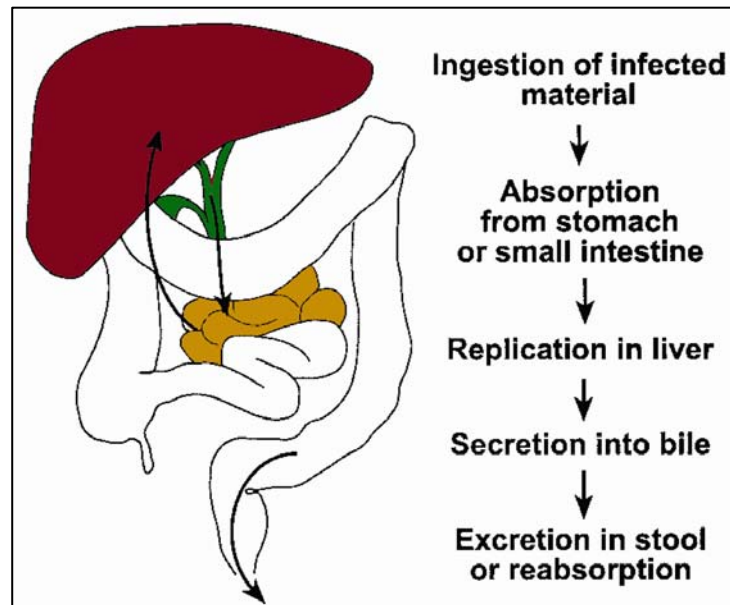
<sup>123</sup> Pérez-Sautu, U., Costafreda, M.I., Lite, J., Sala, R., Barrabeig, I., Bosch, A., & Pintó, R.M. 2011. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005–2009: Circulation of newly emerging strains. *J. Clin. Virol.* 52: 98-102.

<sup>124</sup> Asher, L.V., Binn, L.N., Mensing, T.L., Marchwicki, R.H., Vassell, R.A. & Young, G.D. 1995. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Med. Virol.* 47: 260-268.

<sup>125</sup> Costa-Mattioli, M., Monpoeho, S., Nicand, E., Aleman, M.H., Billaudel, S. & Ferre, V. 2002. Quantifications and duration of viremia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J. Viral. Hep.* 9: 101-106.

<sup>126</sup> Normann, A., Jung, C., Vallbracht, A. & Flehmig, B. 2004. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J. Med. Virol.* 72: 10-16.

---



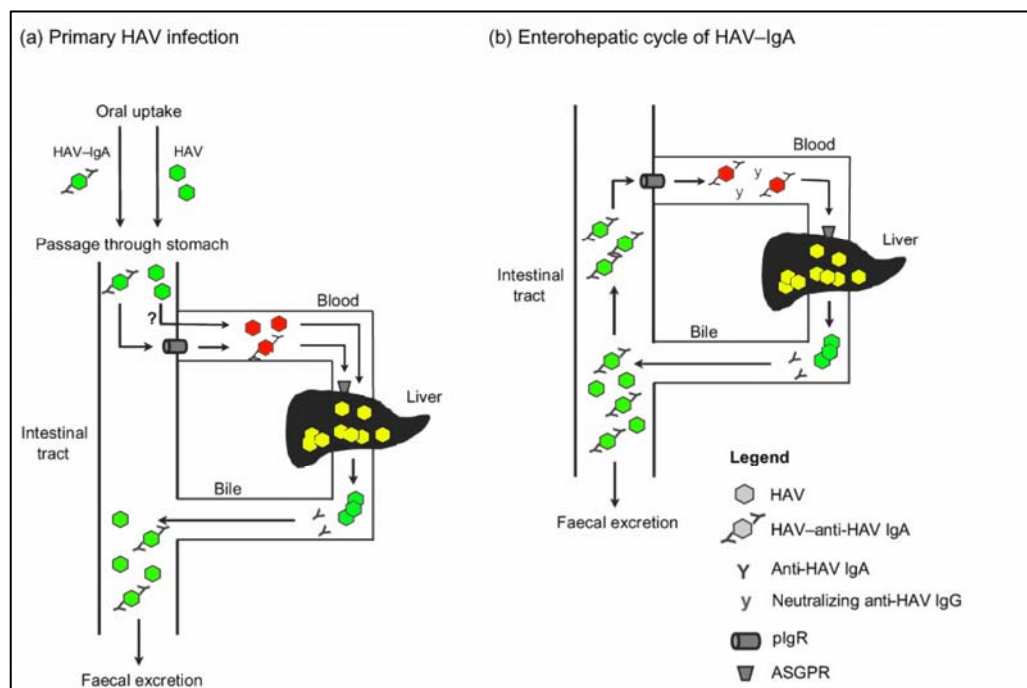
**Fig. 1.9.** Esquema del possible cicle enterohepàtic de l'HAV. Representació de la via que seguiria el virus des de la que és ingerit fins ser excretat en femtes. Adaptat de Cuthbert, 2001<sup>112</sup>.

A més, la forma embolcallada de l'HAV descrita recentment podria afavorir la persistència del virus en sang ja que aquestes partícules embolcallades no són neutralitzades pels anticossos anti-HAV<sup>90</sup>. Per tant, aquestes podrien representar un mecanisme únic a través del qual el virus sortiria de la cèl·lula arrastrant part de la seva membrana cel·lular i això li permetria escapar a la neutralització per part dels anticossos presents a la sang. Tanmateix, aquestes partícules embolcallades presents en sang no haurien sortit pel canalicle biliar sinó que serien lliurades directament a sang a través de la membrana basolateral de l'hepatòcit; les partícules embolcallades lliurades al canalicle biliar perdrien l'embolcall en contacte amb les sals biliars, de manera que en femta només es detectarien partícules nues. D'altra banda, les partícules embolcallades també tindrien la funció de promoure la propagació del virus entre els hepatòcits ja que la infecció es podria donar mitjançant la fusió de la seva membrana amb la dels hepatòcits<sup>90</sup>.

### 1.9.1. Entrada i interacció amb el receptor/s

Des del punt de vista de l'entrada, estudis realitzats amb hepatòcits derivats d'hepatoma humà, la línia cel·lular HepG2 i que mantenen la polarització en cultiu cel·lular, han demostrat que l'entrada del virus té lloc majoritàriament a través de

la membrana plasmàtica basolateral<sup>127</sup>. En canvi, en treballs realitzats amb cultius polaritzats de cèl·lules de l'epiteli intestinal humà Caco-2 s'ha observat que l'entrada de l'HAV en aquestes cèl·lules té lloc mitjançant el domini apical<sup>128</sup>. Tanmateix, aquestes observacions són consistents amb la ruta de l'HAV per tal d'infectar els hepatòcits: des de la llum intestinal als enteròcits a través de la seva membrana plasmàtica apical, i des de la sang als hepatòcits a través de la seva membrana basolateral.



**Fig. 1.9.1. Hipòtesis de la infecció primària (A) i el cicle enterohepàtic (B) de l'HAV. Adaptat de Dotzauer i col·laboradors, 2005<sup>129</sup>.**

S'ha demostrat que els complexos HAV-Immunoglobulina A anti-HAV (HAV-IgA) poden infectar els hepatòcits humans aprofitant la via endocítica de les IgA a través del receptor hepatocel·lular asialoglicoproteic (ASGPR)<sup>130</sup>. Així doncs, es possible que l'HAV viatgi en sang i arribi a fetge unit a les IgA, que de forma natural són eliminades de sang a través del fetge. Aquesta hipòtesis s'ha vist reforçada després

<sup>127</sup> Snooks, M.J., Bhat, P., Mackenzie, J., Counihan, N.A., Vaughan, N. & Anderson, D.A. 2008. Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes. *J. Virol.* 82: 8733-8742.

<sup>128</sup> Blank, C.A., Anderson, D.A., Beard, M. & Lemon, S.M. 2000. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cell with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J. Virol.* 74: 6476-6484.

<sup>129</sup> Dotzauer, A., Brenner, M., Gebhardt, U. & Vallbracht, A. 2005. IgA-coated particles of hepatitis A virus are translocated antivectionally from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Gen. Virol.* 86: 2747-2751.

<sup>130</sup> Dotzauer, A., Gebhardt, U., Bieback, K., Götcke, U., Kracke, A., Mages, J., Lemon, S.M. & Vallbracht, A. 2000. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via asialoglycoprotein receptor. *J. Virol.* 74: 10950-10957.

de que s'hagi observat que els complexos HAV-IgA estan presents durant la transmissió i són altament resistents a pH àcid<sup>130</sup>. Aquests complexos passarien per l'estómac sense perdre la seva estabilitat i, un cop a l'intestí, podrien arribar a la sang mitjançant la transcitosi reversa de la IgA després de que el complex HAV-IgA s'unís al receptor polimèric de les immunoglobulines (pIgR)<sup>129</sup> (Fig. 1.9.1.A). A més, el possible cicle enterohepàtic de l'HAV podria establir-se amb la combinació d'aquesta transcitosi reversa per interacció de la IgA del complex HAV-IgA i el pIgR i la endocitosi via ASGPR, resultant en la reinfecció del fetge<sup>129</sup> (Fig. 1.9.1.B).

D'altra banda, s'ha demostrat també que el virus interacciona amb una glicoproteïna integral de membrana tipus 1 en cèl·lules de ronyó de mico, HAVCR-1<sup>131</sup>, i amb el seu homòleg humà huHAVCR-1<sup>132</sup>. Aquest receptor cel·lular de l'HAV pertany a la família TIM, un important grup de receptors immunològics<sup>133,134</sup>, altament conservat en vertebrats. L'IgA és un lligand natural del HAVCR-1/TIM1 però la unió de l'IgA amb aquest receptor no inhibeix la interacció de l'HAV amb el HAVCR-1, la qual cosa indica que IgA i virus s'uneixen a diferents epítops del HAVCR-1/TIM1<sup>135</sup>. De fet, la interacció de l'IgA amb aquest receptor podria tenir un paper important en la patogènesis de l'HAV ja que incrementaria la interacció del virus amb el receptor, augmentant així la infecció de cèl·lules amb HAVCR-1 com les cèl·lules Kupffer i els hepatòcits<sup>135</sup>.

Una altra possible via d'entrada del virus en els hepatòcits seria, en el cas de les partícules víriques embolcallades, la fusió de la membrana de les vesícules que les contenen amb la membrana dels hepatòcits<sup>89</sup>.

### 1.9.2. Desencapsidació

La replicació de l'HAV en cultiu cel·lular és lenta i ineficient en comparació amb la

<sup>131</sup> Kaplan, G.G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y. & Feinstone, S.M. 1996. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 15: 4282-4296.

<sup>132</sup> Feigelstock, D., Thompson, P., Matoo, P. & Kaplan, G.G. 1998. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J. Virol.* 72: 6621-6628.

<sup>133</sup> McIntire, J.J., Umetsu, D.T. & Dekruyff, H.R. 2004. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin. Immunopathol.* 25: 335-348.

<sup>134</sup> Meyers, J.H., Sabatos, C.A., Chakravarti, S. & Kuchroo V.K. 2005. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol. Med.* 11: 362-369.

<sup>135</sup> Tami, C., Silberstein, E., Manangeeswaran, M., Freeman, G.J., Umetsu, S.E., Dekruyff, R.H., Umetsu, D.T. & Kaplan, G.G. 2007. IgA is a natural ligand of the hepatitis A virus cellular receptor 1, and their association enhances virus-receptor interactions. *J. Virol.* 81: 3437-3446.

de la resta de picornavirus<sup>136,137</sup>. En aquest sentit, s'ha demostrat que la desencapsidació de l'HAV *in vitro* és un procés lent i asincrònic<sup>138,139</sup>. En canvi, la unió i penetració del virus en la cèl·lula sembla ser igual d'eficient que en altres picornavirus<sup>139,140,141</sup>. De fet, mentre que en la infecció amb poliovirus la fase d'eclipse del virus inoculat és evident a les 2 hores, demostrant la ràpida desencapsidació d'aquest virus, la de l'HAV encara no es total a les 18 hores<sup>142</sup>. Això indica que, o bé la desencapsidació és un procés molt ineficient, o bé alguns dels passos que segueixen a la interacció amb el receptor, i que li permeten al virus entrar en la cèl·lula, són ineficients<sup>139</sup>.

S'ha postulat que el mecanisme que utilitza el virus per entrar en la cèl·lula és la endocitosi mitjançada per receptor. En aquest sentit, diferents estudis utilitzant inhibidors de diferents vies endocítiques suggereixen que, degut a la poca inhibició de la replicació de l'HAV en presència de bases dèbils<sup>143,144</sup> com l'amantadina i el NH<sub>4</sub>Cl i exceptuant el cas de la cloroquina, el pH àcid en els endosomes no seria l'únic responsable de la desencapsidació de l'HAV<sup>145</sup>. En aquest punt, no està clar si el calci, que s'ha descrit que en els picornavirus actua a diferents nivells durant la replicació, podria sumar-se al baix pH per tal de promoure la desencapsidació del virus. Existeixen estudis que demostren que el calci incrementa la unió del virus al receptor de la superfície cel·lular<sup>140,146</sup>. Aquest increment pot ser degut a canvis conformacionals que el calci promou en les càpsides víriques i que poden ser els

---

<sup>136</sup> Siegl, G., Nüesch, J.P.F. & Weitz, M. 1991. Replication and protein processing of hepatitis A virus. Hollinger, F.B., Lemon, S.M. & Margolis, H., Eds. Viral hepatitis and liver disease. William and Wilkins, Baltimore, Md. Pp 25-30.

<sup>137</sup> Wimmer, E. & Murdin, A.D. 1991. Hepatitis A virus and molecular biology of the picornavirus: a case for a new genus of the family Picornaviridae. Hollinger, F.B., Lemon, S.M. & Margolis, H., Eds. Viral hepatitis and liver disease. William and Wilkins, Baltimore, Md. Pp 31-44.

<sup>138</sup> Bishop, N.E., Hugo, D.I., Borovec, S.V. & Anderson, D.A. 1994. Rapid and efficient purification of hepatitis A virus from cell culture. J. Virol. Methods. 47: 203-216.

<sup>139</sup> Wheeler, C.M., Fields, H.A., Schable, C.A., Meinke, W.J. & Maynard, J.E. 1985. Adsorption, purification, and growth characteristics of hepatitis A virus strain HAS-15 propagated in fetal rhesus monkey kidney cells. J. Clin. Microbiol. 23: 434-440.

<sup>140</sup> Bishop, N.E. & Anderson, D.A. 1997. Early interactions of hepatitis A virus with cultured cells: viral elution and the effect of pH and calcium ions. Arch. Virol. 142: 2161-2178.

<sup>141</sup> Stapleton, J.T., Frederick, J. & Meyer, B. 1991. Hepatitis A virus attachment to cultured cell lines. J. Infect. Dis. 164: 1098-1103.

<sup>142</sup> Bishop, N.E. & Anderson, D.A. 1999. Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. J. Virol. 74: 3423-3426.

<sup>143</sup> Widell, A., Hansson, B.G., Öberg, B. & Nordenfelt, E. 1986. Influence of twenty potentially antiviral substances on *in vitro* multiplication of hepatitis A virus. Antiviral Res. 6: 103-112.

<sup>144</sup> Superti, F., Seganti, L., Orsi, N., Divizia, M., Gabrieli, R. & Paná, A. 1987. The effect of lipophilic amines on the growth of hepatitis A virus in Frp13 cells. Arch. Virol. 96: 289-296.

<sup>145</sup> Bishop, N.E. 1998. Examination of potential inhibitors of hepatitis A virus uncoating. Intervirology 41: 261-271.

<sup>146</sup> Zajac, A.J., Amphlett, E.M., Rowlands, D.J. & Sangar, D.V. 1991. Parameters influencing the attachment of hepatitis A virus to a variety of continuous cell lines. J. Gen. Virol. 72: 1667-1675.

---

responsables de l'increment de la interacció amb el receptor<sup>140</sup> i també de la possible desestabilització de les partícules víriques i posterior desencapsidació.

La idea de la intervenció del calci en la desencapsidació es veuria recolzada pel fet de que s'hagin trobat llocs d'unió a calci en l'eix terciari de simetria de la càpside dels picornavirus i per la identificació de bombes de calci en vesícules no recobertes de clatrina<sup>147</sup>. No obstant, s'ha demostrat que l'exposició de l'HAV a condicions de pH àcid indueix canvis conformacionals en la seva càpside que resulten en un increment de la hidrofobicitat de la partícula vírica<sup>148</sup>. Aquesta major hidrofobicitat podria ser clau per a la desencapsidació ja que afavoriria la interacció de les proteïnes de la càpside amb la membrana de l'endosoma, facilitant així l'alliberació de l'RNA al citosol de la cèl·lula infectada<sup>148</sup>.

Paral·lelament a la cinètica de desencapsidació de l'HAV, s'ha vist la formació de partícules denses, partícules víriques que es troben a densitats iguals o superiors als 1,40 g/cm<sup>3</sup>, en comparació als 1,34 g/cm<sup>3</sup> en les que es troben els virions madurs en gradients de CICS<sup>149</sup>. Ja que s'ha vist una correlació entre la formació de les partícules denses i la cinètica de desencapsidació, s'ha postulat que aquestes partícules denses podrien ser intermediaris en el procés de desencapsidació<sup>149</sup> ja que, a diferència de les partícules víriques madures, l'RNA de les partícules denses és digerit per les RNAses<sup>149</sup>. A més, l'antigenicitat d'aquestes partícules denses és inferior a la dels virions i provirions i la seva infectivitat és nul·la<sup>149</sup>. Aquestes característiques semblen apuntar cap a una configuració més oberta de les partícules denses, la qual seria incapaç d'interaccionar amb el receptor. Aquestes partícules denses es formen també de forma artificial en condicions de pH àcid i altes concentracions de calci, però únicament es formen a partir del virió madur<sup>149</sup>. Aquest fet indicaria que només el virió madur pot dur a terme els canvis conformacionals necessaris per a la desencapsidació.

Aquesta teoria es veu reforçada pel fet que els provirions, que donen lloc als virions madurs després del tall de VP0 en VP2 i VP4, tenen una infectivitat específica molt inferior a la dels virions madurs<sup>150</sup>. L'increment exponencial de la infectivitat específica en relació amb l'augment de VP2 suggereix la existència de múltiples

---

<sup>147</sup> Bishop, N.E. 1997. An update on non-clathrin-coated endocytosis. *Rev. Med. Virol.* 7: 199-209.

<sup>148</sup> Bishop, N.E. 1999. Conformational changes in the hepatitis A virus capsid in response to acidic conditions. *J. Med. Microbiol.* 48: 443-450.

<sup>149</sup> Bishop, N.E. 2000. Hepatitis A virus replication: An intermediate of uncoating process. *Intervirology* 43: 36-47.

<sup>150</sup> Bishop, N.E. & Anderson, D.A. 1993. RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus. *Virology* 197: 616-623.

---



llocs de tall necessaris per formar partícules infeccioses.

S'ha descrit per a altres membres de la família dels picornavirus que el tall de VP0, com a pas final de la morfogènesis, és necessari per a la desencapsidació de la partícula vírica en els endosomes<sup>151</sup>. Per tant, si l'HAV utilitza un mecanisme de desencapsidació similar, aquest procés podria no tenir lloc mentre el tall de VP0 no es completés, i les partícules víriques que no poguessin desencapsidar en els endosomes podrien posteriorment ser degradades en els lisosomes o ser expulsades a la superfície cel·lular. De fet, estudis del cicle replicatiu emprant cultures de creixement del virus que partien d'un inòcul amb percentatges de virions i provirions coneguts, han demostrat que la desencapsidació dels provirions és més lenta que la dels virions madurs<sup>142</sup>. Així doncs, aquesta seria la causa de la desencapsidació asincrònica i la falta d'una fase d'eclipse clarament definida quan les dues espècies estiguessin presents en l'inòcul; el temps necessari per a que el provirió esdevingui virió madur dins la cèl·lula podria ser la causa de la baixa infectivitat específica d'aquestes partícules inmadures<sup>142</sup>.

Cal tenir en compte també que les condicions de pH àcid i altes concentracions de calci que afavoririen la desencapsidació de l'HAV són les que es troben els virus en ser endocitats via vesícules no recobertes de clatrina com les caveoles o vesícules recobertes de caveolina<sup>147</sup>. A més, el fet que la endocitosis via vesícules recobertes de clatrina sigui un procés molt ràpid i les caveoles tinguin una cinètica més lenta, fa pensar que les caveoles són més compatibles amb el procés d'entrada de l'HAV en la cèl·lula.

*In vitro*, la fase d'eclipse, en la que té lloc la desencapsidació de les partícules víriques, va seguida d'una acumulació logarítmica de virus. En el cas de Poliovirus, aquesta acumulació de virus té una duració de 12 h, a partir de les quals els virus s'acumulen més lentament i la majoria es troben en el sobrenedant de les cèl·lules infectades. En canvi, en el cas de l'HAV la fase de creixement logarítmic comença a partir de les 12-18 h postinfecció i continua fins les 72 h, essent el lliurament de l'HAV al sobrenedant proporcional a la producció intracel·lular<sup>139</sup>. Una de les causes que poden influir a aquesta prolongació de la fase de creixement exponencial pot ser el fet de que l'HAV no silenciaci la síntesi proteica de la cèl·lula<sup>152</sup> i, per tant, competeix per la maquinària biosintètica amb la cèl·lula hoste.

---

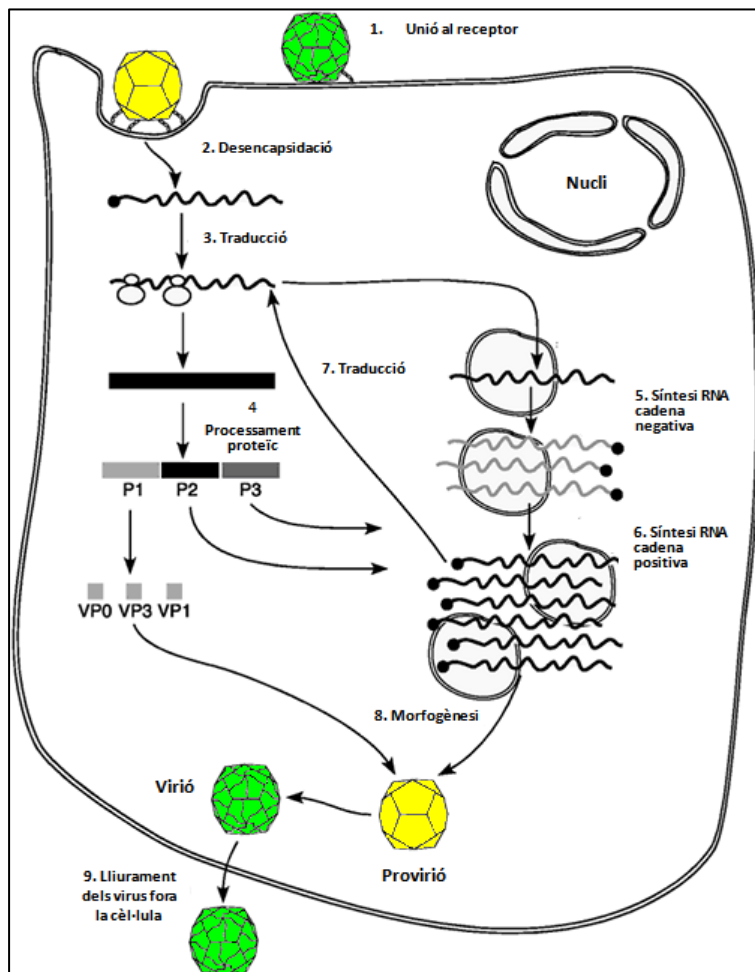
<sup>151</sup> Hellen, C.U.T. & Wimmer, E. 1992. Maturation of poliovirus capsid proteins. *Virology* 187: 391-397.

<sup>152</sup> Locarini, S.A., Coulepis, A.G., Westaway, E.G. & Gust, I.D. 1981. Restricted replication of hepatitis A virus in cell culture: intracellular biochemical studies. *J. Virol.* 37: 216-225.

---

### 1.9.3. Traducció i replicació genòmica

Independentment de la via d'entrada que el virus utilitzi, i un cop finalitzada la desencapsidació, l'RNA del virus, que es troba en el citosol de la cèl·lula, ha de ser traduït (Fig. 1.9.3.). El mecanisme de traducció que utilitza l'HAV, igual que la resta de picornavirus, és IRES-dependent i CAP-independent. L'estructura de l'IRES dels picornavirus ha evolucionat de forma gradual, mitjançant l'addició de dominis i elements que han millorat la seva funció d'atracció dels ribosomes o de regulació del procés de síntesi de les proteïnes víriques<sup>153</sup>. En canvi, l'HAV presenta un IRES tipus III<sup>153,154</sup>, poc eficient a l'hora de dirigir la traducció<sup>155</sup>.



**Fig. 1.9.3. Esquema del cicle replicatiu de l'HAV. Adaptat de Hollinger & Emerson 2007<sup>30</sup>.**

<sup>153</sup> Ehrenfeld, E. & Teterina, N.L. 2002. Initiation of translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosome entry site. In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 159-170.

<sup>154</sup> Brown, E.A., Zajac, A.J. & Lemon, S.M. 1994. In vitro characterization of an internal ribosome entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *J. Virol.* 68: 1066-1074.

<sup>155</sup> Whetter, L.E., Day, S.P., Elroystein, O., Brown, E.A. & Lemon, S.M. 1994. Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J. Virol.* 68: 5253-5263.

A més, a diferència dels altres membres de la família, l'HAV necessita el factor d'iniciació de la traducció eIF4G intacte, fet que implica que no pugui silenciar la síntesi proteïca de l'hoste i hagi de competir amb la cèl·lula per la maquinària traduccional<sup>89,156</sup>. Aquests últims fets podrien explicar el pobre i lent creixement de l'HAV en cultiu cel·lular. Davant d'aquesta situació de competència entre el virus i la cèl·lula, l'HAV ha adoptat una estratègia de traducció diferent, optant per un ús de codons deoptimitzat respecte al de la cèl·lula hoste, per tal de minimitzar aquesta competència pels tRNAs i la maquinària traduccional. Fruit d'aquesta deoptimització en l'ús de codons, el virus utilitza codons rars, que són aquells que s'aparellen amb tRNAs poc abundants. L'HAV utilitza molts codons rars ja que utilitza com a rars els que són rars per la cèl·lula i que, per tant, s'aparellen amb tRNA que es troben en concentracions baixes en la cèl·lula, però també els que la cèl·lula utilitza freqüentment, ja que els tRNA amb els que s'aparellen aquests últims tampoc estan disponibles per al virus<sup>108</sup>. Aquesta deoptimització de l'ús de codons també pot contribuir a la baixa síntesi proteica i lenta replicació de l'HAV, ja que les agrupacions de codons rars, com les que presenta l'HAV en el seu genoma, poden induir parades del complex de traducció necessàries per a que l'aminoacil-tRNA rar difongui fins el lloc A del ribosoma<sup>157,158,159</sup>. La conseqüència d'aquestes pauses pot ser una degradació de l'RNA<sup>160</sup>, la finalització prematura de la cadena polipeptídica<sup>161</sup>, o la incorporació d'aminoàcids incorrectes<sup>161</sup>. Tanmateix, aquestes parades del ribosoma també poden suposar un avantatge si serveixen per assegurar el correcte plegament de la proteïna que se sintetitza<sup>162,163</sup>. Així doncs, és molt probable que la baixa velocitat de traducció, deguda a les acumulacions de codons rars, contribueixi directament al fet que la càpsida de l'HAV sigui altament

---

<sup>156</sup> Ali, I.K., McKendrick, L., Morley, S.J. & Jackson, R.J. 2001. Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *J. Virol.* 75: 7854-7863.

<sup>157</sup> Robinson, M., Lilley, R., Little, S., Emtage, J.S., Yarranton, G., Stephens, P., Millican, A., Eaton, M. & Humphreys, G. 1984. Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acid Res.* 12: 6663-6671.

<sup>158</sup> Chou, T. & Lakatos, G. 2004. Clustered bottlenecks in mRNA translation and protein synthesis. *Phys. Rev. Lett.* 93: 198101.

<sup>159</sup> Sørensen, M.A., Kurland, C.G. & Pedersen, S. 1989. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 207: 365-377.

<sup>160</sup> Hoekema, A., Kastelein, R.A., Vasser, M. & de Boer, H.A. 1987. Codon replacement in the *PGK1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol. Cell Biol.* 7: 2914-2924.

<sup>161</sup> Parker, J. 1989. Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiol. Rev.* 53: 273-298.

<sup>162</sup> Adzhubei, A.A., Adzhubei, I.A., Krashennikov, I.A. & Neidle, S. 1996. Non-random usage of "degenerate" codons is related to protein three-dimensional structure. *FEBS Lett.* 399: 78-82.

<sup>163</sup> Evans, M.S., Clark IV, T.F. & Clark, P.L. 2005. Conformations of co-translational folding intermediates. *Protein Pept. Lett.* 12: 189-195.

---

cohesiva i estable, ja que pot facilitar el plegament adequat de les proteïnes<sup>164</sup>.

Un cop traduïda la regió codificant del genoma del virus, la qual presenta una única pauta oberta de lectura, la poliproteïna que en resulta es processada donant lloc a les proteïnes víriques madures. Una d'aquestes proteïnes és la 3D, la RNA polimerasa RNA depenent del virus, que s'encarrega de la replicació de l'RNA víric. La 3D amplifica els genomes de polaritat positiva a partir d'un RNA intermediari de polaritat negativa i emprant la VPg, unida de forma covalent a l'extrem 5' de la cadena motlle, com a *primer*.

#### 1.9.4. Processament proteic i ensamblatge de la càpsida

L'RNA genòmic de l'HAV codifica una poliproteïna de 235 kDa que es tallada en quatre proteïnes estructurals i set no estructurals. Aquest processament el realitza principalment la proteasa vírica 3C, que actua tant en *cis* com en *trans*<sup>165,166,167</sup>. Segons el model de processament proteic i encapsidació de l'HAV proposat, el primer tall de la poliproteïna té lloc entre 2A i 2B (Fig. 1.9.4.1) i l'efectua la proteasa 3C<sup>168,169</sup>. Com a conseqüència d'aquesta escissió, s'allibera el precursor de la càpsida del virió P1-2A, d'uns 100 kDa i un coeficient de sedimentació de 5S en solucions neutres de sacarosa. Cinc còpies d'aquest precursor s'estructuren en un pentàmer, el qual es digereix per la proteasa 3C entre 1B i 1C i entre 1C i 1D<sup>168</sup>. Com a conseqüència d'aquests talls s'obté el pentàmer, amb un coeficient de sedimentació de 14S (Fig. 1.9.4.2), constituït per 5 còpies de les proteïnes VP0, VP3 i VP1-2A (Fig. 1.9.4.1). A continuació, 12 pentàmers 14S s'ensamblen per donar lloc a les càpsides buides o procàpsides (Fig. 1.9.4.1), amb un coeficient de sedimentació de 70S (Fig. 1.9.4.2), que esdevenen provirions, amb un coeficient de sedimentació de 125S (Fig. 1.9.4.2), quan incorporen l'RNA genòmic<sup>168</sup>.

<sup>164</sup> Aragonès, Ll., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2010. Fine-tuning translational kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. PLOS Pathog. 6: e1000797.

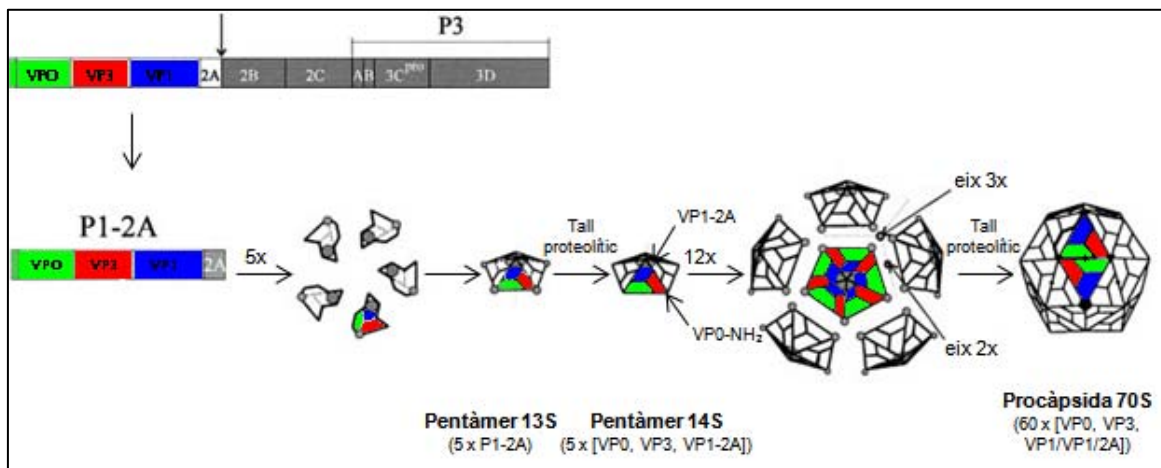
<sup>165</sup> Palmberg, A.C. 1990. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. Annu. Rev. Micro. 44: 603-623.

<sup>166</sup> Harmon, S.A., Updike, W., Jia, X.-Y., Summers, D. & Ehrenfeld, E. 1992. Polyprotein processing in *cis* and in *trans* by hepatitis A virus 3C protease cloned and expressed in *Escherichia coli*. J. Virol. 66: 5242-5247.

<sup>167</sup> Schultheiss, T., Kusov, Y.Y. & Gauss-Müller, V. 1994. Proteinase 3C of hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. Virology 198: 275-281.

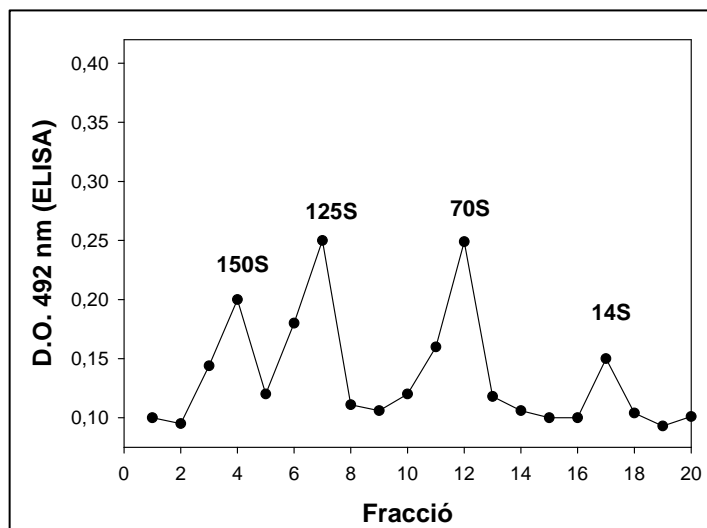
<sup>168</sup> Anderson, D.A. & Ross, B.C. 1990. Morphogenesis of hepatitis A virus: Isolation and characterization of subviral particles. J. Virol. 64: 5284-5289.

<sup>169</sup> Martin, A., Escriou, N., Choa, S.F., Girard, M., Lemon, S.M. & Wychowski, C. 1995. Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of hepatitis A virus polyprotein: functional impact on the infectivity of HAV RNA transcripts. Virology 213: 213-222.



**Fig.1.9.4.1. Model de processament i ensamblatge de les proteïnes de la càpsida de l’HAV. Adaptat de Probst i col·laboradors, 1999<sup>86</sup>.**

Únicament en els provirions es produeix el tall entre VP1 i 2A per obtenir la proteïna VP1, i el processament de VP0 que dóna lloc a VP2 i VP4. Aquest últim procés, necessari per a l’obtenció del virió madur, amb un coeficient de sedimentació de 150S (Fig.1.9.4.2), podria ser un procés autocatalític en el que l’RNA genòmic actuaria com a acceptor de protons de l’activitat serin-proteàsica de VP0<sup>150</sup>.



**Fig. 1.9.4.2. Pics antigènics típics que s’obtenen després de centrifugar suspensions de l’HAV, obtingudes a partir de cèl·lules infectades, a través de gradients de sacarosa del 5 al 45 % i analitzar les mostres resultants del fraccionament mitjançant ELISA.**

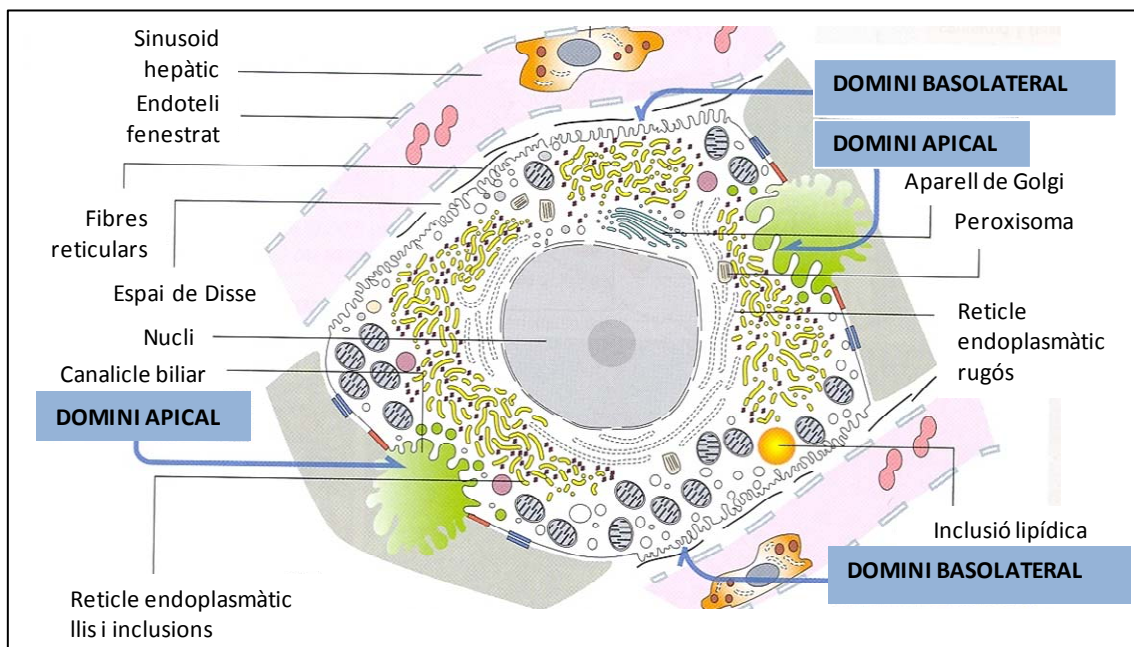
Ja s’ha comentat anteriorment que en el cas de l’HAV no s’ha demostrat la presència de VP4 en la càpsida dels virions madurs. Així doncs, la càpsida de l’HAV estaria constituïda per 60 còpies de les proteïnes VP1, VP2 i VP3<sup>74</sup>.

### 1.9.5. Sortida dels virus fora la cèl·lula

Després de replicar en els hepatòcits, cèl·lules polaritzades amb membranes plasmàtiques apical i basolateral clarament diferenciades, la progènie vírica resultant ha d'arribar novament a sang, tal com indica la virèmia de la fase aguda de la infecció, però també al conducte biliar i al tracte gastrointestinal, per ser excretada en femta i proporcionar els virus que seran transmesos a nous hostes.

En estudis amb hepatòcits humans polaritzats s'observà que més del 90% del virus produït s'exportava al domini basolateral dels hepatòcits<sup>127</sup> des d'on podria ser lliurat a la sang i donar lloc a la virèmia durant la fase aguda de la infecció.

L'inconvenient d'aquesta ruta de l'HAV és que no explicaria la presència del virus a la bilis i la seva posterior excreció en femta. En aquest sentit, cal tenir en compte que els hepatòcits són molt deficients en mecanismes que permetin el tràfic de les proteïnes sintetitzades de forma endògena cap al domini apical (Fig. 1.9.5). La majoria d'aquestes proteïnes són transportades cap al domini basolateral (Fig. 1.9.5) per ser lliurades a sang, mentre que les que estan destinades al domini apical han de ser redirigides mitjançant el procés de transcitosi. Així doncs, la transcitosi de l'HAV des del domini basolateral al apical explicaria la lliberació del virus al conducte biliar<sup>127</sup> (Fig. 1.9.5) i la seva posterior excreció en femta.



**Fig. 1.9.5. Dominis apical i basolateral dels hepatòcits. Adaptat de Kierszenbaum i col·laboradors, 2012<sup>170</sup>.**

<sup>170</sup> Kierszenbaum, A.L. & Tres, L.L. 2012. Histología y Biología celular. Introducción a la anatomía patológica. 3ª Ed. Elsevier Saunders. pp 518.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, s'han observat vesícules recobertes de membrana plasmàtica amb 1-3 partícules de l'HAV en el seu interior<sup>90</sup>. A partir d'aquestes observacions, efectuades en sang de ximpanzés infectats amb l'HAV, s'ha proposat un nou model de sortida de la progènie vírica de l'hepatòcit segons el qual aquesta podria sortir per la membrana basolateral, arrossegant part de la membrana de la cèl·lula hoste i donant lloc a la forma embolcallada del virus detectada en sang, i també pel canalicle biliar, mitjançant un procés similar<sup>90</sup>. Tanmateix, en aquest últim cas les membranes de les vesícules serien trencades per l'acció de la bilis durant el seu pas per l'intestí, fet que explicaria el perquè no s'observen les partícules embolcallades en femta<sup>90</sup>.

### **1.10. L'HAV REPLICA SEGUINT UNA DINÀMICA DE QUASIESPÈCIES**

Els virus RNA presenten una taxa de mutació d'entre  $10^{-4}$  i  $10^{-5}$  substitucions per nucleòtid copiat<sup>171</sup>. Aquesta elevada taxa de mutació es deguda a la manca d'activitat correctora de les RNA polimerases RNA depenents i les transcriptases reverses, juntament amb l'absència de mecanismes de reparació postreplicatius de l'RNA<sup>172,173</sup>. A més, l'intercanvi de fragments genòmics entre diferents molècules d'RNA o recombinació<sup>174</sup> contribueix també a generar nous mutants. Com a resultat, els virus RNA repliquen seguint unes complexes distribucions dinàmiques de mutants anomenades quasiespècies. Aquestes poblacions dinàmiques de genomes no idèntics representen un gran reservori de variants biològiques, que confereixen als virus RNA una gran capacitat d'adaptació a diferents ambients<sup>175</sup>.

L'anàlisi de seqüències de diferents regions del genoma de l'HAV en diferents poblacions ha mostrat que consisteix en una distribució de mutants, fet que demostra que aquest virus replica seguint una dinàmica de quasiespècies<sup>107</sup>.

Entre l'espectre de mutants generat durant la replicació de l'HAV, tant en soques

---

<sup>171</sup> Drake, J.W. & Holland, J.J. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci* 96: 13910-13913.

<sup>172</sup> Holland, J.J., de la Torre, J.C., Steinhauer, D.A. 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176: 1-20.

<sup>173</sup> Domingo, E. & Holland, J.J. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 151-178.

<sup>174</sup> Ball, L.A. 2001. Replication Strategies of RNA viruses. A: *Fields Virology*, 4rt Ed. Eds: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B. & Straus, S. D. Lippincott Williams & Wilkins. pp 105-132.

<sup>175</sup> Domingo, E. 1996. Biological significance of viral quasispecies. *Viral Hepatitis Rev.* 2:247-261.

---

adaptades a cultiu cel·lular<sup>176,177</sup>, com en una soca aïllada de sèrum<sup>178</sup>, s'ha detectat tan mutants puntuals com genomes recombinants<sup>97,107</sup>. De fet s'han descrit soques recombinants tan *in vivo* com *in vitro*. Per tant, malgrat que és un virus antigènicament poc variable amb un únic serotip descrit<sup>30</sup>, l'HAV presenta tan una taxa de variació nucleotídica com una taxa de recombinació similar a la de la resta de picornavirus<sup>97,107</sup>. Aquests nivells de variabilitat genètica han donat lloc a la diferenciació de l'HAV en diferents genotips i subgenotips.

Per tal de genotipar les soques de l'HAV s'han utilitzat diferents regions del genoma, entre elles la regió carboxi-terminal de VP3, la regió amino-terminal de VP1 i la VP1 sencera<sup>179</sup>. No obstant, la regió més àmpliament analitzada és un fragment de 168 pb de la regió VP1/2A<sup>180</sup>. A partir d'aquesta regió, les diferents soques de l'HAV es van classificar inicialment en set genotips diferents. Tanmateix, l'estudi de diferents regions del genoma ha donat lloc a certes discrepàncies en aquesta classificació. Aquest és el cas de l'anàlisi realitzat en un fragment de 900 nucleòtids de la proteïna estructural VP1, que dona com a resultat la classificació de les diferents soques en sis genotips<sup>181</sup>. Les soques que pertanyen al mateix genotip presenten un percentatge d'identitat superior al 85% i entre subgenotips aquest percentatge és superior al 92.5%. Les soques que s'agrupen en els genotips I, II i III són d'origen humà; els genotips IV, V i VI són soques de simi.

### 1.11. FETS ÚNICS I DIFERENCIALS DE L'HAV

L'HAV presenta una sèrie de característiques que el diferencien de la resta de membres de la família Picornaviridae (Taula 1.11.1). Entre aquestes, el fet de presentar a l'extrem 5' no codificant del genoma un IRES tipus III<sup>153</sup>, que és menys

<sup>176</sup> Beard, M.R., Cohen, L., Lemon, S.L. & Martin, A. 2001. Characterization of recombinant hepatitis A virus genomes containing exogenous sequences at the 2A/2B junction. *J. Virol.* 75: 1414-1426.

<sup>177</sup> Lemon, S.M., Murphy, P.C., Shields, P.A., Ping, L.H., Feinstone, S.M., Cromeans, T. & Jansen, R.W. 1991. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J. Virol.* 65: 2056-2065.

<sup>178</sup> Costa-Mattioli, M., Ferré, V., Casane, D., Perez-Bercoff, R., Coste-Burel, M., Imbert-Marcille, B., Andre, E.C.M., Bressollette-Bodin, C., Billaudel, S. & Cristina, J. 2003. Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. *Virology* 311: 51-59.

<sup>179</sup> Nainan, O.V., Xia, G.L., Vaughan, G. & Margolis, H.S. 2006. Diagnosis of hepatitis A virus infection : A molecular approach. *Clinical Micro. Rev.* 19 : 63-79.

<sup>180</sup> Robertson, B.H., Jansen, R.W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O.V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H.S., Isomura, S., Ito, K., Ishizu, T., Moritsugu, Y. & Lemon, S. M. 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographic regions. *J. Gen. Virol.* 73:1365-1377.

<sup>181</sup> Costa-Mattioli, M., Napoli, A.D., Ferre, V., Billaudel, S., Perez-Bercoff, R., & Cristina, J. 2003. Genetic variability of hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.* 84:3191-3201.



eficient en dirigir la traducció que els IRESs de la resta dels picornavirus<sup>155</sup>, i un *cis-acting replication element* (CRE), a l'extrem 5' de la regió que codifica per la polimerasa, més gran que els CREs dels altres membres de la mateixa família<sup>182</sup>.

D'altra banda, l'HAV també presenta diferències morfològiques i estructurals respecte la resta de picornavirus. Una d'aquestes diferències és el fet que en la formació del pentàmer hi intervé la proteïna VP1-2A, que s'associa amb les proteïnes VP0 i VP3, i no és fins més tard durant el procés de morfogènesis que la 2A és escindida de la partícula vírica madura per proteases de la cèl·lula hoste<sup>83</sup>. A més, l'HAV no presenta la regió del canó al voltant de l'eix quinari de simetria<sup>183</sup>, regió que en la majoria de picornavirus és el lloc d'unió al receptor cel·lular<sup>184</sup>.

Un altre tret característic de l'HAV és el fet de que només codifica per una proteasa, la 3C, mentre que la resta de picornavirus presenten proteases addicionals, com la proteasa L del gènere *Cardiovirus* o la proteasa 2A dels gèneres *Enterovirus* i *Rhinovirus*<sup>185</sup>. Existeixen evidències de que aquestes proteases s'encarreguen de tallar el factor iniciador de la traducció cel·lular eIF4G<sup>185</sup>, causant així el silenciament de la traducció cap-depenent de la cèl·lula, sense afectar a la traducció cap-independent i IRES-depenent del virus, de manera que tota la maquinària traduccional passa a estar disponible per al virus<sup>186</sup>. L'HAV no té aquestes proteases i, per tant, no pot induir el *shut off* cel·lular com ho fan altres picornavirus. Tanmateix, no s'ha d'oblidar que l'HAV també es caracteritza pel fet de necessitar el factor eIF4G per tal d'iniciar la traducció<sup>187</sup>.

Una altra característica de l'HAV que cal destacar és el fet de que existeix un únic serotip del virus<sup>30</sup>, a pesar de que presenta una variabilitat nucleotídica similar a la de la resta de picornavirus<sup>108</sup>, i, tal i com s'ha comentat anteriorment, replica seguint una dinàmica de quasiespècies<sup>107</sup>.

La baixa variabilitat antigènica, per la que només s'ha aïllat unes poques variants

---

<sup>182</sup> Yang, Y., Yi, M., Evans, D.J., Simmonds, P. & Lemon, S.M. 2008. Identification of a conserved RNA replication element (cre) within the 3Dpol-coding sequence of hepatoviruses. *J. Virol.* 82: 10118-10128.

<sup>183</sup> Cheng, H. Unpublished results.

<sup>184</sup> Fry, E.E. & Stuart, D.A. 2010. Virion Structure. In: *The Picornaviruses*. Ehrenfeld, E., Domingo, E., Ross, R. (Eds). ASM Press, Washington DC, USA, pp. 59-71.

<sup>185</sup> Leong, L.E.C., Cornell, C.T. & Semler, B.L. 2002. Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus. In: *Molecular biology of Picornaviruses*. Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds). ASM Press, Washington DC, USA, pp. 187-198.

<sup>186</sup> Kuechler, E., Seipelt, J., Liebig, H-D. & Sommergruber, W. 2002. Picornavirus proteinase-mediated shutoff of host cell translation: direct cleavage of a cellular initiation factor. In: *Molecular biology of Picornaviruses*. Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds). ASM Press, Washington DC, USA, pp. 301-312.

<sup>187</sup> Borman, A.M. & Kean, K.M. 1997. Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology* 237: 129-136.

---

antigèniques en pacients amb hepatitis A<sup>37,122</sup>, estaria relacionada amb les fortes constriccions, estructurals i biològiques, de la càpsida de l'HAV, les quals impedirien la emergència de nous serotips, ja que aquests serien seleccionats negativament<sup>108</sup>.

**Taula 1.11.1. Característiques úniques de l'HAV que el diferencien de la resta de picornavirus. Adaptat de Pintó i col·laboradors<sup>18</sup>.**

- *Presenta un IRES tipus III, altament ineficient dirigint la traducció*
- *Presenta un CRE en l'extrem 5' de la regió que codifica per la polimerasa 3D més gran que els CREs d'altres picornavirus*
- *Necessita el factor cel·lular eIFG4 per a la traducció i, per consegüent, no pot induir shut off cel·lular processant aquest factor com ho fan altres picornavirus. Per això l'HAV ha de competir amb la cèl·lula pels tRNAs i la maquinària traduccional*
- *Necessita la proteïna 2A durant la morfogènesis de la càpsida, particularment per a la formació del pentàmer. Les proteases cel·lular s'encarreguen després de extreure la 2A de la càpsida*
- *Les imatges de crio-electromicroscopia han revelat que la càpsida no presenta regió de solc o canyó diferenciades sinó que es força llisa*
- *Presenta una variabilitat nucleotídica similar a la de la resta de picornavirus però la diversitat a nivell d'aminoàcid en la regió de la càpsida és molt inferior i només existeix un únic serotip de l'HAV*
- *Presenta un important biaix en l'ús de codons que, a més, està deoptimitzat respecte l'ús de codons de la cèl·lula*
- *Té la capacitat d'inhibir o reduir la resposta cel·lular antivírica*
- *Presenta una replicació lenta i ineficient*

D'altra banda, l'HAV presenta una altra particularitat que, junt amb el fet que existeixi només un serotip del virus, el fan un virus molt especial: l'ús de codons altament deoptimitzat. Tal i com s'ha comentat anteriorment, aquesta estratègia de presentar un alt biaix en l'ús de codons és la que el virus ha adoptat davant una situació en la que no pot silenciar la síntesis proteïca de la cèl·lula, ja que necessita el factor eIF4G per a iniciar la traducció<sup>156</sup>, i ha de competir amb aquesta per la maquinària traduccional. El resultat d'aquesta deoptimització en l'ús de codons és que el virus s'ha adaptat a utilitzar codons freqüents i codons rars<sup>108</sup>. Així, el virus utilitza un total de 27 codons rars, definits segons les seves freqüències, els quals es troben repartits entre 15 famílies d'aminoàcids<sup>108</sup> (Taula 1.11.2).

**Taula 1.11.2. Ús de codons relatiu de l'HAV en comparació amb el de la cèl·lula humana. En negreta es mostren els codons que l'HAV utilitza com a rars. Extret de Sánchez i col·laboradors<sup>108</sup>.**

Aminoàcid	Codó	HAV	Cèl·lula humana
Arg	AGA	100	100
	<b>AGG</b>	29	99
	<b>CGC</b>	3	87
	<b>CGU</b>	3	38
	<b>CGA</b>	3	51
	<b>CGG</b>	1	95
	UGG	100	32
Leu	UUA	52	19
	CUU	46	33
	<b>CUG</b>	25	100
	<b>CUA</b>	9	17
	<b>CUC</b>	7	49
	UCU	100	77
Ser	UCA	84	62
	AGU	32	62
	<b>UCC</b>	28	91
	<b>UCG</b>	5	22
	<b>AGC</b>	5	100
	ACU	100	69
	ACA	91	79
Thr	<b>ACC</b>	18	100
	<b>ACG</b>	4	32
	CCU	100	88
	CCA	89	85
Pro	<b>CCC</b>	20	100
	<b>CCG</b>	2	35
	GCU	100	66
	GCA	61	56
Ala	<b>GCC</b>	30	100
	<b>GCG</b>	1	26
	GGA	100	73
	GGU	58	48
Gly	GGG	34	73
	<b>GGC</b>	28	100
	GUU	100	39
	GUG	46	100
Val	<b>GUA</b>	18	25
	<b>GUC</b>	13	52
	AAA	100	76
	AAG	59	100
Lys	AAU	100	88
	<b>AAC</b>	19	100
Asn	CAG	100	100
	CAA	88	35
Gln	CAU	100	71
	<b>CAC</b>	22	100
His	GAA	100	72
	GAG	77	100
Glu	GAU	100	86
	<b>GAC</b>	19	100
Asp	UAU	100	79
	<b>UAC</b>	26	100
Tyr	UGU	100	83
	<b>UGC</b>	26	100
Cys	UUU	100	85
	<b>UUC</b>	27	100
Phe	AUU	100	76
	AUA	32	35
Ile	<b>AUC</b>	16	100

Però el més interessant és que l'ús de codons de l'HAV és en certa manera antagònic al de la cèl·lula, de manera que el virus mai utilitza com a freqüent un codó que la cèl·lula utilitza en alta freqüència sinó que sovint utilitza aquest últim com a rar (Taula 1.11.2). Per això, el total de codons rars que el virus utilitza és el resultat dels codons que la cèl·lula ja utilitza com a rars més els que la cèl·lula utilitza amb una freqüència alta, ja que els tRNA amb els que s'aparellen aquests últims no es troben disponibles per al virus i, per tant, l'HAV també els utilitza com a rars<sup>108</sup>. Amb això el virus aconsegueix minimitzar la competència que ha d'establir amb la cèl·lula hoste pels tRNAs, ja que no posseeix d'un mecanisme específic per induir *shut off* de la síntesi proteica cel·lular<sup>108</sup>.

Tanmateix, l'ús de codons deoptimitzat que l'HAV presenta podria contribuir a la lenta replicació i la baixa producció característiques d'aquest virus. Aquesta idea es veu reforçada pel fet que la deoptimització artificial de l'ús de codons de poliovirus respecte el de la cèl·lula hoste dóna com a resultat mutants atenuats d'aquest virus<sup>26,188</sup>. A més, com que totes les proteïnes víriques estan codificades en una única pauta oberta de lectura, la baixa producció proteica també afectaria a les proteïnes encarregades de la replicació del RNA. Llavors, la baixa eficiència de replicació del virus podria contribuir a la baixa concentració d'RNAs intermediaris de doble cadena, fet que el virus aprofitaria per evitar o reduir la resposta antivírica de l'INF tipus I, la qual s'inicia per la presència d'aquesta molècula d'RNA intermediari<sup>25</sup>.

D'altra banda, s'ha demostrat que l'ús d'un codó o un altre per a un determinat aminoàcid pot modificar la velocitat de traducció en funció de la seva abundància i, per tant, del temps que el ribosoma requereix per al seu reconeixement<sup>158,159,189</sup>. Com a resultat, les acumulacions de codons rars indueixen parades transitòries del complex traduccional mentre aquest busca el tRNA apropiat, el qual es troba en baixes concentracions dins el *pool* de tRNAs cel·lulars. Malgrat que aquestes pauses del ribosoma poden tenir alguns efectes negatius en la síntesi proteica, com la degradació de la cadena de RNA<sup>160</sup>, la terminació prematura de la cadena polipeptídica que s'està sintetitzant<sup>161</sup> o la incorporació d'aminoàcids incorrectes<sup>161</sup>, també poden tenir la funció d'assegurar el correcte plegament de la proteïna que se

---

<sup>188</sup> Burns, C.C., Shaw, J., Campagnoli, R., Jorba, J., Vincent, A., Quay, J. & Kew, O. 2006. Modulation of Poliovirus replicative fitness in HeLa cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region.

<sup>189</sup> Varenne, S., Buc, J., Lloubes, R. & Lazdunski, C. 1984. Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. *J. Mol. Biol.* 180: 549-576.

---

sintetitzats<sup>162,163,190</sup>. Tenint en compte que el 15 % dels residus de la superfície de la càpsida de l'HAV estan codificats per codons rars i que aquests es troben en regions altament conservades i situades estratègicament als extrems carboxi-terminal de les proteïnes<sup>108</sup>, sembla que les parades del complex traduccional, degudes als codons rars, serien les responsables de garantir el correcte plegament de les proteïnes estructurals de l'HAV. Així doncs, mantenir els codons rars seria important per assegurar el correcte plegament de les proteïnes, i explicaria com l'ús de codons deoptimitzat podria contribuir a la baixa variabilitat de l'HAV.

Estudis en els que s'adaptava l'HAV a replicar en condicions de silenciament de la traducció o *shut off* induïdes per l'acció de l'AMD, han permès comprovar com n'és d'important el paper dels codons rars en la regió de la càpsida<sup>164</sup>: la caiguda de *fitness* que el virus experimenta al principi de ser cultivat en presència d'AMD va seguida per la recuperació del *fitness* durant el procés d'adaptació, la qual s'associa a un canvi en l'ús de codons de la regió de la càpsida que implica una re-optimització respecte l'ús de codons de la cèl·lula<sup>164</sup>. Aquest mecanisme d'adaptació al *shut off* cel·lular artificial demostra que la cinètica de traducció és la que determina el biaix en l'ús de codons de l'HAV en la regió de la càpsida, ja que intervé en la selecció de la combinació de codons rars i freqüents per a que el tràfic dels ribosomes permeti el correcte plegament de les proteïnes que s'estan sintetitzant (Fig. 1.11). Per contra, canvis en l'ús de codons que generessin canvis en el plegament de les proteïnes de la càpsida podrien ser seleccionats de forma negativa, cosa que explicaria la baixa variabilitat antigènica del virus i l'existència d'un únic serotip. De fet, l'anàlisi de quasiespècies de les poblacions víriques obtingudes a partir de la soca pHM175 43c de l'HAV i sota la pressió selectiva de dos MAb's diferents, el K34C8 i l'H7C27, va demostrar que els aminoàcids de la càpsida codificats per codons rars i pròxims als epítops reconeguts per aquests anticossos eren pràcticament invariables<sup>97</sup>.

El correcte plegament de les proteïnes de la càpsida de l'HAV determina en part l'elevada resistència front les altes temperatures, el pH àcid i els detergents<sup>30,191</sup>, així com l'elevada persistència ambiental<sup>109,192</sup> que presenta el virus. Cal recordar que el virus necessita aquest fenotip, amb una conformació de la càpsida altament cohesiva que aconsegueix gràcies al correcte plegament de les proteïnes, per tal

---

<sup>190</sup> Gavrilin, G.V., Cherkasova, E.A., Lipskaya, G.Y., Kew, O.M. & Agol, V.I. 2000. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J. Virol.* 74: 7381-7390.

<sup>191</sup> Martin, A. & Lemon, S.M. 2006. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* 43: S164-S172.

<sup>192</sup> Bosch, A. 1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int. Microbiol.* 1: 191-196.

d'afrontar els diferents punts crítics que es troba durant el cicle biològic.

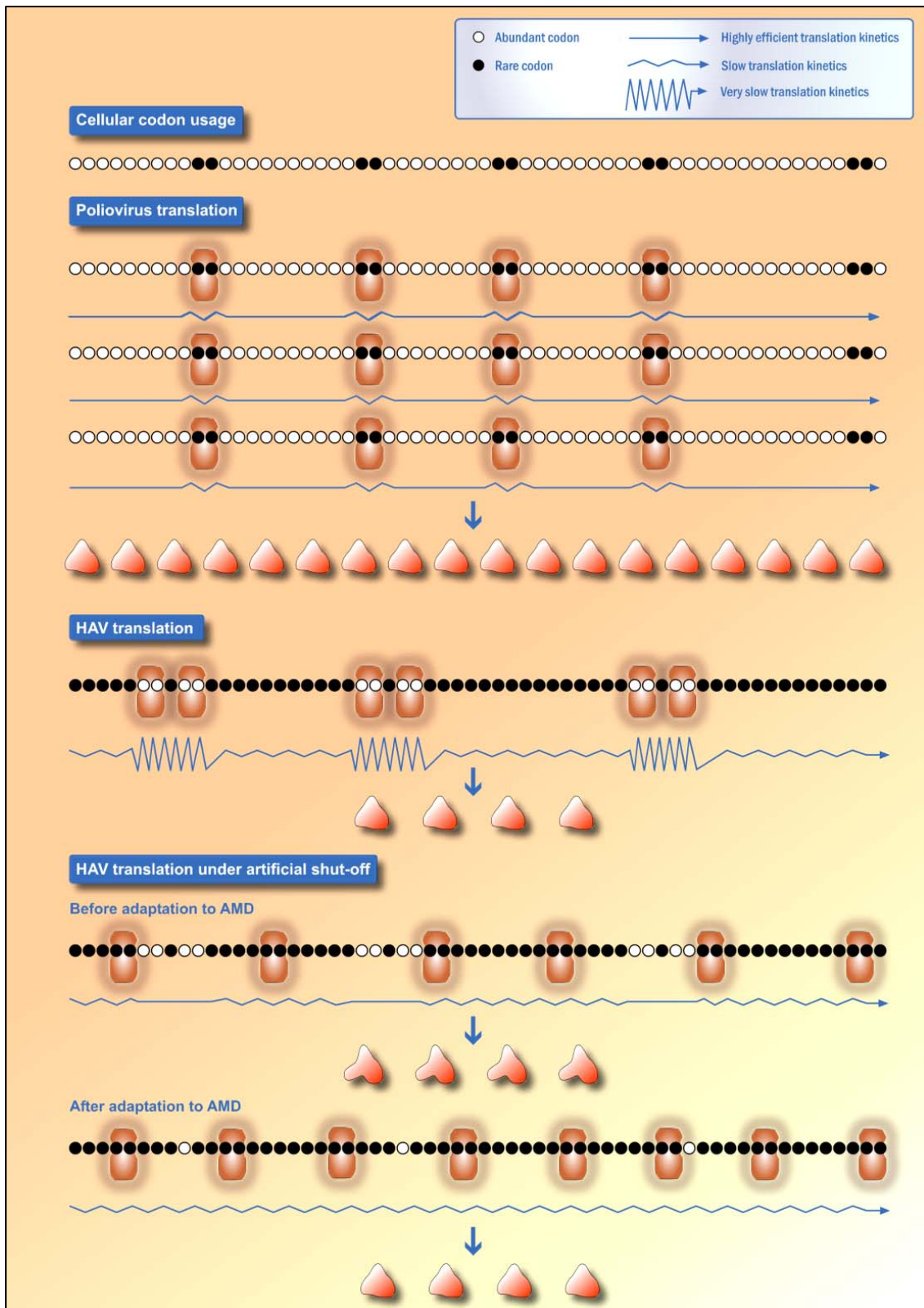


Fig. 1.11. Combinació de codons rars i abundants, o regulació fina de la cinètica de traducció, per a modular el tràfic dels ribosomes i permetre el correcte plegament de les proteïnes de la càpsida de l'HAV. Extret de Pintó i col·laboradors, 2012<sup>18</sup>.

En aquest sentit, el virus ha de superar el pH àcid de l'estómac en la fase d'entrada, la eliminació de sang en la fase virèmica i l'acció de proteases i detergents, especialment sals biliars, en la fase de sortida. Per tant, el virus necessita mantenir la combinació de codons abundants i rars per tal de regular la cinètica de traducció i que aquesta li permeti formar càpsides que resisteixin el pH àcid i sals biliars, i que escapin a la interacció amb determinats receptors que s'encarregarien d'eliminar el virus de sang. Un d'aquests receptors, que atrapen patògens en sang impedit que aquests arribin al seu teixit o òrgan diana, són les glicoproteïnes dels eritròcits<sup>193</sup>. L'HAV interacciona amb la glicoforina A de la membrana dels eritròcits, i la regió de la càpsida involucrada en aquesta interacció es localitza al voltant del potencial solc de la càpsida<sup>96</sup>. Tanmateix, aquesta interacció és molt ineficient a pH fisiològic mentre que és òptima a pH àcid, per la qual cosa es creu que l'HAV ha adoptat una conformació de la càpsida que li permet evadir la interacció amb l'eritròcit i evitar així ser eliminat de sang<sup>96</sup>. Per tant, aquest també seria un factor que contribuiria a la baixa variabilitat antigènica de la càpsida, ja que els mutants amb canvis d'aminoàcids en la regió d'unió a la glicoforina A podrien ser més fàcilment eliminats de sang. De fet, en el capítol 1 d'aquesta tesis s'ha estudiat com una única mutació en aquesta regió pot donar com a resultat un mutant amb una capacitat de replicació *in vitro* idèntica a la del virus parental<sup>97</sup> però amb una reducció del *fitness in vivo* pel fet de presentar una cinètica d'eliminació en sang més ràpida<sup>110</sup>. D'altra banda, amb la finalitat de demostrar l'important paper que exerceixen els codons rars en el plegament de les proteïnes de la càpsida de l'HAV, en el capítol 2 d'aquest treball s'ha analitzat l'estabilitat front condicions extremes i l'antigenicitat de la càpsida de diferents poblacions adaptades a replicar en diferents nivells de *shutt off* cel·lular. A més, en aquest mateix capítol s'ha estudiat com els canvis de conformació de la càpsida, conseqüència del canvi en l'ús de codons, modifiquen l'eficiència amb la que el virus supera algunes de les fases del cicle replicatiu.

---

<sup>193</sup> Gagneux, P. & Varki, A. 1999. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 9: 747-755.

## **2. OBJECTIUS**





- 1) Estudiar el perquè de la inexistència de variants naturals de l'HAV amb mutacions en el lloc d'unió a la glicoforina A dels eritròcits, mitjançant:
  - a. L'anàlisi, *in vitro*, de la capacitat d'unió a la glicoforina A del virus parental i un mutant d'escapament a l'anticòs monoclonal H7C27, dirigit contra el lloc d'unió a la glicoforina A.
  - b. L'anàlisi del *fitness in vivo* del virus parental i el mutant d'escapament a l'H7C27.
  
- 2) Demostrar que el plegament de les proteïnes de la càpsida de l'HAV necessita d'una cinètica de traducció regulada, mitjançant:
  - a. L'estudi de canvis en la conformació de la càpsida en les poblacions víriques quan es produeix un silenciament de la síntesi de proteïnes en la cèl·lula hoste.
  - b. L'estudi de l'efecte dels canvis que el virus experimenta durant l'adaptació a les condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lulars sobre l'estabilitat i la funció de la càpsida.
  - c. L'estudi de la relació entre els canvis durant l'adaptació a diferents condicions de silenciament de la síntesi proteica cel·lular i les caigudes i recuperacions del *fitness* del virus.



### **3. CAPÍTOL 1:**

**Una mutació puntual en el lloc d'unió a la glicoforina A del virus de l'hepatitis A incrementa la seva eliminació de sang i dóna com a resultat una variant atenuada**



## 3.1. ANTECEDENTS

L'HAV té un nombre limitat de llocs antigènics. L'epítot immunodominant, format per un conjunt d'epítots propers, es defineix per dos grups de mutants d'escapament que presenten canvis en els residus 70, 71 i 74 de VP3 i els residus 102, 171 i 176 de VP1<sup>1,2</sup>. Un altre lloc antigènic està representat per mutants en el residu 221 de VP1, i un tercer lloc antigènic, encara per definir, del qual encara no s'ha aïllat cap mutant d'escapament.

La gran incògnita en el cas de l'HAV segueix essent el baix aïllament de variants antigèniques naturals. Donat que s'han pogut aïllar aquest tipus de variants *in vitro*, en condicions adequades de pressió selectiva, la pregunta és si hi ha algun impediment per a la seva existència *in vivo*.

---

<sup>1</sup> Nainan, O.V., Brinton, M.A. & Margolis, H.S. 1992. Identification of amino-acids located in the antibody-binding sites of human hepatitis-A virus. *Virology* 191: 984-987.

<sup>2</sup> Ping, L.H. & Lemon, S.M. 1992. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J. Virol.* 66: 2208-2216.

---

La càpsida de l'HAV presenta un alt grau de conservació de la seqüència d'aminoàcids que correlaciona amb una molt baixa variabilitat antigènica i, en definitiva, es tradueix en la existència d'un únic serotip. Tanmateix, a pesar d'aquesta limitada variabilitat aminoacídica, cal tenir present que el virus replica seguint una dinàmica de quasiespècies<sup>3</sup>. La raó per la qual no existeix correlació entre el nivell de variabilitat genètica i fenotípica en la càpsida de l'HAV resideix, probablement, en la eliminació per pressió selectiva negativa de la majoria de mutacions no sinònimes. Aquest fet suggereix la existència de fortes constriccions estructurals en la càpsida del virus en comparació amb altres membres de la família dels picornavirus com poliovirus (PV) o el virus de la febre aftosa (FMDV), que presenten un número de mutacions no sinònimes per posició no sinònima un ordre de magnitud superior respecte el que presenta l'HAV<sup>4</sup>.

A més d'aquestes constriccions estructurals, des del punt de vista del cicle biològic del virus, cal tenir també en compte la existència de punts crítics que el virus hauria de superar abans d'arribar al seu teixit diana, el fetge. Aquest cicle s'inicia, habitualment, per ingestió del virus a través d'aliments o aigua contaminats. Un cop en l'aparell digestiu, el virus replica probablement a nivell de mucosa gàstrica o intestinal per tal d'amplificar l'inòcul inicial i, posteriorment, és absorbit a través de la mucosa de l'intestí prim arribant així al flux sanguini i produint una fase virèmica. A través de la sang arriba al fetge, on replica massivament. La progènie vírica es lliurada a la bilis a través de la qual arriba de nou al intestí prim. En aquest punt, els virus poden ser de nou absorbits o excretats en les femtes. Existeixen encara molts interrogants en el cicle biològic descrit i un d'ells és la fase virèmica. Anteriorment es creia que la virèmia era curta i baixa, però actualment, mitjançant l'ús de tècniques moleculars altament sensibles i reproduïbles de quantificació a temps real, s'ha pogut determinar que la virèmia dura de mitja més d'un mes després de l'inici dels símptomes i que el títol promig en aquest moment és encara de  $10^4$  genomes/ml<sup>5,6</sup>. Aquest fet ha canviat totalment el panorama de la fase virèmica. Pensant en aquesta fase, cal tenir en compte que els eritròcits han desenvolupat la capacitat d'unir específicament molts patògens i així eliminar-los de

---

<sup>3</sup> Sánchez, G., Bosch, A., Gomez-Mariano, G., Domingo, E. & Pinto, R.M. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315: 34-42.

<sup>4</sup> Sánchez, G., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2003. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J. Virol.* 77:452-459.

<sup>5</sup> Costafreda, M.I., Bosch, A. & Pinto, R.M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3846-3855.

<sup>6</sup> Bower, W., Nainan, O.V., Han, X. & Margolis, H. 2000. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J. Infect. Dis.* 182: 12-17.

---

la sang mitjançant la seva destrucció conjunta en melsa o fetge<sup>7</sup>. Per a dur a terme aquesta funció, els eritròcits disposen de la glicoforina A, la sialoglicoproteïna més abundant en la seva membrana, que actuaria com a *decoy receptor* o receptor esquer, ja que s'ha observat que té la capacitat d'unir-se a molts virus i bacteris<sup>8</sup>. S'ha descrit que l'HAV s'uneix a la glicoforina A dels eritròcits humans i que ho fa a través de la interacció dels residus localitzats al voltant del potencial solc de la càpside del virus, regió que coincideix amb el lloc d'unió amb l'anticòs monoclonal (MAb) H7C27<sup>9</sup>. No obstant, la interacció del virus infeccios és més ineficient en condicions de pH neutre, mentre que les càpsides buides, s'uneixen tant a pH neutre com a pH àcid<sup>9</sup>. El més interessant d'aquest fenomen radica en la hipòtesi de que la unió ineficient a pH neutre, que és la condició fisiològica de la sang, podria representar un mecanisme d'escapament a la neteja que duen a terme els eritròcits. A més, la diferent conformació que presenten les càpsides buides, i que els permet unir-se a pH neutre, pot representar un mecanisme més d'escapament a aquesta unió, ja que al ser més nombroses ocuparien els llocs d'unió evitant al màxim la unió d'alguna càpside infecciosa capaç d'interaccionar amb la glicoforina A. Aquest fenomen pot actuar com a selecció negativa davant potencials canvis d'aminoàcids en la regió pròxima al solc de la càpside, ja que canvis en aquesta regió podrien permetre la unió al eritròcit i, per tant, afavorir la eliminació del virus del torrent sanguini amb la conseqüent disminució del nombre de virus que arriben al fetge. Cal tenir en compte també la baixa taxa de replicació que presenta l'HAV i, per tant, la importància que pot tenir el fet d'escapar-se de la potencial eliminació exercida pels eritròcits.

També poden actuar com a pressió selectiva negativa el pH àcid, les sals biliars i els enzims digestius, de manera que qualsevol canvi en la càpside del virus que pugui alterar l'estabilitat que presenta el virus davant aquestes condicions donarà lloc a una variant probablement inviable.

L'estudi de l'espectre de mutants de l'HAV en presència de l'anticòs H7C27, dirigit contra la regió del solc de la càpsida, ha revelat l'emergència de mutants amb substitucions en els residus que defineixen aquesta regió, al voltant del residu 221

---

<sup>7</sup> Gagneux, P. & Varki, A. 1999. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 9: 747-755.

<sup>8</sup> Baum, J., Ward, R.H. & Conway, D.J. 2002. Natural selection on the erythrocyte surface. *Mol. Biol. Evol.* 19: 223-229.

<sup>9</sup> Sánchez, G., Aragonès, L., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A. & Pinto, R.M. 2004. Capsid region involved in hepatitis a virus binding to glycoporphin A of the erythrocyte membrane. *J. Virol.* 78: 9807-9813.

---



de VP1, els quals tenen un *fitness* que no difereix del virus parental *in vitro*<sup>10</sup>. En canvi, mutants d'escapament al MAb K34C8, que s'uneix al epítop immunodominant, tenen *in vitro* un *fitness* significativament inferior al del virus parental i només són capaços de desplaçar-lo en presència de l'anticòs al que són resistents<sup>10</sup>.

Malgrat les diferències de *fitness* observades entre els mutants amb canvis aminoacídics en la regió d'unió a la glicoforina A i en l'epítop immunodominant, cal destacar que en pacients només s'han aïllat variants antigèniques de l'epítop immunodominant<sup>11,12</sup>. Aquest fet, aparentment contradictori, podria ser explicat tenint en compte les constriccions biològiques imposades pel cicle enterohepàtic del virus en l'hoste comentades anteriorment.

Donat que el *fitness* dels mutants resistents a l'H7C27 ha resultat ser pràcticament idèntic al del virus parental *in vitro*, en el present capítol s'ha dut a terme la caracterització d'aquests mutants en un model *in vivo* ja que, com a mutants d'escapament que són, podrien ser candidats a vacunes de segona generació, i s'ha estudiat el paper que poden tenir les constriccions biològiques esmentades en el no aïllament de variants antigèniques naturals del lloc d'unió a la glicoforina A.

---

<sup>10</sup> Aragonès, L., Bosch, A. & Pinto, R.M. 2008. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J. Virol.* 82: 1688-1700.

<sup>11</sup> Perez-Sautu, U., Costafreda, M.I., Caylà, J., Tortajada, C., Lite, J., Sala, R., Barrabeig, I., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2011. Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 734-738.

<sup>12</sup> Pintó, R.M., D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, F.J., Costafreda, M.I., Ribes, E., Guix, S. & Bosch, A. 2012. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiol.* 7: 331-346.

---

## 3.2. MATERIAL I MÈTODES

### 3.2.1. CÈL·LULES I VIRUS

#### 3.2.1.1. Soques víriques

Aquest estudi es va realitzar amb la soca citopatogènica pHM-175 43c de l'HAV<sup>13</sup> i el mutant d'escapament G1217D obtingut a partir d'aquesta soca i sota la pressió selectiva del MAb H7C27<sup>10</sup>. El mutant G1217D presenta una substitució en el residu 217 de la proteïna VP1, molt proper al residu 221 que defineix el lloc d'unió a l'H7C27, i que és el responsable de la seva resistència a l'H7C27<sup>10</sup>, anticòs que comparteix lloc d'unió amb la glicoforina A<sup>9</sup>.

---

<sup>13</sup> Cromeans, T., Sobsey, M.D. & Fields, H.A. 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. J. Med. Virol. 22: 45-56.

---

### 3.2.1.2. Línies cel·lulars

El virus parental pHM-175 43c i el mutant G1217D es feren replicar a les cèl·lules FRhK-4 (ATCC CRL 1688), línia cel·lular epiteloide i contínua derivada de cèl·lules embrionàries de ronyó de mono rhesus (*Macaca mulatta*).

La línia cel·lular FRhK-4 es cultivava a 37°C en medi essencial mínim (MEM) suplementat amb un 15% de sèrum fetal de vedella (*fetal calf serum*, FCS), aminoàcids no essencials (NEAA), antibiòtics i solucions tamponadores. Aquestes cèl·lules es subcultivaven cada 7-8 dies i amb una relació de multiplicació 1:3, obtenint una monocapa confluent després de la incubació durant 2-3 dies a 37°C. El suport físic utilitzat per al creixement de les cèl·lules eren flascons plans de poliestirè de 175 cm<sup>2</sup> de superfície (T-175 cm<sup>2</sup>).

#### SOLUCIONS NECESSÀRIES:

##### MEM 15% FCS:

FCS.....15% (v/v)  
L-Glutamina (400 mM).....4mM  
NEAA (100x).....1x  
HEPES 1M.....15mM  
Bicarbonat (7.5% (p/v)).....2% (v/v)  
Penicilina/Estreptomicina.....100U/ml-100µg/ml  
En MEM 1x amb sals de Earle autoclavats 15'  
Suplementar en condicions d'esterilitat

##### Tripsina-EDTA:

Tripsina.....0.25% (p/v)  
EDTA.....0.5 mM  
En PBS  
Esterilitzar per filtració  
Conservar a -20°C

##### PBS:

NaCl.....8 g/l  
KCl.....0.20 g/l  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1.15 g/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0.20 g/l  
En H<sub>2</sub>O Milli-Q, pH 7.2  
Esterilitzar per autoclau  
Conservar a 4°C

---

### 3.2.1.3. Replicació del virus parental pHM-175 43c i del mutant G1217D

Les suspensions víriques emprades en aquest estudi s'obtenien infectant amb la soca parental pHM-175 43c o amb el mutant G1217D cèl·lules FRhK-4 que formaven monocapes en flascons de cultiu T-175 cm<sup>2</sup>. El protocol que se seguia es detalla a continuació:

- Decantar el medi de creixement dels flascons de cultiu i infectar la monocapa cel·lular amb una multiplicitat de infecció (MOI) d'1 virus infecció per cada cèl·lula. Quan la infecció es realitzava amb els mutants, abans d'inocular els virus en la monocapa cel·lular, aquests eren tractats durant 2 hores a 37°C amb una dilució 1:100,000 de l'anticòs monoclonal H7C27 (màxima dilució en la que aquest anticòs causava una neutralització de la infectivitat superior al 95% del virus parental).
- Incubar els flascons infectats a 37°C durant 60 minuts per a permetre l'adsorció del virus a les cèl·lules.
- Incorporar el medi post-infecció, de composició idèntica al medi de creixement però amb un 2% de FCS. En el cas dels mutants, aquest medi era suplementat també amb l'H7C27 diluït 1:100,000 en el medi.
- Incubar a 37°C fins tenir un efecte citopàtic (ECP) generalitzat (7-9 dies després de la infecció).
- Lisar les cèl·lules mitjançant tres cicles de congelació – descongelació a -80°C.
- Centrifugar el cultiu lisat a 4,000 x g durant 20 minuts per tal d'obtenir una suspensió vírica lliure de restes cel·lulars.
- Guardar la suspensió vírica a -80°C, excepte les alíquotes en ús que es guardaven a 4°C.

### 3.2.1.4. Obtenció de suspensions concentrades d'HAV purificat

Per tal d'obtenir estocs vírics concentrats, s'aplicava el mètode descrit per Bishop i col·laboradors, 1994<sup>14</sup>, amb algunes petites modificacions:

- Infectar monocapes confluents de cèl·lules FRhK-4, crescudes en flascons T-175 cm<sup>2</sup>. La infecció es duia a terme de la mateixa manera que s'ha detallat en l'apartat anterior.

---

<sup>14</sup> Bishop, N.E., Hugo, D.L., Borovec, S.V. & Anderson, D.A. 1994. Rapid and efficient purification of hepatitis-A virus from cell-culture. J. Virol. Methods 47: 203-216.

- Incubar durant 5-6 dies a 37°C, fins a l'aparició de les primeres mostres d'ECP.
- Decantar del medi de cultiu i dispersió de les cèl·lules mitjançant un tractament amb tripsina-EDTA al 0.25 i 0.02% (p/v) respectivament.
- Centrifugar les cèl·lules, després d'afegir MEM 2% FCS per inactivar la tripsina, a 3,000 x g durant 10 minuts.
- Resuspendre les cèl·lules en MEM 0% FCS i repetició de la centrifugació anterior.
- Resuspendre les cèl·lules en tampó isotònic Tris-Clorur sòdic (tampó NT) a raó de 500 µl/flascó, i lisis de membranes cel·lulars mitjançant l'addició del detergent Nonidet P-40 fins una concentració final del 1% (v/v).
- Incubació de 30 minuts a temperatura ambient.
- Centrifugació a 1,700 x g durant 5 minuts per eliminar els nuclis cel·lulars.
- Centrifugació del sobrenedant a 13,000 x g durant 5 minuts per eliminar altres restes cel·lulars.
- Recuperar el sobrenedant i guardar-lo a -80°C.

#### SOLUCIONS NECESSÀRIES:

##### MEM 0% FCS:

L-Glutamina (400 mM).....4mM  
NEAA (100x).....1x  
HEPES 1M.....15mM  
Bicarbonat (7.5% (p/v)).....2% (v/v)  
Penicilina/Estreptomicina.....100U/ml-100µg/ml  
En MEM 1x amb sals de Earle autoclavats 15'  
Suplementar en condicions d'esterilitat

##### Tampó NT:

Tris-HCl.....10mM  
NaCl.....100mM  
En H<sub>2</sub>O Milli-Q  
Esterilitzar per autoclau

### 3.2.1.5. Quantificació del títol infeccios de les suspensions de HAV: CÀLCUL DE LA TCID<sub>50</sub>/ml

La quantificació del títol víric infeccios de les suspensions d'HAV es realitzava segons el càlcul de la TCID<sub>50</sub>, que es defineix com la dosi vírica que provoca la destrucció del 50% de les monocapes cel·lulars infectades. Per a dur a terme aquesta titulació, s'infecten monocapes de cèl·lules FRhK-4 en plaques de 96 pous. Breument, el protocol que se seguia era:

- Descartar el medi de creixement de les plaques de 96 pous amb monocapes confluents de FRhK-4.
- Inocular a la placa dilucions seriades 1:10 en PBS de la suspensió vírica a titular. Concretament, s'inoculava una columna (8 pous) per cada dilució, afegint 20 µl a cada pou. Com a control negatiu s'afegia el mateix volum de PBS als 8 pous d'una columna de la placa.
- Incubar la placa a 37°C durant 60 minuts en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO<sub>2</sub>.
- Afegir el medi post-infecció, d'igual composició al medi de creixement però amb un 2% de FCS.
- Incubar a 37°C durant 11 dies.
- Realitzar les lectures de presència/absència d'ECP per cada pou inoculat de la placa als 8-9 dies i efectuar una lectura addicional i definitiva als 11 dies.
- Calcular la TCID<sub>50</sub> segons la fórmula descrita en el mètode de Behrens i Kärber<sup>15</sup> i que es detalla a continuació:

$$\text{LogTCID}_{50} = I_r + 1/2d - 1 \sum (p_i + 1)$$

on:

**I<sub>r</sub>** és el logaritme en base 10 de la dilució més alta que dona el 100% d'ECP, és a dir, la destrucció de les 8 rèpliques.

**d** és el logaritme de la sèrie dilucional.

**p<sub>i</sub>** és la proporció de resposta positiva en les dilucions amb ECP en menys de les 8 rèpliques.

D'aquesta manera, i tenint en compte que el volum de l'inòcul era de 20 µl, s'obtenia la quantificació del títol víric de les suspensions expressat com la dosi infecciosa que provoca la destrucció del 50% de les monocapes cel·lulars per mil·lilitre (TCID<sub>50</sub>/ml).

---

<sup>15</sup> Kärber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. Exp. Path. Pharm. 162: 480.

### **3.2.2. OBTENCIÓ DE FRACCIONS PURIFICADES 150S I 70S DE L'HAV**

Per tal de separar el virus infeccios (150S) de les partícules buides que no han encapsidat el genoma (70S), es partia de suspensions concentrades del virus obtingudes tal i com s'ha descrit en el punt 3.2.1.4. i se seguia el protocol descrit per Bishop i col·laboradors, 1994<sup>14</sup>:

- Sonicar els virus recuperats en el sobrenedant, tres cicles de 30 segons a 60 W, en presència de 0.4% de SDS.
- Ultracentrifugar aquests estocs vírics concentrats a través de gradients de sacarosa del 5 al 45%, a 205,000 x g durant 165 minuts. En cada gradient es carregava el volum de concentrat de virus corresponent al processament de 2 flascons T-175 cm<sup>2</sup>.
- Recol·lectar el gradient en fraccions de 0.5 ml.

La identificació de les fraccions 150S, amb el virus infeccios, i 70S, amb partícules buides, es realitzava en funció del coeficient de sedimentació i l'antigenicitat obtinguda mitjançant un ELISA de captura, en el que l'HAV es capturava amb un sèrum convalescent (HCS-2), amb el que prèviament s'havia sensibilitzat la placa, i es detectava mitjançant l'anticòs monoclonal K34C8, dirigit contra l'epítot immunodominant i capaç de reconèixer per igual al virus parental pHM175 43c i al mutant G1217D. El protocol que se seguia en l'ELISA es detalla a continuació:

- Afegir a una placa de 96 pous 50µl/pou de l'anticòs policlonal HCS-2 diluït 1:10,000 en tampó de recobriment i incubar durant una nit a 4°C.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó d'ELISA.
- Bloquejar la placa amb 50µl/pou de tampó d'ELISA durant 1 hora a 37°C.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó d'ELISA.
- Afegir 50µl/pou de cada una de les fraccions dels gradients a analitzar i incubar a 37°C durant 2 hores. En cada assaig es realitzaven un mínim de 4 rèpliques per virus i MAb.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó d'ELISA.
- Afegir 50µl/pou del MAb K34C8 diluït 1:10,000 en tampó d'ELISA i incubar durant 3 hores a 37°C.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó ELISA.

- Afegir 50µl/pou de l'anticòs policlonal anti-IgG de ratolí (Sigma) conjugat amb peroxidasa diluït 1:10,000 (seguint les instruccions del proveïdor). Incubar a 37°C durant 1 hora.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó d'ELISA.
- Afegir 50µl/pou de tampó citrat-OPD (1,2, fenilendiamine) i incubar a 37°C fins l'aparició de color (aproximadament 10 minuts).
- Neutralitzar la reacció cromogènica amb 25µl/pou d'àcid sulfúric 1N.
- Lectura de l'absorbància a 492 nm amb un lector automàtic MULTISKAN PLUS (Labsystems).

#### SOLUCIONS NECESSÀRIES:

##### Tampó de recobriment:

NaCO<sub>3</sub>.....15 mM  
NaHCO<sub>3</sub>.....35 mM  
En H<sub>2</sub>O<sub>D</sub>, pH 9.6  
Conservar a 4°C durant un màxim de 15 dies

##### Tampó d'ELISA:

BSA.....3mg/ml  
Tween 20.....0.05% (v/v)  
En PBS  
Conservar a -20°C

##### Tampó citrat:

Citrat sòdic.....30 mM  
Àcid cítric.....20 mM  
En H<sub>2</sub>O Milli-Q  
Conservar a -20°C

##### Tampó citrat-OPD:

OPD.....4 mM  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%).....0.1% (v/v)  
En tampó citrat  
Ús immediat



El coeficient de sedimentació s'anализava mitjançant l'índex de refracció, que era de 1.3815 per les 150S i de 1.3690 per les 70S. Un cop identificades les fraccions 150S i 70S, s'agrupaven les 150S i 70S de diferents gradients, i es dialitzaven durant 48 hores a 4°C en aigua bidestil·lada per tal d'eliminar la sacarosa.

La determinació del títol de la fracció 150S es realitzava mitjançant la RT-PCR a temps real de la regió 5' no codificant (5'NCR) del genoma de l'HAV, descrita per Costafreda i col·laboradors, 2006<sup>5</sup> (Annex) i que es detalla en l'apartat 3.2.6.1 d'aquest capítol. El de la fracció 70S s'inferia a partir de l'antigenicitat relativa d'aquesta fracció comparada amb la de la fracció 150S i tenint en compte la relació antigenicitat/còpies genòmiques d'aquesta última fracció.

### **3.2.3 ANÀLISIS DE LA CAPACITAT D'HEMAGLUTINACIÓ DEL VIRUS PARENTAL I EL MUTANT G1217D**

#### **3.2.3.1. Purificació dels eritròcits**

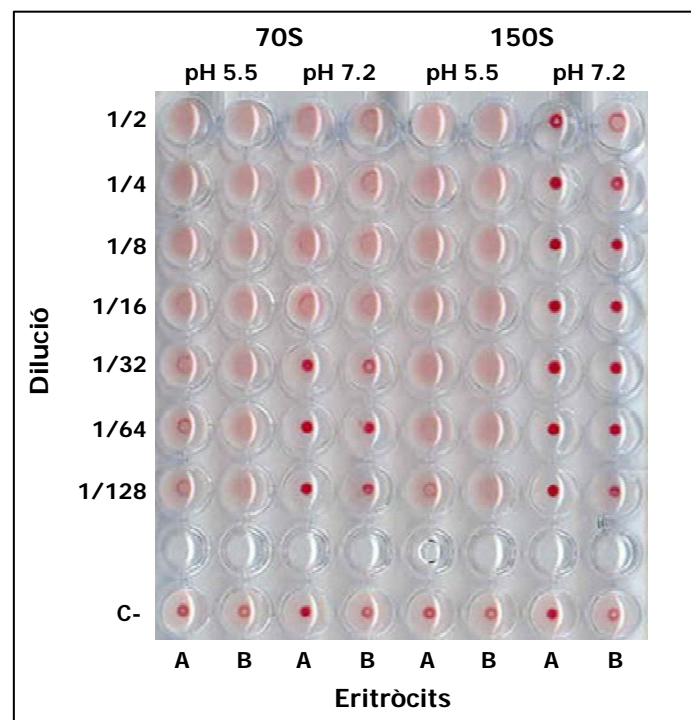
Els assajos d'hemaglutinació es realitzaven amb eritròcits humans tipus O (purificats a partir de sang proporcionada pel Banc de Sang de l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona) i eritròcits de rata Wistar femella adulta. La purificació dels eritròcits es realitzava mitjançant gradients preformats de Percoll (Farmacia Biotech) i seguint el protocol descrit per Sánchez i col·laboradors, 2004<sup>9</sup>:

- Formar el gradient centrifugant 10 ml de solució de Percoll 70% 150 mM NaCl, a 20,000 x g durant 15 min.
- Extreure 2 ml de la part inferior del gradient i afegir 2 ml de sang heparinitzada, diluïda al 50% en 150 mM NaCl, en la part superior del gradient.
- Centrifugar la mostra a 400 x g durant 5 min.
- Extreure la capa de trombòcits que queden a la part superior del gradient i substituir-la pel mateix volum de 150 ml NaCl.
- Centrifugar a 800 x g durant 15 min.
- Separar la fracció amb els eritròcits que, abans dels assajos d'hemaglutinació que s'efectuaven immediatament després de la purificació, es sotmetien a tres cicles de rentat en PBS a pH 5.5 o 7.2, recuperant les cèl·lules per centrifugació a 500 x g durant 5 min i resuspenent-les en PBS amb igual pH que el dels rentats.

### 3.2.3.2. Anàlisi de la capacitat d'hemaglutinació.

Aquests experiments es realitzaven en plaques de 96 pous de fons rodó (pous en forma de U). S'utilitzaven dilucions seriades 1:2 de l'antigen víric (fraccions 150S i 70S de virus parental i mutant G1217D, obtingudes segons s'ha detallat en l'apartat 1.2.2.) que es feien en PBS a pH 5.5 o 7.2.

A cada pou s'hi afegien 20 µl de les partícules víriques diluïdes i 20 µl d'una suspensió amb  $5 \times 10^4$  eritròcits/ml a pH 5.5 o 7.2. La barreja s'incubava a temperatura ambient durant unes 3 hores durant les quals es realitzaven diferents lectures d'hemaglutinació (absència de botó, Fig. 3.2.3.2) fins obtenir una lectura definitiva. Com control negatiu (formació de botó per precipitació dels eritròcits, Fig. 3.2.3.2) s'utilitzava 20 µl de PBS amb el mateix volum de suspensió d'eritròcits i les mateixes condicions.



**Fig. 3.2.3.2. Imatge obtinguda a partir d'un assaig d'hemaglutinació en la que es pot observar l'absència de botó, en els pous on hi ha hemaglutinació, i la presència del botó, format per la precipitació dels eritròcits, en els pous on no hi ha hemaglutinació.**

El títol d'hemaglutinació es determinava en funció de la quantitat de virus presents en l'última dilució capaç de causar una aglutinació total dels eritròcits. Per tant, es definia una unitat d'hemaglutinació com el nombre de virus infecciosos 150S o el nombre de partícules 70S capaç de provocar l'hemaglutinació de  $10^6$  eritròcits. Tal i

com s'ha comentat anteriorment, el títol de la fracció 150S s'obtenia mitjançant RT-PCR a temps real. En canvi, en el cas de la fracció 70S, amb les partícules que encara no han encapsidat el genoma, el títol s'inferia a partir dels valors d'antigenicitat obtinguts en els ELISA de captura i en comparació amb els de la fracció 150S i tenint en compte la relació antigenicitat/copies genòmiques d'aquesta última fracció.

### **3.2.4. PROVES DE RESISTÈNCIA DEL VIRUS PARENTAL pHM175 43c I DEL MUTANT G1217D AL pH ÀCID, SALS BILIARS I TRIPSINA**

Per tal d'avaluar la resistència del virus parental i els mutants en condicions adverses, els virus van ser incubats a pH àcid o en presència de sals biliars o tripsina. El tractament a pH àcid es va realitzar incubant els virus a 37°C durant 1 i 3 hores a pH de 1.0, 2.0 i 3.5. Per als tractaments amb sals biliars i tripsina, els virus es van incubar a 37°C amb 1% de sals biliars i 0.25% de tripsina respectivament, durant 4 i 8 hores. Com a control s'utilitzaven els mateixos estocs vírics que en el cas dels tractaments però, en aquest cas, només eren sotmesos a incubació a 37°C, sense cap tipus de tractament, durant els temps corresponents. Després de les diferents incubacions es quantificava el títol infecció segons el càlcul de la TCID<sub>50</sub>/ml, tal i com s'ha detallat en l'apartat 3.2.1.5. Comparant les quantificacions dels controls i els virus tractats, es calculaven les caigudes dels títols després dels diferents tractaments.

### **3.2.5. INOCULACIÓ DE L'HAV EN RATA WISTAR I OBTENCIÓ DE MOSTRES**

Amb l'objectiu de monitoritzar la cinètica de desaparició de l'HAV en sang es va inocular el virus parental pHM175 43c i el mutant G1217D, resistent a l'anticòs monoclonal H7C27, en rates Wistar femelles adultes i es quantificà el virus en sèrum en diferents temps. Es van inocular 7 rates Wistar femelles adultes (175-200g) per a cada virus seguint el protocol que es descriu a continuació:

- Preparar la suspensió de virus parental o de mutant G1217D a inocular segons el protocol descrit en l'apartat 1.2.1.3.
- Anestesià la rata a inocular amb isofluorà 2-5% per via inhalatòria.
- Inocular 1 ml de la suspensió vírica amb 10<sup>8</sup> còpies genòmiques/ml per via intravenosa, concretament per la vena caudal.

- Obtenir mostres sanguínies als temps d'1, 5, 15, 30 i 60 min i 3, 6, 12 i 24 hores. L'extracció de les mostres es realitzava, en l'animal prèviament anestesiats amb isofluorà 2-5%, per punció en vena safena. El volum de mostra que s'extreia era de 200-300 µl/animal.
- A les 48 hores es practicava el sacrifici dels animals mitjançant injecció letal (Ketamina + Xilacina) i s'obtenien mostres de sang, melsa i fetge.

Per tal d'estudiar l'efecte de la cinètica d'eliminació en la biodistribució dels virus pHM175 43c i mutant G1217D, 9 rates van ser inoculades amb la soca parental pHM175 43c i 9 rates més amb el G1217D . La concentració vírica inoculada i el protocol que es va seguir es detalla a continuació:

- Preparar la suspensió de virus parental o de mutant G1217D a inocular segons el protocol descrit en l'apartat 3.2.1.3.
- Anestesiats la rata a inocular amb isofluorà 2-5% per via inhalatòria.
- Inocular 1 ml de la suspensió vírica per la vena caudal.
- Recollir mostres de femta als 3, 5, i 7 dies després de la inoculació del virus de les 18 rates. Als 7 dies es recollia també mostres de sang de les 18 rates mitjançant punció de la vena safena, prèvia anestèsia de les rates amb isofluorà 2-5%. Arribat aquest punt se sacrificaven 3 animals de cada lot i es recollien mostres de fetge i melsa.
- Recollir mostres de femta dels 12 animals restants als 10, 12 i 14 dies des de la inoculació del virus. Als 14 dies es recollia mostres de sang dels 12 animals i se sacrificaven 3 animals més de cada lot, obtenint novament mostres de melsa i fetge.
- Recollir mostres de femta dels 6 animals restants als 21 dies des de la inoculació. Als 21 dies se sacrificaven els 6 animals restants per tal d'obtenir les últimes mostres de sang, melsa i fetge.

A més, es va realitzar un experiment complementari, seguint el protocol d'inoculació que s'acaba de detallar, però emprant 4 lots de 9 animals cada un: 2 dels lots varen rebre el virus parental o el mutant G1217D sense tractar i els 2 lots restants van ser inoculats amb el virus parental o el mutant prèviament inactivats mitjançant la seva exposició a la llum UV (254 nm) durant 3 hores. La recol·lecció de les mostres s'efectuava també tal i com s'ha descrit anteriorment exceptuant que en aquest cas les mostres de femta entre els 14 i els 21 dies es recollien cada dia.

També es varen dur a terme experiments de competència en els que, partint de les mateixes suspensions víriques emprades en els anàlisi de la cinètica d'eliminació i biodistribució de l'HAV, es van inocular 7 rates amb una barreja 50:50 de cada virus i 7 rates més amb una barreja 10:90 de pHM175 43c i G1217D respectivament. En tots els casos la concentració de l'inòcul era de  $10^8$  genomes/ml i el volum a inocular era d'1ml.

Un segon experiment de competències va ser realitzat de forma addicional afegint a l'inòcul el MAb H7C27 diluït 1:1,000 en les barreges de virus corresponents.

### **3.2.6. ANÀLISI DE L'ELIMINACIÓ DEL VIRUS DE SANG**

#### **3.2.6.1. Quantificació de l'HAV en sèrum**

Per a l'anàlisi de les mostres de sang de les rates inoculades amb el virus parental o amb el mutant G1217D, se separava el sèrum del paquet cel·lular mitjançant una centrifugació a  $3,000 \times g$  durant 10 minuts. Els àcids nucleics de 150  $\mu$ l de sèrum s'extreien utilitzant el kit NucleoSpin RNA Virus de Macherey-Nagel i 5  $\mu$ l de la suspensió d'àcids nucleics s'utilitzaven per a la quantificació del virus present en la mostra mitjançant RT-PCR a temps real d'un fragment de la regió 5'NCR del genoma de l'HAV amb el *kit Brilliant<sup>®</sup> QRT-PCR Core Reagent kit, 1 step* (Stratagene). Per a l'amplificació d'aquest fragment del 5'NCR s'utilitzaven els primers HAV 68 (5' TCACCGCCGTTTGCCTAG 3') i HAV 240 (5' GGAGAGCCCTGGAAGAAAG 3'). Els controls d'extracció i RT-PCR i el protocol de la RT-PCR a temps real, el qual es detalla a continuació, són els descrits per Costafreda i col·laboradors, 2006<sup>5</sup> (Annex).

L'aparell de RT-PCR a temps real utilitzat era el Mx3000P (Stratagene) i els resultats de les quantificacions s'analitzaven amb el programa MxPro proporcionat per la mateixa casa comercial de l'aparell.

Preparació de la barreja de reacció per a la RT-PCR a temps real			
Reactiu		Volum	Concentració final
10X Core RT-PCR Buffer		2.5 µl	1X
50 mM MgCl <sub>2</sub>		1 µl	2 mM
5mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP (20 mM dNTP)		1 µl	0.2 mM
0.1 mM <i>primer</i> HAV 68 (Sigma Aldrich)		0.15 µl	0.6 µM
0.1 mM <i>primer</i> HAV 240 (Sigma Aldrich)		0.15 µl	0.6 µM
50 µM sonda HAV 150(-)		0.125 µl	0.25 µM
80 U/µl StrataScript Reverse Transcriptase diluïda 1:8		0.5 µl	5 U
5 U/µl SureStart Taq DNA Polymerase		0.25 µl	1.25 U
H <sub>2</sub> O desionitzada lliure de DNases i RNases (Invitrogen)		14.33µl	
Extracte d'àcids nucleics		5 µl	
Volum total		25 µl	
Programa de RT-PCR:			
Fases de la RT-PCR	Temperatura	Temps	Cicles
Transcripció Reversa	50°C	60'	1X
Desnaturalització inicial/ Activació polimerasa	95°C	10'	1X
Desnaturalització	95°C	15''	45X
Hibridació	60°C	1'	
Extensió	70°C	1'	
La fluorescència es mesurava al final de cada cicle			

### 3.2.6.2. Quantificació de l'HAV unit als eritròcits

Els virus units als eritròcits als 5, 15 i 30 min també van ser quantificats. En aquest cas, calia separar els virus del paquet cel·lular mitjançant la preparació d'un homogenat en una solució de Proteïnasa K (100 µg/ml) amb una relació 1:1 (p/v).

Aquest homogenat s'incubava a 37°C durant 2 hores i en constatació. A continuació, se separava la part més grollera de l'homogenat centrifugant a 3,000 x g durant 5 min. Els àcids nucleics de 150 µl del sobrenedant obtingut eren extrets i quantificats tal i com s'ha descrit en el cas del sèrum.

### 3.2.6.3. Anàlisi de la variació de les proporcions en sèrum de virus parental i mutant G1217D

En els estudis de competència, els àcids nucleics extrets a partir del sèrum s'utilitzaven en l'amplificació i seqüenciació del fragment que codifica la regió de la càpside que conté la mutació que diferencia el pHM175 43c del mutant G1217D. El protocol detallat per a l'amplificació i seqüenciació del fragment de VP1 comprés entre els aminoàcids 85 i 245 es mostra a continuació:

#### 1) Amplificació.

Per a l'amplificació del fragment de VP1 amb el marcador genètic per diferenciar el virus parental pHM175 43c del mutant G1217D s'empraven els primers VP1-2965<sup>10</sup> (5' TCTGTGACAGACAGACAAATAACAAC 3') i HAV VP1' (5' CAGTTTGTCTATTGACTACA 3'). El protocol que se seguia era el següent:

10 µl dels àcids nucleics extrets		
Xoc tèrmic 5 min a 99°C		
Es col·locaven immediatament en gel		
Preparació de la barreja de reacció per a la RT		
Reactiu	Volum	Concentració final
5X Tampó de RT Expand (Roche)	5 µl	1X
100 mM DTT (Roche)	2.5 µl	10 mM
2mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP (Epicentre)	2.5 µl	0.2 mM
0.1 mM primer VP1-2965 (Sigma Aldrich)	0.125 µl	1 µM
50 U/ µl Transcriptasa Reversa Expand (Rohce)	0.16 µl	8 U
H <sub>2</sub> O desionitzada lliure de DNAses i RNAses (Invitrogen)	4.715 µl	
Àcids nucleics extrets	10 µl	
Volum total	25 µl	
<b>Incubar a 45°C durant 1h</b>		

Preparació de la barreja de reacció per a la PCR			
Reactiu	Volum	Concentració final	
10X Tampó de PCR Expand + 15 mM MgCl <sub>2</sub> (Roche)	5 µl	1X	
2mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP (Epicentre)	5 µl	0.2 mM	
0.1 mM <i>primer</i> VP1-2965 (Sigma Aldrich)	0.5 µl	1 µM	
0.1 mM <i>primer</i> HAV VP1' (Sigma Aldrich)	0.5 µl	1 µM	
3.5 U/ µl High Fidelity PCR Expand polimerasa (Roche)	0.15 µl	0.5 U	
H <sub>2</sub> O desionitzada lliure de DNAses i RNAses (Invitrogen)	23.85 µl		
Producte de la reacció de RT	10 µl		
Volum total	50 µl		
Programa de PCR:			
Fases de la PCR	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	94°C	4'	1X
Desnaturalització	94°C	30"	40X
Hibridació	45°C	30"	
Extensió	72°C	1' 30"	
Extensió final	72°C	7'	1X

## 2) Purificació de l'amplímer.

Finalitzat el procés, 40 µl del producte amplificat barrejats amb 8 µl de tampó de càrrega 6X eren sotmesos a electroforesi en gel d'agarosa al 1.5% en TBE 1X. El gel era tenyit en una solució de TBE i bromur d'etidi a una concentració de 0.5 µg /ml i els amplímers es visualitzaven mitjançant llum ultravioleta en un amplificador d'imatges (ImageMaster VDS, AMERSHAM BIOSCIENCES). La banda amb l'amplímer desitjat, de 240 pb, es retallava sota la llum d'un transil·luminador i l'amplímer es purificava utilitzant el *kit High Pure PCR product Purification kit* (Roche).

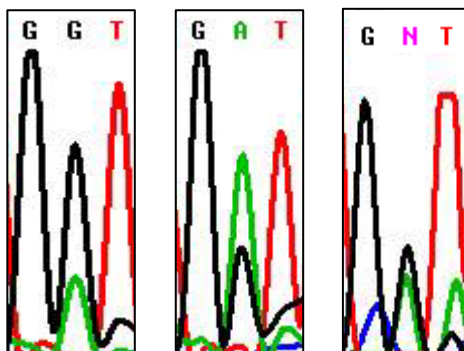
## 3) Seqüenciació.

Després de comprovar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa el resultat de la purificació, es passava a realitzar la reacció de seqüenciació. Per a les reaccions de seqüenciació s'utilitzava el *kit ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1* (PE Biosystems). L'anàlisi de la seqüència amb el seqüenciador automàtic era realitzada en la *Unitat de Genòmica dels Serveis Científico-tècnics* de la UB. La reacció de seqüenciació era la següent:



Preparació de la barreja de reacció per a la seqüenciació			
Reactiu	Volum	Concentració final	
Terminator Ready Reaction mix (PE Biosystems)	1 µl	1X	
5 µM <i>primer</i> VP1-2965 o VP1' (Sigma Aldrich)	0.64 µl	0.2 mM	
Producte de PCR purificat		200-500 ng	
H <sub>2</sub> O desionitzada lliure de DNases i RNases (Invitrogen)	fins 10 µl		
Programa de seqüenciació:			
Fases de la seqüenciació	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	96°C	2'	1X
Desnaturalització	96°C	10"	25X
Hibridació	45°C	5"	
Extensió	60°C	4'	

Un cop finalitzada la reacció de seqüenciació, les mostres eren analitzades en el seqüenciador automàtic ABI Prism 3700 (PE Biosystems) i els resultats obtinguts es visualitzaven mitjançant el programa Chromas. La proporció de virus parental i mutant en els diferents temps s'inferia a partir del cromatograma de la seqüència consens, tal i com es mostra en la figura 3.2.6.3), utilitzant la mutació (g→a en el nucleòtid 2857 del HM175 M14707) present només en el G1217D com a marcador genètic.



**Fig. 3.2.6.3. Fragments de cromatograma corresponents als nucleòtids 2856-2858 de la seqüència consens amb diferents proporcions de virus parental, que presenta una guanina en el nucleòtid 2857, i de mutant G1217D, que presenta una adenina en aquesta posició.**

En aquests estudis de competència també es quantificaven les còpies genòmiques per ml de sèrum als 60 min després de la inoculació, seguint el protocol detallat en l'apartat 3.2.6.1., i s'estimaven els títols relatius del virus parental i el mutant G1217D a través del percentatge de cada virus obtingut a partir del cromatograma de la seqüència.

**SOLUCIONS NECESSÀRIES:****Tampó TBE 10X:**

Tris-HCl.....	108 g/l
Àcid bòric.....	55 g/l
EDTA.....	0.05M
pH 8.0	
Esterilitzar per autoclau 15'	

**Tampó de càrrega 6X:**

Glicerol.....	30% (v/v)
Blau de bromofenol.....	0.25% (p/v)

**3.2.6.4. Anàlisi de l'evolució del virus inoculat**

En les mostres de sèrum recollides a les dues setmanes després de la inoculació es va dur a terme la seqüenciació d'un fragment de la regió que codifica la proteïna VP3 comprès entre els aminoàcids 1 i 123 de la proteïna. En aquest cas es va seguir el protocol descrit per Aragonès i col·laboradors, 2008<sup>10</sup>, molt similar al que s'ha detallat per a la seqüenciació del fragment que codifica la regió de la proteïna VP1 que conté la mutació que diferencia el pHM175 43c del mutant G1217D, però amb els *primers* HAV1431B (5' CTTGGATCCCCTCAATGTTTTAGCTAGA 3') i HAV1883 (5' TCTACCTGAATGATATTTGG 3'). Addicionalment, es va seqüenciar el fragment de VP1 comprès entre els aminoàcids 85 i 245, tal i com s'ha detallat en l'apartat 3.2.6.3.

**3.2.7. QUANTIFICACIÓ DEL VIRUS EN MOSTRES DE FETGE I MELSA**

Per a la quantificació del virus present en fetge i melsa, 500 mg de teixit, prèviament esmicolat amb l'ajut d'un bisturí, s'incubaven amb 500 µl d'una solució de Proteïnasa K (100 µg/ml) a 37°C durant 2 hores i en constatació. A continuació, se separava la part més grollera de l'homogenat centrifugant a 3,000 x g durant 5 minuts. Els àcids nucleics de 150 µl del sobrenedant obtingut, que contenia els virus que s'havien alliberat del teixit, s'extreien utilitzant el kit NucleoSpin RNA Virus de Macherey-Nagel i 5 µl de la suspensió d'àcids nucleics s'utilitzaven per a la quantificació del virus present en la mostra mitjançant la RT-PCR a temps real descrita anteriorment. Igual que en la quantificació de l'HAV en les mostres de sèrum, la detecció molecular i quantificació del virus en les mostres

es realitzava utilitzant els controls i el protocol descrits per Costafreda i col·laboradors, 2006<sup>5</sup> (Annex).

Adicionalment, en aquests teixits també es va detectar i quantificar la cadena negativa de l'HAV per confirmar la replicació vírica. Amb aquesta finalitat, es partia de les mateixes extraccions d'àcids nucleics i s'aplicava la mateixa tècnica de detecció molecular, però la RT-PCR no es feia en un sol pas, sinó que se separava la RT de la PCR, afegint en la RT únicament el *primer* HAV 68, complementari a la cadena negativa del genoma del virus.

L'aparell de RT-PCR a temps real utilitzat era el Mx3000P (Stratagene) i els resultats de les quantificacions s'analitzaven amb el programa MxPro proporcionat per la mateixa casa comercial de l'aparell. Seguidament es detalla el protocol emprat.

10 µl dels àcids nucleics extrets		
Xoc tèrmic 5 min a 99°C		
Es col·locaven immediatament en gel		
Preparació de la barreja de reacció per a la RT		
Reactiu	Volum	Concentració final
5X Tampó de RT Expand (Roche)	5 µl	1X
100 mM DTT (Roche)	1.25 µl	5 mM
2mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP (Epicentre)	2.5 µl	0.2 mM
0.1 mM <i>primer</i> HAV 68 (Sigma Aldrich)	0.125 µl	1 µM
50 U/ µl Transcriptasa Reversa Expand (Rohce)	0.125 µl	6.3 U
H <sub>2</sub> O desionitzada lliure de DNAses i RNAses (Invitrogen)	6 µl	
Àcids nucleics extrets	10 µl	
Volum total	25 µl	
<b>Incubar a 45°C durant 1h</b>		

Preparació de la barreja de reacció per a la PCR a temps real			
Reactiu	Volum	Concentració final	
10X Core RT-PCR Buffer	2.5 µl	1X	
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl	2 mM	
5mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP (20 mM dNTP)	1 µl	0.2 mM	
0.1 mM <i>primer</i> HAV 68 (Sigma Aldrich)	0.15 µl	0.6 µM	
0.1 mM <i>primer</i> HAV 240 (Sigma Aldrich)	0.15 µl	0.6 µM	
50 µM sonda HAV 150(-)	0.125 µl	0.25 µM	
5 U/ µl SureStart Taq DNA Polymerase	0.25 µl	1.25 U	
H <sub>2</sub> O desionitzada lliure de DNAses i RNAses (Invitrogen)	14.83µl		
Producte de la reacció de RT	5 µl		
Volum total	25 µl		
Programa de RT-PCR:			
Fases de la RT-PCR	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial/ Activació polimerasa	95°C	10'	1X
Desnaturalització	95°C	15''	45X
Hibridació	60°C	1'	
Extensió	70°C	1'	
La fluorescència es mesurava al final de cada cicle			

En els experiments de competència, els àcids nucleics extrets a partir de les mostres de fetge s'utilitzaven en l'amplificació i seqüenciació del fragment que codifica la regió de la proteïna VP1 compresa entre els aminoàcids 85 i 245 i que conté la mutació que diferencia el pHM175 43c del mutant G1217D. Tal i com s'ha descrit per a les mostres de sèrum, la mutació en la posició 217 de VP1 era utilitzada com a marcador genètic per calcular el percentatge de cada virus a través de la determinació de la proporció relativa de cada un dels dos pics del cromatograma de les seqüències consens. En aquests estudis de competència també es quantificaven les còpies genòmiques per mg de fetge als 21 dies després de la inoculació i s'estimaven els títols relatius del virus parental i el mutant G1217D a través del percentatge present de cada virus, obtingut a partir del cromatograma de la seqüència.

### **3.2.8. QUANTIFICACIÓ DEL VIRUS EN MOSTRES DE FEMTA**

Per a l'anàlisi de les mostres de femta es preparava una suspensió d'aquesta al 10% en PBS, que se centrifugava a 2,000 x g durant 5 minuts. Els àcids nucleics de 150 µl del sobrenedant obtingut s'extreien utilitzant el kit NucleoSpin RNA Virus de Macherey-Nagel i 5 µl de la suspensió d'àcids nucleics s'utilitzaven per a la quantificació del virus present en la mostra mitjançant RT-PCR a temps real. La detecció molecular i quantificació del virus en les mostres es realitzava utilitzant els controls i el protocol descrits per Costafreda i col·laboradors, 2006<sup>5</sup> (Annex).

### **3.2.9. ANÀLISIS ESTADÍSTIC**

Per determinar si hi havia diferències estadísticament significatives entre el virus parental pHM175 43c i el mutant G1217D es utilitzar el test T-Student. També es van analitzar les diferències estadísticament significatives en els percentatges i el nombre de còpies d'RNA entre els diferents temps per a cada un dels dos virus. Les quantificacions de les còpies d'RNA s'expressaren com a mitja ± l'error estàndard.

## 3.3. RESULTATS

### 3.3.1. EL VIRUS PARENTAL pHM175 43c S'UNEIX ALS ERITRÒCITS AMB MENYS EFICIÈNCIA QUE EL MUTANT G1217D

El nombre de virus continguts en una unitat d'hemaglutinació del pHM175 43c i del mutant G1217D en eritròcits humans es mostren a la Taula 2.3.1.1. Segons aquests títols, la capacitat d'unió als eritròcits humans del pHM175 43c és significativament inferior ( $p < 0.05$ ) a la del mutant, tan a pH àcid com a pH neutre, amb una diferència mitja d'aproximadament  $1 \text{ Log}_{10}$ . És a dir, el nombre de virus necessaris per hemaglutinar  $10^6$  eritròcits humans és  $1 \text{ Log}_{10}$  superior per la soca parental que per la soca mutant.

Per tal de comprovar si l'augment de la capacitat d'unió als eritròcits del mutant, associat al canvi que aquest presenta en la posició 217 de la proteïna VP1, podia

---

estar relacionat amb un increment de la seva eliminació en sang, es va utilitzar un model de rata per a dur a terme estudis *in vivo*. Per aquest motiu es va realitzar un estudi previ de la capacitat d'unió del pHM175 i del mutant als eritròcits de rata Wistar femella adulta a pH fisiològic, el resultat del qual es mostra en la Taula 3.3.1.2. En aquest cas, el títol d'hemaglutinació del pHM175 43c va ser també significativament superior ( $p < 0.05$ ) al del mutant G1217D, també amb una diferència mitja d'aproximadament  $1 \log_{10}$ . Aquestes diferències en la capacitat d'hemaglutinació no eren degudes a diferències en la relació de partícules físiques/partícules infeccioses en el virus parental i el mutant G1217D, ja que aquestes eren de  $76 \pm 59$  i  $49 \pm 34$ , respectivament, i no eren estadísticament diferents ( $p < 0.05$ ).

**Taula 3.3.1.1. Nombre de virus infecciosos (150S) o partícules buides (70S) presents en una unitat d'hemaglutinació (capaç d'hemaglutinar  $10^6$  eritròcits) del virus parental 43c i el mutant G1217D a pH 5.5 i 7.2 amb eritròcits tipus O humans. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre soques s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

	150S		70S	
	pH 5.5	pH 7.2	pH 5.5	pH 7.2
<b>43c</b>	$2.5 \pm 2.1 \times 10^{6^a}$	$4.7 \pm 3.0 \times 10^{6^a}$	$4.8 \pm 4.1 \times 10^{6^a}$	$5.4 \pm 3.4 \times 10^{6^a}$
<b>G1217D</b>	$1.1 \pm 0.8 \times 10^{5^b}$	$1.3 \pm 1.2 \times 10^{5^b}$	$2.1 \pm 3.8 \times 10^{5^b}$	$1.8 \pm 3.6 \times 10^{5^b}$

**Taula 3.3.1.2. Nombre de virus infecciosos (150S) o partícules buides (70S) presents en una unitat d'hemaglutinació (capaç d'hemaglutinar  $10^6$  eritròcits) del virus parental 43c i el mutant G1217D a pH 7.2 amb eritròcits de rata. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre soques s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab, ab=b, a≠b.**

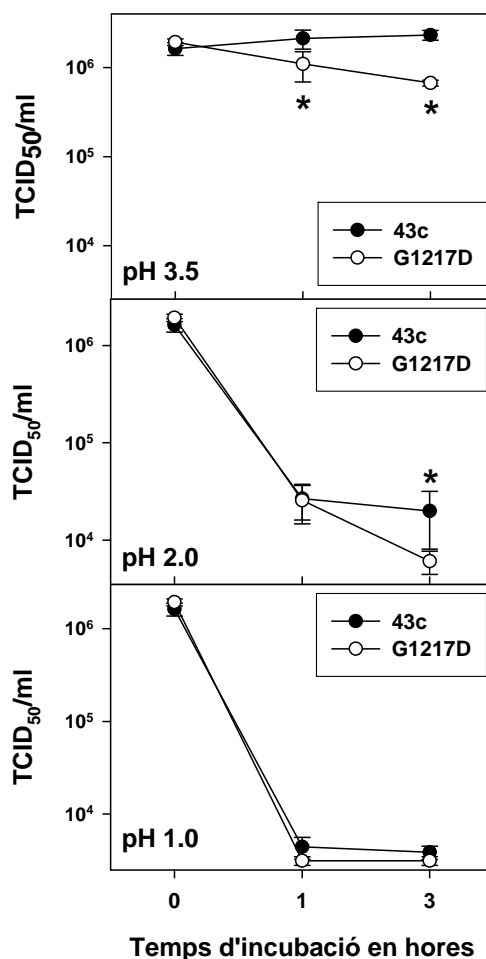
	150S	70S
<b>43c</b>	$3.6 \pm 1.4 \times 10^{6^a}$	$2.4 \pm 2.0 \times 10^{6^a}$
<b>G1217D</b>	$4.4 \pm 3.4 \times 10^{5^b}$	$4.0 \pm 1.5 \times 10^{5^b}$

### 3.3.2. EL VIRUS PARENTAL pHM175 43c I EL MUTANT G1217D MOSTREN LA MATEIXA RESISTÈNCIA DAVANT DE pH ÀCID, SALS BILIARS I TRIPSINA

La resistència/sensibilitat del virus parental i el virus mutant a pH àcid, a les sals biliars i a la tripsina va ser analitzada. Els virus s'incubaven a pH 1.0, 2.0 i 3.5, en presència d'un 1 % de sals biliars o amb un 0.25 % de tripsina, tal i com es detalla en l'apartat 3.2.4. Després del tractament es quantificava el títol infeccios i el

mateix es feia amb els virus sense tractar. Les caigudes de títol observades en els diferents tractaments a pH àcid, expressades com a  $\log(N_t/N_0)$ , així com l'anàlisi estadístic, es resumeixen en la Figura 3.3.2.

Els resultats obtinguts mostren que les dues soques són altament resistents al pH àcid, encara que el mutant G1217D és una mica més sensible a aquestes condicions que el virus parental pHM175 43c. Després de 3 hores a pH 3.5 el G1217D presentava una reducció de  $0.43 \pm 0.03 \log_{10}$ , mentre que el pHM175 43c no es va veure afectat; després de 3 hores a pH 2, el pHM175 43c mostrava una reducció de  $1.94 \pm 0.15 \log_{10}$  davant la reducció de  $2.50 \pm 0.22 \log_{10}$  que presentava el G1217D i després de 3 hores a pH 1 es van observar reduccions de  $2.40 \pm 0.10$  i  $2.73 \pm 0.12 \log_{10}$  en el pHM175 43c i el G1217D respectivament.



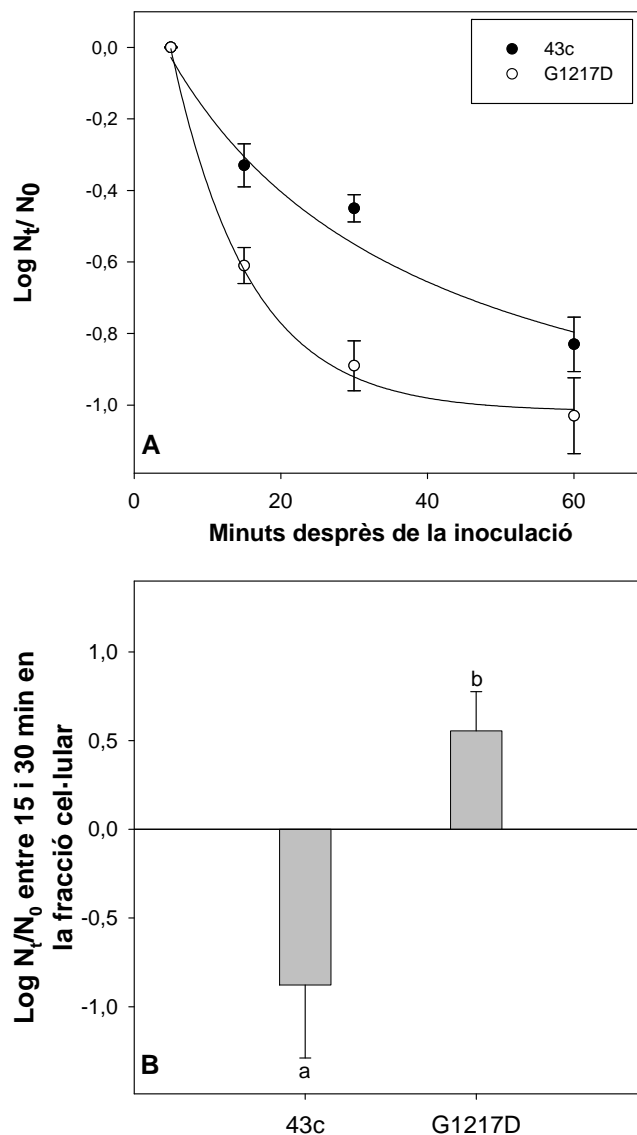
**Fig. 3.3.2.** Caigudes del títol infecciós després d'incubar el virus a pH 1, 2 i 3.5, durant 1 i 3 hores a 37°C. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre el virus parental pHM175 43c i el mutant G1217D s'indiquen amb un asterisc.

Pel que fa als tractaments amb un 1 % de sals biliars o un 0.25 % de tripsina, en cap cas es van detectar caigudes superiors a 1  $\log_{10}$  i tampoc es va detectar diferències significatives entre el virus parental i el mutant G1217D.



### 3.3.3. EL VIRUS PARENTAL pHM175 43C ÉS ELIMINAT MÉS LENTAMENT DE SANG QUE EL MUTANT G1217D

Per tal d'analitzar el patró d'eliminació del virus pHM175 43c i el seu mutant G1217D en sang, es va calcular la seva vida mitja en sang després de la seva injecció en rata Wistar femella adulta mitjançant la quantificació dels genomes vírics en sèrum a diferents temps després de la inoculació.



**Fig. 3.3.3.1. Cinètica d'eliminació del virus parental pHM175 43c i el mutant G1217D en sang de rata Wistar. (A)** Caiguda del nombre de còpies genòmiques detectades en sèrum expressada com a  $\text{Log}_{10} N_t/N_0$ , on  $N_t$  és el nombre de còpies genòmiques als 15, 30 i 60 min post-inoculació i  $N_0$  és el nombre de còpies genòmiques als 5 min post-inoculació. Les corbes s'han realitzat amb regressió no lineal amb el programa SigmaPlot (SPSS, Chicago III). **(B)** Variació del nombre de còpies genòmiques en la fracció de cèl·lules sanguínies entre els 15 i els 30 minuts post-inoculació expressada com a  $\text{Log}_{10} N_t/N_0$ , on  $N_t$  és el nombre de còpies genòmiques als 30 min post-inoculació i  $N_0$  és el nombre de còpies genòmiques als 15 min post-inoculació. Existeixen diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) quan les lletres són diferents.

La eliminació del virus es calculava per a cada temps utilitzant com a referència el virus en sèrum als 5 minuts després de la inoculació, moment en el qual ja havia tingut lloc la forta caiguda inicial deguda a la distribució del virus en l'animal. En la figura 3.3.3.1.A es mostren les cinètiques d'eliminació del virus parental i del mutant G1217D, obtingudes a partir de les mitges de les caigudes del virus en sèrum de les 8 rates inoculades amb cada virus, durant els 60 min posteriors a la inoculació.

Tal i com es pot apreciar en la figura 3.3.3.1.A, el mutant G1217D presentava una cinètica d'eliminació significativament més ràpida ( $p < 0.05$ ) durant els primers 30 min. Després la cinètica de la caiguda de virus en sèrum s'amortiguava en tots dos casos. A més, en el cas del mutant, la eliminació del virus en sèrum anava acompanyada per un increment de  $0.56 \pm 0.22 \log_{10}$  del virus en el compartiment cel·lular entre els 15 i els 30 min (Fig. 3.3.3.1.B). En canvi, en el cas del virus parental s'observà, entre els 15 i els 30 min post-inoculació, una disminució dels nivells de virus units inespecíficament als eritròcits de  $-0.88 \pm 0.41 \log_{10}$ . Les diferències entre el decrement del pHM175 43c i l'increment del mutant unit als eritròcits eren estadísticament significatives. Amb tot, es va estimar que el temps de vida mitja en sèrum del pHM175 43c i el G1217D era de 8 i 17 min respectivament.

### **3.3.4. EL VIRUS PARENTAL pHM175 43c MOSTRA UNA BIODISTRIBUCIÓ MÉS RÀPIDA CAP A FETGE I COMENÇA A REPLICAR ABANS QUE EL MUTANT G1217D**

Per tal de comprovar si la cinètica d'eliminació en sang podia afectar a la patogènesi, es va estudiar la distribució del virus pHM175 43c i el mutant G1217D en diferents teixits (Fig. 3.3.4.1).

Quaranta-vuit hores després de la injecció, tant el virus parental pHM175 43c com el mutant G1217D es trobaven a fetge, però amb uns nivells significativament diferents del 80% i el 58% del total de genomes inoculats respectivament (Fig. 3.3.4.1.A). Una setmana després de la injecció el percentatge de pHM175 43c inoculat que encara es trobava en el fetge pràcticament no havia canviat (76%), mentre que el G1217D havia augmentat fins un 69%. Als 14 dies aquests percentatges tornaven a ser significativament diferents, trobant-se el 84% i el 49% dels genomes inoculats inicialment de pHM175 43c i G1217D respectivament. Finalment, als 21 dies després de la injecció la disminució dels virus presents a

fetge respecte els inoculats ja era evident tant en el pHM175 43c com en el G1217D, amb només el 32% i el 21% del total inoculat respectivament. Durant tot aquest període, només es va detectar en melsa aproximadament el 5% dels virus inoculats, sense diferències entre el pHM175 43c i el G1217D.

Cal tenir en compte que l'HAV pot arribar al fetge com a mínim en dos compartiments diferents: unit als eritròcits, forma en la que pot ser fagocitat per les cèl·lules de Kupffer del sistema reticle-endotelial de fetge, i lliure, forma en la que pot infectar tant les cèl·lules de Kupffer com els hepatòcits. Per tant, el nombre total de genomes en el fetge ha de ser el resultat del nombre de virus que hi arriben mitjançant qualsevol de les dues vies comentades, més els que s'originin per replicació i menys els que es perdin per eliminació. Segons els resultats obtinguts, el G1217D tardaria més en arribar a fetge i també s'eliminarà més ràpidament en aquest òrgan, en comparació amb el virus parental, fets atribuïbles a la seva major capacitat d'unió als eritròcits.

Per confirmar aquesta hipòtesi, es va estudiar la replicació del pHM175 43c i del G1217D a fetge mitjançant la quantificació de l'RNA de polaritat positiva i negativa. Una setmana després de la inoculació, els títols de l'RNA de polaritat positiva eren de  $2.3 \times 10^4 \pm 0.2 \times 10^4$  còpies/mg de fetge en el cas del pHM175 43c i  $1.2 \times 10^4 \pm 0.1 \times 10^4$  còpies/mg de fetge en el del G1217D. Tot i que la diferència era petita, els títols eren significativament diferents ( $p < 0.05$ ). Per altra banda, els títols de l'RNA de polaritat negativa, amb uns valors de  $1.70 \pm 1.20$  i  $0.24 \pm 0.18$  còpies/mg fetge en el cas del virus parental i el mutant G1217D respectivament, eren també significativament diferents (Fig. 3.3.4.1.B i 3.3.4.1.C). Dues setmanes després de la inoculació es van observar uns títols d'RNA de polaritat positiva del virus parental de  $1.2 \times 10^4 \pm 0.1 \times 10^4$  còpies/mg de fetge, significativament superiors als títols de  $6.8 \times 10^3 \pm 2.1 \times 10^3$  còpies/mg de fetge del G1217D. En canvi, en aquest mateix moment, els títols d'RNA de polaritat negativa detectats no van presentar diferències significatives entre virus parental i mutant G1217D, essent de  $1.5 \times 10^2 \pm 1.1 \times 10^2$  còpies/mg de fetge en el pHM175 43c i de  $9.3 \times 10^1 \pm 7.4 \times 10^1$  en el G1217D. Aquest increment en els nivells d'RNA de polaritat negativa entre els 7 i els 14 dies indicava replicació, tant en el virus parental com en el mutant. No obstant, aquesta replicació era baixa i ineficient i, com a conseqüència, la virèmia i l'excreció de virus en femta eren també força baixes. Respecte la virèmia, es va observar un increment progressiu de  $7.5 \times 10^2 \pm 3.5 \times 10^2$ ,  $5.3 \times 10^3 \pm 2.0 \times 10^3$  i  $8.3 \times 10^3 \pm 5.4 \times 10^3$  còpies genòmiques/ml de sèrum als 2 dies, una setmana i dos setmanes respectivament amb el virus parental, i  $8.8 \times 10^2 \pm 3.7 \times 10^2$ ,

---

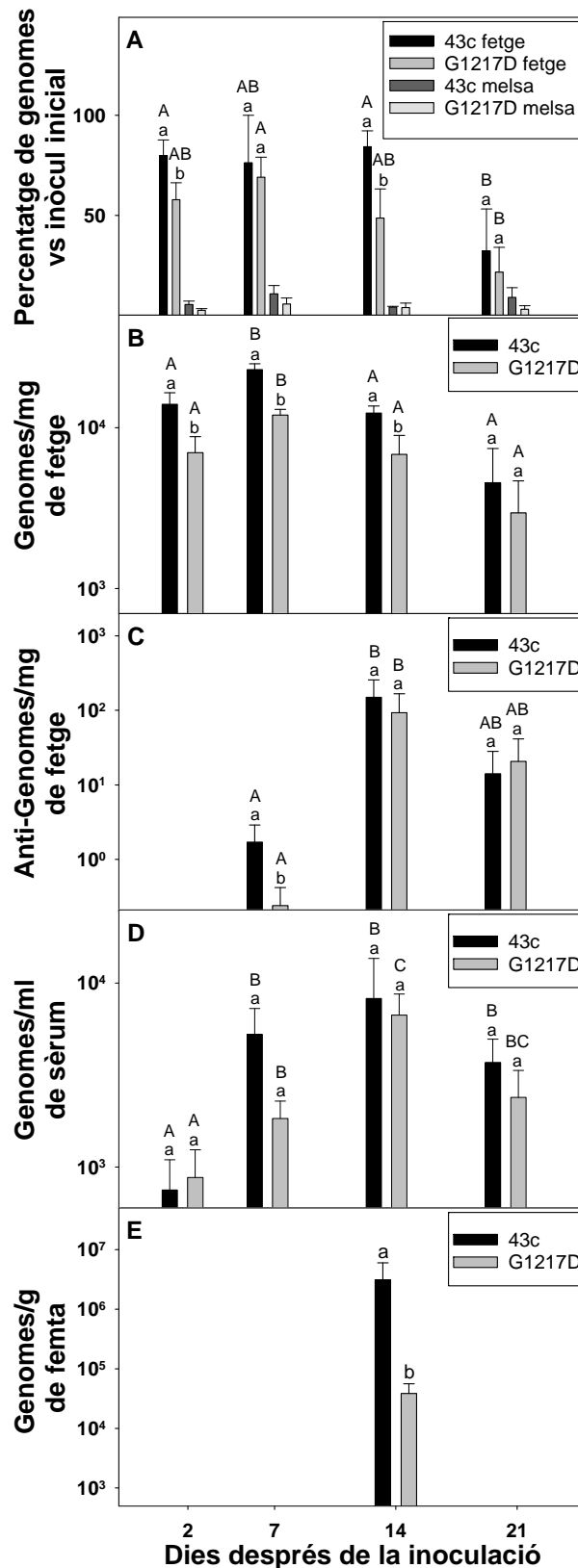
$1.8 \times 10^3 \pm 4.5 \times 10^2$  i  $6.7 \times 10^3 \pm 2.0 \times 10^3$  còpies genòmiques/ml de sèrum als 2 dies, una setmana i dos setmanes respectivament amb el mutant (Fig. 3.3.4.1.D).

Respecte l'excreció en femta, únicament es va detectar l'HAV en les mostres obtingudes la segona setmana després de la inoculació (Fig. 3.3.4.1.E) i només en el 30 % de les rates inoculades, però es van observar diferències significatives entre els títols del virus pHM175 43c i el mutant G1217D; aquests títols van ser de  $3.6 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^6$  còpies/g de femta en el cas del virus parental, i de  $3.8 \times 10^4 \pm 2.5 \times 10^4$  còpies/g de femta en el cas del mutant. Aquests 2 Log<sub>10</sub> de diferència en el títol a femta indicarien una eficiència superior del virus pHM175 43c deguda probablement a una eficiència d'arribada a fetge superior més que no pas a una eficiència de replicació més alta.

En un segon experiment, en el que les mostres de femta es varen recollir entre els 14 i els 21 dies diàriament, es va detectar virus a femta en el 60% de les rates inoculades amb el virus parental i en el 33% de les rates inoculades amb el mutant G1217D. En aquest cas, l'excreció de virus a femta es va observar entre els 14 i els 17 dies, assolint-se el màxim d'excreció als 16 dies. De nou, el nombre total de còpies genòmiques a femta en el cas de les rates inoculades amb el virus parental era significativament superior al de les que havien rebut el mutant G1217D (Taula 3.3.4 i Fig. 3.3.4.2). Els títols totals de RNA genòmic i antigenòmic que es detectaven a fetge als 7 dies postinoculació eren també significativament superiors en el cas del virus parental que en el cas del mutant (Taula 3.3.4). En aquest mateix experiment, mai es va detectar virus en sèrum, fetge o femtes de rates que havien rebut el virus parental o el mutant inactivats amb llum UV, confirmant així que la detecció de l'RNA del virus en aquestes mostres quan procedien d'animals inoculats amb els virus sense tractar indicava replicació.

Una prova addicional de la existència de replicació va ser l'aparició d'una mutació en la posició 12 de VP3 durant el curs de la infecció en les rates, la qual no existia en la seqüència consens de les poblacions inoculades. Aquesta mutació es va detectar en 2 de 3 i en 3 de 3 virus aïllats a partir de sèrum de les rates inoculades amb el virus parental i amb el mutant G1217D respectivament, a les dos setmanes després de la inoculació. La mutació detectada en els aïllats derivats del virus parental era A3012G, mentre que en els aïllats derivats del mutant G1217D es va detectar la mutació A3012G en un cas i la A3012V en els dos casos restants. En canvi, en cap cas es va detectar la mutació que donaria lloc a la reversió en la posició 1217 de VP1 en el mutant.

---

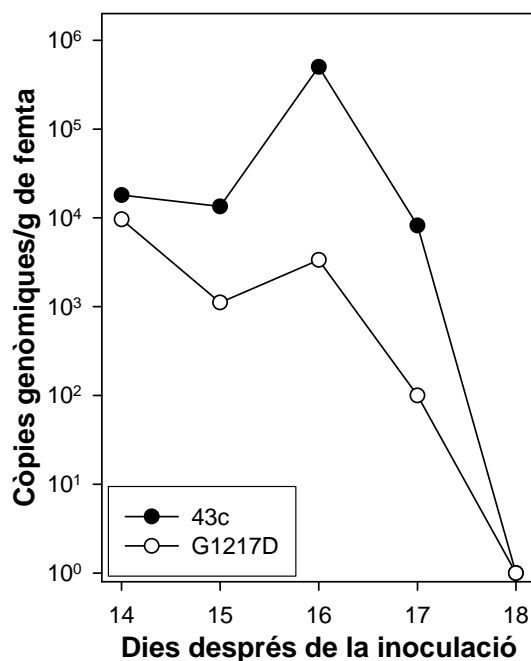


**Fig. 3.3.4.1. Biodistribució, replicació i eliminació del virus parental pHM175 43c i del mutant G1217D. (A) Percentatge del virus inoculat quantificat com a còpies genòmiques als diferents temps post-inoculació en fetge i melsa. (B) Nombre de còpies genòmiques a fetge en els diferents temps post-inoculació. (C) Nombre de còpies anti-genòmiques a fetge en els diferents temps post-inoculació. (D) Nombre de còpies genòmiques a sèrum en els diferents temps post-inoculació. (E) Nombre de còpies genòmiques a femta en els diferents temps post-inoculació. Existeixen diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) quan les lletres són diferents. S'indiquen dos anàlisis diferents: en minúscula quan es comparen els valors entre els dos virus en un temps donat i en majúscula quan es comparen els valors d'un virus determinat en els diferents temps.**

**Taula 3.3.4.  $\text{Log}_{10}$  dels nombres totals de còpies del virus parental i el mutant G1217D en les mostres de fetge i femta de les rates inoculades amb els virus sense tractar i amb els virus inactivats amb llum UV. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

	RNA genòmic a fetge als 7 dies postinoculació	RNA antigenòmic a fetge als 7 dies postinoculació	RNA genòmic a femta entre els 14 i 17 dies postinoculació
<b>43c</b>	$7.79 \pm 0.12^a$	$4.03 \pm 0.02^a$	$5.78 \pm 0.51^a$
<b>43c inactivat*</b>	No detectat	No detectat	No detectat
<b>G1217D</b>	$6.31 \pm 0.63^b$	$2.36 \pm 0.09^b$	$4.56 \pm 0.38^b$
<b>G1217D inactivat*</b>	No detectat	No detectat	No detectat

\*Les mostres de les rates inoculades amb el virus parental o el mutant G1217D inactivat varen donar negatiu en tots els temps que van ser analitzades, no només als 7 dies.



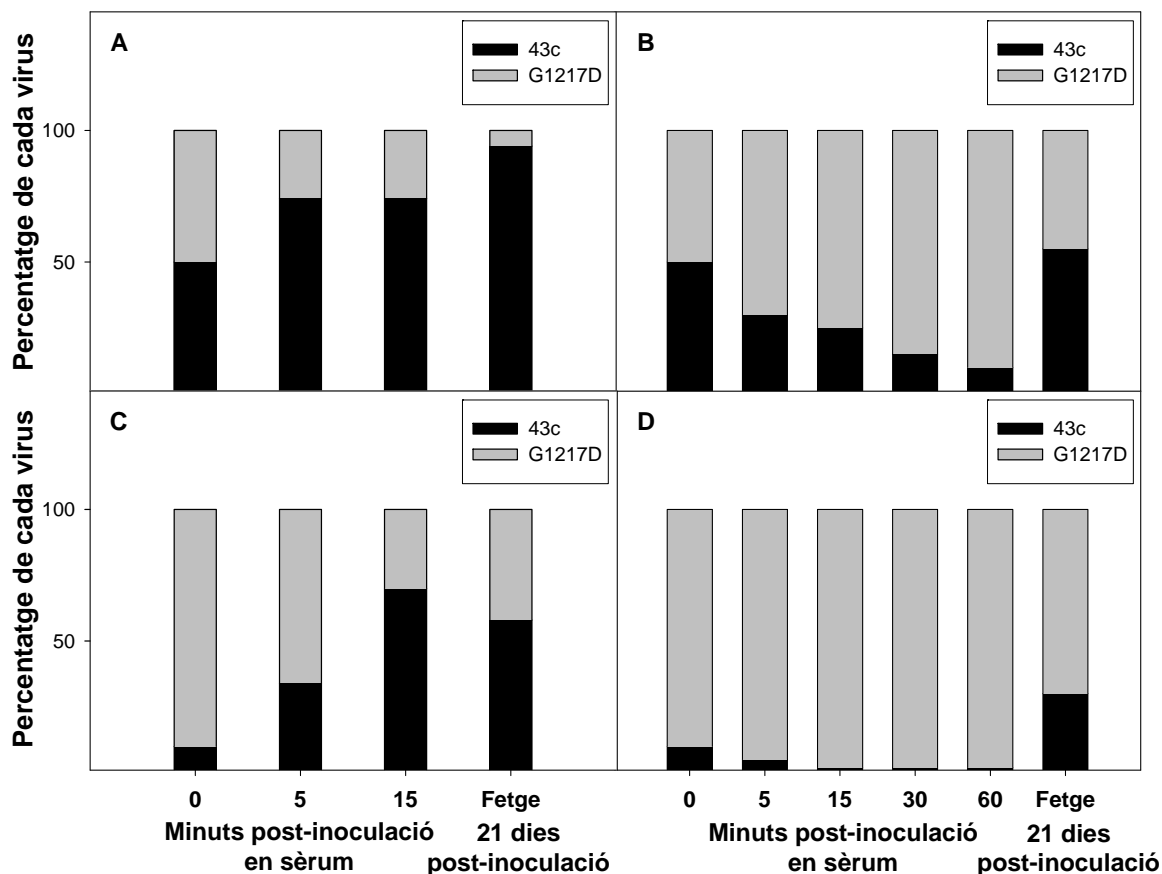
**Fig. 3.3.4.2. Cinètica d'excreció del virus en femta. Entre els 14 i 17 dies després de la inoculació, la femta de les rates que havien rebut  $10^5$  còpies genòmiques del virus parental o del mutant G1217D era recollida diàriament. En la gràfica es mostra el patró d'excreció d'un animal de cada grup, el qual era representatiu del patró general observat.**

### 3.3.5. EL VIRUS PARENTAL pHM175 43c DESPLAÇA AL MUTANT G1217D *IN VIVO*

Per tal de confirmar el rol de la diferent unió als eritròcits com a mecanisme per arribar a fetge amb major eficiència, el virus parental i el mutant G1217D varen ser inoculats en rates Wistar femelles adultes conjuntament. Es van inocular 7 rates

amb una barreja de virus que contenia el virus parental i el mutant G1217D amb una proporció 1:1 i set rates més amb una barreja que contenia el virus parental i el mutant G1217D amb una proporció 1:9 respectivament. El mateix protocol es va realitzar també afegint l'anticòs monoclonal H7C27 a l'inòcul. El percentatge de cada virus que restava a sèrum a diferents temps s'estimava a partir del cromatograma de la seqüència consens. Tal i com s'aprecia en la Fig. 3.3.5.A i 3.3.5.C, quan l'inòcul no contenia el MAb H7C27, el virus parental desplaçava ràpidament el mutant G1217D. Quan virus parental i G1217D eren inoculats en la mateixa proporció (1:1), només es necessitava 5 minuts per detectar un increment significatiu del  $50\pm 0\%$  al  $74\pm 10\%$  del virus parental i la conseqüent caiguda del  $50\pm 0\%$  al  $26\pm 10\%$  del G1217D. Aquest increment de la proporció del virus parental en sèrum correlacionava amb una proporció d'aquest del  $94\pm 8\%$  en fetge als 21 després de la inoculació (Fig. 3.3.5.A). Quan virus parental i G1217D eren inoculats a una proporció 1:9 respectivament, el virus parental augmentava del  $10\pm 0\%$  al  $70\pm 10\%$  alhora que el G1217D disminuïa del  $90\pm 0\%$  al  $30\pm 9\%$ , però en aquest cas es necessitaven 15 minuts per detectar aquests canvis (Fig. 3.3.5.C). De nou, i malgrat haver inoculat només un  $10\pm 0\%$  de virus parental, s'observà una proporció superior d'aquest virus en fetge ( $58\pm 25\%$ ) als 21 dies després de la inoculació. En canvi, quan l'inòcul contenia l'H7C27 (Fig. 3.3.5.B i 3.3.5.D), anticòs que reconeix el lloc d'unió a la glicoforina A, el virus parental 43c, reconegut per aquest anticòs, era desplaçat pel mutant G1217D, resistent a l'anticòs, en sèrum. Quan l'inòcul contenia iguals proporcions de virus parental i G1217D (1:1), es detectaven increments del  $50\pm 0\%$  al  $70\pm 5\%$  del G1217D (Fig. 3.3.5.B) als 5 minuts després de la inoculació, encara que en fetge es continuava observant una arribada superior del virus parental, el qual es trobava a unes proporcions del  $55\pm 20\%$  als 21 dies després de la inoculació (Fig. 3.3.5.B). Quan s'utilitzava un inòcul amb una proporció 1:9 (virus parental:G1217D) i en presència de l'H7C27, el G1217D presentava un increment als 5 minuts en sèrum del  $90\pm 0\%$  al  $95\pm 2\%$  però, fins i tot en aquestes condicions, el  $30\pm 7\%$  dels virus presents a fetge als 21 dies corresponien al virus parental (Fig. 3.3.5.D), que demostrava, una vegada més, la seva major capacitat d'arribada al fetge.

En aquests estudis de competència també es duia a terme la quantificació absoluta dels genomes presents a sèrum i a fetge 60 minuts i 21 dies després de la inoculació dels virus respectivament. Les quantificacions relatives del virus parental i del mutant G1217D s'inferien a partir dels percentatges de cada virus.



**Fig. 3.3.5. Experiments de competència del virus parental pHM175 43c i el mutant G1217D. Els virus s'inoculaven en rates en absència (A i C) i en presència (B i D) del MAb H7C27, anticòs al que és resistent el mutant. L'inòcul contenia les proporcions 1:1, pHM175 43c:G1217D (A i B) i 1:9, pHM175 43c:G1217D (C i D). La proporció mitja de cada virus era determinada als diferents temps post-inoculació a sèrum i als 21 dies a fetge.**

Els resultats d'aquestes quantificacions es mostren en la Taula 3.3.5. Segons aquests, quan l'inòcul contenia majoritàriament el mutant G1217D (virus parental:G1217D, 1:9) el nombre total de còpies genòmiques per ml de sèrum als 60 min postinoculació era estadísticament inferior ( $p < 0.05$ ) que quan l'inòcul contenia iguals proporcions de virus parental 43c i G1217D (virus parental:G1217D, 1:1). A més, només en aquest últim cas es detectava un efecte estadísticament significatiu ( $p < 0.05$ ) del MAb H7C27, que consistia en una reducció del nombre total de còpies genòmiques per ml de sèrum detectades als 60 min postinoculació deguda a la neutralització específica del virus parental amb aquest anticòs. Malgrat tot, el nombre total de còpies genòmiques detectades a fetge als 21 dies postinoculació era significativament inferior quan l'inòcul contenia majoritàriament el mutant G1217D (virus parental:G1217D, 1:9).



**Taula 3.3.5. Log<sub>10</sub> del nombre de còpies genòmiques per ml de sèrum als 60 minuts i per mg de fetge als 21 dies després d'inocular les barreges de virus parental 43c i mutant G1217D en presència o en absència del MAb H7C27. En tots els casos l'inòcul inicial era de 8 Log<sub>10</sub> còpies genòmiques (7.70 Log<sub>10</sub> còpies genòmiques de cada virus en la barreja 1:1 i 7 Log<sub>10</sub> còpies genòmiques del virus parental més 7.95 Log<sub>10</sub> còpies genòmiques del mutant en la 1:9). Les diferències significatives (p<0.05) s'indiquen seguint el criteri de lletres, segons el qual a=ab, ab=b i a≠b.**

Proporció (43c:G1217D)	Sèrum (60 min)			Fetge		
	Total	43c	G1217D	Total	43c	G1217D
<b>1:1</b>	5.40±0.10 <sup>a</sup>	5.30±0.10	4.60±0.10	3.20±0.50 <sup>a</sup>	3.10±0.50	2.70±0.10
<b>1:1, H7C27</b>	4.50±0.10 <sup>b</sup>	3.50±0.10	4.50±0.10	2.10±0.20 <sup>b</sup>	1.90±0.20	1.70±0.30
<b>1:9</b>	4.80±0.20 <sup>b</sup>	4.70±0.20	4.10±0.20	3.10±0.30 <sup>a</sup>	3.00±0.40	2.60±0.30
<b>1:9, H7C27</b>	4.40±0.10 <sup>b</sup>	3.30±0.10	4.40±0.10	2.30±0.20 <sup>b</sup>	1.70±0.20	2.10±0.20

## 3.4. DISCUSSIÓ

La càpsida de l'HAV presenta una variabilitat antigènica extremadament baixa, fet que explica que només s'hagi descrit un únic serotip del virus. Però no hem d'oblidar que, malgrat la baixa variabilitat aminoacídica de la càpsida, la taxa de mutació que presenta el virus en la regió que codifica per les proteïnes estructurals és de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  substitucions per nucleòtid, valor similar al que s'observa en altres picornavirus<sup>16</sup>.

La falta de correlació entre la variabilitat a nivell de nucleòtids i a nivell d'aminoàcids ha promogut la idea de que l'HAV presenta unes fortes constriccions estructurals i biològiques a nivell de la càpsida. Aquestes constriccions podrien ser

---

<sup>16</sup> Sánchez, G., Bosch, A., Gomez-Mariano, G., Domingo, E. & Pinto, R.M. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315: 34-42.

---

les responsables de que no s'aïllin variants antigèniques *in vivo*<sup>17,18</sup>.

No obstant, s'han aïllat mutants d'escapament als MAb K34C8 i H7C27 *in vitro*, dirigits contra l'epítot immunodominant i el lloc d'unió a la glicoforina A, respectivament<sup>10</sup>. A diferència dels mutants que presentaven canvis en el lloc d'unió a la glicoforina A, els quals presenten un *fitness in vitro* similar el del virus parental, els mutants d'escapament al MAb K34C8 tenen un *fitness in vitro* significativament inferior al del virus parental i només són capaços de desplaçar-lo en presència de l'anticòs K34C8, al que són resistents. En canvi, *in vivo* només s'han aïllat variants del lloc immunodominant i mai del lloc d'unió a la glicoforina A. Aquesta discrepància pot ser deguda, almenys en part, al fet de que els assaigs de *fitness in vitro* no representen el que realment succeeix *in vivo* per a que el virus pugui causar la infecció en l'hoste, tal i com s'ha descrit recentment<sup>19</sup>. Cal tenir en compte que, per a que la infecció progressi, el virus ha d'arribar al seu teixit o òrgan diana<sup>20,21</sup>, i això no s'avalua *in vitro*. Això vol dir que l'HAV, per tal d'arribar al fetge, ha de fer front a diferents situacions adverses com el pH àcid, les sals biliars, proteases com la tripsina i l'eliminació de sang a través dels eritròcits. L'anàlisi de la sensibilitat/resistència i/o eliminació del virus en aquestes condicions podria servir per a una millor predicció del *fitness* que el virus parental i els mutants presentarien *in vivo*. Tanmateix, mentre l'anàlisi dels primers factors es pot dur a terme en cultiu cel·lular, l'anàlisi de l'eliminació del virus en sang requereix d'un model *in vivo*. En aquest estudi s'han utilitzat rates Wistar com a model per estudiar aquesta cinètica d'eliminació.

A pesar de que no era l'objectiu inicial d'aquest treball, s'ha detectat replicació del virus, encara que a nivells molt baixos i no associada a manifestacions clíniques, fet que ja s'havia descrit anteriorment en conills d'Índies<sup>22</sup>.

---

<sup>17</sup> Sánchez, G., Bosch, A., & Pintó, R.M. 2003. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J. Virol.* 77:452-459.

<sup>18</sup> Pintó, R.M., Aragonès, L., Costafreda, M.I., Ribes, E. & Bosch, A. 2007. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res.* 127: 158-163.

<sup>19</sup> Wargo, A.R. & Kurath, G. 2011. In vivo fitness associated with high virulence in a vertebrate virus is a complex trait regulated by host entry, replication, and shedding. *J. Virol.* 85: 3959-3967.

<sup>20</sup> Pfeiffer, J.K. & Kirkegaard, K. 2006. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *PNAS* 103: 5520-5525.

<sup>21</sup> Vignuzzi, M., Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E. & Andino, R. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439: 344-348.

<sup>22</sup> Hornei, B., Kammerer, R., Moubayed, P., Frings, W., Gauss-Muller, V. & Dotzauer, A. 2001. Experimental hepatitis A virus infection in guinea pigs. *J. Med. Virol.* 64: 402-409.

---

Les indicacions més clares de l'existència de replicació de l'HAV en rates són, d'una banda, la detecció de l'RNA de polaritat negativa en el fetge i, d'altra banda, la generació d'una mutació, durant el curs de la infecció, en el residu 12 de VP3 (A3012G; A3012V) en la majoria dels animals. A més, la confirmació de la existència de replicació va venir del fet que quan l'inòcul contenia el virus parental o el mutant inactivats amb llum UV mai es detectava l'RNA del virus ni en fetge, ni en sèrum ni en femta. Aquesta potencial replicació en rata ens ha permès estudiar el *fitness* del virus parental i el mutant G1217D *in vivo*. Segons els resultats obtinguts, el virus parental 43c té, en el model de rata, un *fitness* superior al del mutant.

Tenint en compte que el virus parental i el mutant difereixen en una sola mutació en el residu 217 de VP1, aquesta mutació ha de ser la responsable de la pèrdua de *fitness* a través de la major capacitat d'hemaglutinació que presenta el mutant G1217D i que implica que aquest s'uneixi més als eritròcits, i sigui eliminat més ràpidament.

Aquesta idea es veu corroborada per l'observació del comportament del virus parental, el qual presenta una cinètica més lenta d'eliminació en sang i una major arribada a fetge. Això semblaria indicar que hi ha una relació entre els virus que no s'han unit als eritròcits i la seva biodistribució per tal d'arribar al fetge. De fet, en el cas del mutant es pot observar que la desaparició del virus de sèrum va seguida per una major acumulació de virus unit als eritròcits, els quals seran posteriorment fagocitats per les cèl·lules de Kupffer durant la seva eliminació, ja sigui per entrar en estat de senescència o per ser eritròcits alterats<sup>23</sup>. La importància d'una lenta eliminació de sang per afavorir l'arribada als teixits i òrgans diana s'ha descrit per altres virus com Mengo, Sindbis i parvovirus<sup>24,25,26</sup>. Tant en el cas del virus Mengo com en el del virus Sindbis, s'han descrit variants altament patogèniques que presentaven cinètiques més lentes d'eliminació en sang, amb vides mitges d'aproximadament 30 min. Per contra, les variants atenuades presentaven vides mitges d'uns 5 min. En l'HAV hem observat un patró similar, amb vides mitges de 17 min en el cas del virus parental i 8 min en el del mutant.

---

<sup>23</sup> Khansari, N. & Fudenberg, H.H. 1983. Immune elimination of autologous senescent erythrocytes by Kupffer cells in vivo. *Cell Immunol.* 80: 426-430.

<sup>24</sup> Campbell, J.B., Buera, J.G. & Tobias, F.M. 1970. Influence of blood clearance rates on interferon production and virulence of Mengo virus plaque mutants in mice. *Can. J. Microbiol.* 16: 821-826.

<sup>25</sup> Byrnes, A.P. & Griffin, D.E. 2000. Large-plaque mutants of Sindbis virus show reduced binding to heparan sulfate, heightened viremia, and slower clearance from the circulation. *J. Virol.* 74: 644-651.

<sup>26</sup> Kotchey, N.M., Adachi, K., Zahid, M., Inagaki, K., Charan, R., Parker, R.S. & Nakai, H. 2011. A potential role of distinctively delayed blood clearance of recombinant adeno-associated virus serotype 9 in robust cardiac transduction. *Mol. Ther.* 19: 1079-1089.

---

En els experiments de competència entre el virus parental pHM175 43c i el mutant G1217D s'ha observat que el primer és capaç de desplaçar el mutant en sèrum i d'arribar majoritàriament a fetge. Fins i tot en presència del MAb H7C27, el qual neutralitza específicament el virus parental ja que el mutant escapa a aquest anticòs, la proporció del virus parental a fetge és important. Ja que no s'han detectat diferències en la capacitat de replicació entre el virus parental i el mutant, ni *in vitro* (resultats no mostrats) ni *in vivo*, on s'han detectat valors similars d'RNA de polaritat negativa dels dos virus després de 14 dies de replicació, hem de considerar que el major potencial infecció del virus parental és degut, almenys en part, a la seva inferior capacitat d'interacció amb la glicoforina A, fet que li permet tenir més virus no units als eritròcits que podran arribar a infectar el fetge.

De totes maneres és important no oblidar que la replicació de l'HAV detectada en rata Wistar és molt baixa si es compara amb la replicació en ximpanzés<sup>27</sup>. La cinètica de replicació del virus en els dos models és, però, molt similar: els nombres de còpies genòmiques a fetge arriben als seu màxim durant la primera i segona setmana després de la inoculació en rates, mentre que en ximpanzés o fan entre la primera i tercera setmana; de la mateixa manera, en femta s'assoleixen les màximes quantificacions de còpies genòmiques a les dues setmanes i entre la segona i la tercera setmana en rates i ximpanzés, respectivament. Tanmateix, en rata els valors de còpies genòmiques a fetge són uns 3 Log<sub>10</sub> inferiors als que es detecten en ximpanzés i a femta uns 2 log<sub>10</sub> inferiors. Aquesta baixa capacitat de replicació podria ser deguda a un ús ineficient del possible receptor/s present en els hepatòcits de rata per part del virus. En aquest sentit, com que el virus inoculat és produït en cultiu cel·lular, les partícules víriques no van unides a l'IgA i, per tant, la interacció amb el receptor de les asialoglicoproteïnes (ASGPR), el qual s'uneix i internalitza les IgA i que s'ha proposat com a possible receptor del virus<sup>28</sup>, no seria factible.

A més, durant el procés d'obtenció dels estocs vírics a inocular es realitzen una sèrie de congelacions-descongelacions que trenquen les membranes cel·lulars i, per tant, és improbable que l'inòcul presenti les partícules víriques embolcallades descrites recentment en el sobrenedant de cultius de cèl·lules d'hepatoma Huh-7.5 i

---

<sup>27</sup> Lanford, R.E., Feng, Z., Chavez, D., Guerra, B., Brasky, K.M., Zhou, Y., Yamane, D., Perelson, A.S., Walker, C.M. & Lemon, S.L. 2011. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. PNAS 180: 11223-11228.

<sup>28</sup> Dotzauer, A., Gebhardt, U., Bieback, K., Göttke, U., Kracke, A., Mages, J., Lemon, S.L. & Vallbracht, A. 2000. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the Asialoglycoprotein Receptor. J. Virol. 74: 10950-10957.

---

en sang de ximpanzés infectats amb l'HAV<sup>29</sup>. Per tant, els virus inoculats no presentarien aquest embolcall que els permetria infectar els hepatòcits sense la necessitat d'interaccionar amb un receptor cel·lular, ja que ho podrien fer mitjançant la fusió de les seves membranes amb les membranes citoplasmàtiques dels hepatòcits. Ara bé, la progènie vírica de les primeres infeccions sí podria sortir dels hepatòcits tot i enduent-se part de la seva membrana, fet que li aportaria un gran avantatge, doncs les partícules embolcallades que fossin lliurades a sang, a través de la membrana basolateral, escaparien a la unió amb els eritròcits gràcies a aquest embolcall i això facilitaria que poguessin reinfectar el fetge. En aquest últim cas, el mutant G1217 es veuria especialment afavorit ja que la mutació que li confereix una major capacitat d'unió als eritròcits no li restaria *fitness* en les següents rondes de replicació. Això també permetria explicar el fet de que no es detectés la reversió de la mutació en la posició 1217 de VP1 en cap del aïllats de les rates inoculades amb el mutant G1217D.

D'altra banda, l'ortòleg de l'HAVR1/TIM1<sup>30</sup> s'ha descrit en rates<sup>31</sup>, i, donada la seva expressió en les cèl·lules hepàtiques, seria d'esperar que l'HAV interaccionés amb aquest receptor per tal d'infectar els hepatòcits. Tanmateix, també seria d'esperar que aquesta interacció esdevingués de baixa eficiència, ja que el receptor no seria idèntic a l'huHAVR1. Amb aquestes evidències, hem de concloure que el model de rata no és el model ideal per a l'estudi de la replicació, ja que les conclusions que se'n extreuen s'han d'interpretar amb precaució, però sí pot ser emprat per tal d'estudiar aspectes concrets, com la cinètica d'eliminació en sang.

Està àmpliament documentat que els virus RNA tenen unes taxes de mutació altes, fet que els hi proporciona una gran adaptabilitat front ambients canviants i complexos un cop dins l'hoste<sup>32</sup>. Tanmateix, les poblacions víriques experimenten colls d'ampolla, causats per les defenses naturals de l'hoste, que limiten la seva diversitat<sup>33</sup>. En aquest sentit, l'HAV posseeix una càpsida altament estable, la qual

---

<sup>29</sup> Lemon, S.M. & Feng, Z. 2012. Membrana hijacking: biogenesis of enveloped hepatoviruses and their role in pathogenesis of hepatitis A. Europic, oral comunicacion.

<sup>30</sup> Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y. & Feinstone, S.M. 1996. Identification of a surface glycoprotein of African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. EMBO J. 15: 4282-4296.

<sup>31</sup> McIntire, J.J., Umetsu, S.E., Akbari, O., Potter, M., Kuchroo, V.K., Barsh, G.S., Freeman, G.J., Umetsu, D.T. & DeKruyff, R.H. 2001. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. Nature Immunol. 2: 1109-1116.

<sup>32</sup> Vignuzzi, M., Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E. & Andino, R. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. Nature 439: 344-348.

<sup>33</sup> Kuss, S.K., Etheredge, C.A. & Pfeiffer, J.K. 2008. Multiple host barriers restrict poliovirus trafficking in mice. PLoS Pathog. 4: e1000082.

---

li permet superar les condicions adverses que se li presenten fora i dins de l'hoste i que li permet evadir la interacció amb els eritròcits que li suposaria ser eliminat de sang. Qualsevol mutant amb una càpsida menys estable o amb una configuració que no li permeti escapar de la interacció amb la glicoforina A presentarà una disminució del *fitness* i serà seleccionat negativament en la natura. Per tant, aquests colls d'ampolla poden també contribuir a la baixa variabilitat antigènica de l'HAV.

Tal i com s'ha comentat, en cap cas es va observar la reversió de la mutació G1217D entre els mutants aïllats de les rates inoculades. No obstant això, es va detectar una mutació en el residu 12 de VP3 en el 66 % dels virus aïllats a les dues setmanes en les rates inoculades amb el virus parental i en el 100 % dels virus aïllats al mateix temps en les rates inoculades amb el mutant. El paper que pot tenir aquesta mutació no es coneix però tota aquesta informació ens pot donar una idea del l'equilibri que ha d'existir entre la variabilitat antigènica, les constriccions estructurals i biològiques i el *fitness* i de com n'és de crític aquest equilibri.

Els resultats obtinguts semblen indicar que el mutant G1217D podria tenir un fenotip atenuat. De ser així, seria un candidat potencial a vacunes de segona generació ja que, com a mutant d'escapament que és, podria conferir protecció davant l'emergència de virus mutants. Tanmateix, al tractar-se d'una mutació puntual, l'alta probabilitat de que el mutant G1217D revertís la mutació i retornés al fenotip salvatge constituiria un impediment a l'hora de considerar-lo com a candidat a noves vacunes. A més, la falta de manifestacions clíniques de la malaltia en el model de rata, juntament amb el fet de que no sempre hi ha correlació entre el *fitness* i la virulència<sup>34</sup>, impedeix confirmar el fenotip atenuat del mutant G1217D.

No obstant, aquest treball esdevé un exemple de com una mutació que no ocasiona cap desavantatge pel que fa a replicació, deixa de ser un esdeveniment neutral si es contempla dins el complex cicle biològic. Segurament existeixen molts d'altres casos en els que una disminució de l'estabilitat de la càpsida implica una caiguda de *fitness* davant diferents colls d'ampolla. Tots aquests exemples representen una prova més de que els virus RNA repliquen al límit de la catàstrofe d'error<sup>35,36</sup>.

---

<sup>34</sup> Herrera, M.A., Pérez-Grande, C., Perales, C. & Domingo, E. 2008. Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J. Gen. Virol.* 89: 232-244.

<sup>35</sup> Domingo, E. & Holland, J.J. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 151-178.

<sup>36</sup> Biebricher, C.K. & Eigen, M. 2005. The error threshold. *Virus Res.* 107: 117-127.

---

### 3.5. CONCLUSIONS

- La mutació G217D de la proteïna VP1 dóna lloc a una variant amb una major capacitat d'unió a la glicoforina A dels eritròcits i, per tant, amb un fenotip de més alta hemaglutinació fins i tot a pH fisiològic.
- En el model de rata, el mutant G1217D és eliminat de sèrum més ràpidament i, com a conseqüència, presenta una biodistribució més lenta cap a fetge i comença a replicar més tard que el virus parental.
- El virus parental desplaça el mutant en sèrum i arriba majoritàriament a fetge. Només en presència de l'anticòs monoclonal H7C27, que interacciona amb el virus parental però no amb el mutant G1217D, aquest últim és capaç de desplaçar el virus parental a sèrum, però, fins i tot en aquestes condicions, el virus parental mostra una major capacitat per arribar a fetge.
- La mutació G217D de VP1 genera una variant amb un *fitness* menor *in vivo*, fet que podria explicar el perquè no s'aïllen variants antigèniques naturals del lloc d'unió a la glicoforina A.





## **4. CAPÍTOL 2:**

**L'adaptació a diferents condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lulars implica modificacions dinàmiques en l'ús de codons crítics per al plegament, l'estabilitat i la funció de la càpsida de l'HAV**



## 4.1. ANTECEDENTS

L'HAV té una sèrie de característiques úniques que el fan diferent de la resta de membres de la família *Picornaviridae*. Entre aquestes, destacar la necessitat del factor cel·lular eIF4G per a la iniciació de la traducció<sup>1</sup> i, per tant, la impossibilitat de silenciar la síntesi proteica de la cèl·lula hoste a través de mecanismes similars als que fan servir altres picornavirus<sup>2</sup>, basats en el processament proteolític de l'esmentat factor cel·lular. Això implica que el virus hagi de competir amb la cèl·lula per la maquinaria traduccional i pels tRNAs. Davant aquesta situació, el virus a adoptat estratègicament un ús de codons altament deoptimitzat respecte el de la cèl·lula, és a dir, un ús de codons en certa manera antagònic al de la cèl·lula

---

<sup>1</sup> Ali, I.K., McKendrick, L., Morley, S.J. & Jackson, R.J. 2001. Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *J. Virol.* 75: 7854-7863.

<sup>2</sup> Leong, L.E.C., Cornell, C.T. & Semler, B.L. 2002. Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus. In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 187-198.

---

hoste<sup>3,4</sup>. Aquesta deoptimització de l'ús de codons, descrita només en l'HAV entre els picornavirus i fins i tot entre altres virus, seria l'estratègia que ha adoptat el virus per tal de minimitzar la competència amb la cèl·lula pels tRNAs cel·lulars<sup>5</sup>. Per tal d'exemplificar fins a quin punt l'ús de codons de l'HAV està desoptimitzat, en la Taula 4.1 es mostra el *Relative Codon Deoptimization Index* (RCDI), el qual mesura com de diferent és l'ús de codons d'un virus respecte l'ús de codons de la seva cèl·lula hoste. El valor de l'RCDI és d'1 si el virus i la cèl·lula tenen un ús de codons idèntic, és a dir, quant el virus presenta el nivell màxim d'adaptació del seu ús de codons al de la cèl·lula hoste, i va augmentant progressivament a mesura que ho fa també el nivell de deoptimització. Tal i com es pot observar en la Taula 4.1.1, l'RCDI de l'HAV és significativament superior al de la resta dels virus, i és especialment elevat en la regió de la càpsida.

**Taula 4.1.1. RCDI de diferents picornavirus. Extret d'Aragonès i col·laboradors, 2010 (Taula S1 de material suplementari)<sup>4</sup>.**

<b>Virus</b>	<b>RCDI total</b>	<b>RCDI càpsida</b>	<b>RCDI proteïnes no estructurals</b>
<b>Virus de l'hepatitis A</b>	<b>1.63</b>	<b>1.73</b>	<b>1.61</b>
Aichi virus	1.39	1.42	1.41
Rinovirus 14	1.39	1.41	1.43
Rinovirus 2	1.37	1.42	1.39
Coxsackivirus B3	1.16	1.25	1.17
Poliovirus 1	1.14	1.16	1.21

Com a conseqüència d'aquest particular ús de codons, l'HAV utilitza molts codons rars. De fet, utilitza com a codons rars els codons que són rars per la cèl·lula i també els que la cèl·lula utilitza en abundància ja que els tRNA amb els que s'aparellen no estan fàcilment disponibles per al virus. Per tal de provar aquest biaix en l'ús de codons característic de l'HAV és pot utilitzar el *effective number of codons* (ENC o Nc), el qual mesura com l'ús de codons s'allunya de la condició en que tots els codons sinònims siguin utilitzats per igual<sup>6</sup>.

<sup>3</sup> Sánchez, G., Bosch, A., & Pintó, R.M. 2003. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J. Virol.* 77:452-459.

<sup>4</sup> Aragonès, Ll., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2010. Fine-tuning translational kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. *PLoS Path.* 6: e1000797.

<sup>5</sup> Pintó, R.M., Aragonès, Ll., Costafreda, M.I., Ribes, E. & Bosch, A. 2007. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res.* 127: 158-163.

<sup>6</sup> Wright, F. 1990. The 'effective number of codons' used in a gene. *Gene* 87: 23-29.

Per tant, el valor del ENC oscil·la entre 61, quan tots els codons sinònims s'utilitzen indistintament, i 20, quan només s'utilitza un codó per a cada aminoàcid i, per tant, el biaix en l'ús de codons és màxim. Segons es mostra en la Taula 4.1.2, mentre poliovirus i el virus de la febre aftosa tenen uns valors de ENC de 52.6 i 52.1 respectivament, l'HAV presenta un ENC de 38.1, la qual cosa indica que l'HAV té un ús de codons força esbiaixat i utilitza uns pocs codons de forma preferent i la resta de codons els usa en freqüències baixes. De fet, tal i com es pot observar en la Taula 4.1.2, en el cas de l'HAV 15 aminoàcids poden estar codificats per codons rars, mentre que en el cas dels altres dos picornavirus només 5 i 7 aminoàcids. A més, l'HAV utilitza un total de 27 codons rars diferents en el seu genoma, valors significativament superiors als de 8 i 7 que presenten els altres dos virus.

**Taula 4.1.2. Nc, nombre d'aminoàcids amb codons rars i nombre total de codons rars de diferents picornavirus. Extret de Sánchez i col·laboradors, 2003<sup>3</sup>.**

<b>Virus</b>	<b>Nc</b>	<b>Aminoàcids potencialment codificats per codons rars</b>	<b>Nombre total de codons rars</b>
<b>Virus de l'hepatitis A</b>	<b>38.1</b>	<b>15</b>	<b>25</b>
Poliovirus 1	52.6	5	8
Virus de la febre aftosa C	52.1	7	7

Des del punt de vista del biaix en l'ús de codons, aquest pot ser degut principalment a quatre factors: a la composició nucleotídica expressada com a contingut en G+C o biaix mutacional<sup>7</sup>, l'escapament a la resposta antivírica cel·lular<sup>8</sup>, l'adaptació als *pools* de tRNAs per a una traducció eficient i acurada o selecció traduccional<sup>7</sup> i, finalment, a l'adaptació als *pools* de tRNAs per assegurar una cinètica de traducció que permeti el correcte plegament de les proteïnes o sintonització fina de la cinètica de traducció<sup>7</sup>. En el cas de l'HAV, s'ha demostrat que no és la selecció traduccional sinó la regulació de la cinètica de traducció el mecanisme subjacent al biaix en l'ús de codons en la regió de la càpsida<sup>4</sup>, tot i que la pressió mutacional també hi contribueix<sup>9</sup>. A més, la baixa freqüència en que l'HAV utilitza el dinucleòtid CpG que, en no estar metilada la citosina quan si ho està en la cèl·lula, podria ser reconegut com a estrany i desencadenar la resposta immunològica innata en la cèl·lula, contribuiria també al biaix en l'ús de codons.

<sup>7</sup> Gingold, H. & Pilpel, Y. 2011. Determinants of translation efficiency and accuracy. *Mol. Syst. Biol.* 7: 481.

<sup>8</sup> Bosch, A., Mueller, S. & Pintó, R.M. 2010. Coding biases and viral fitness. *The Picornaviruses*. Ehrenfeld, E., Domingo, E., Ross, R.P. (Eds). ASM Press, Washington DC, USA, pp. 271-283.

<sup>9</sup> D'Andrea, L., Pintó, R.M., Bosch, A., Musto, H. & Cristina, J. 2011. A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in hepatitis A virus. *Virus Res.* 157: 19-24.

Durant la síntesi proteica, el plegament de la proteïna té lloc a mesura que aquesta s'està traduint i la cadena polipeptídica va abandonant el ribosoma, és a dir, és cotraduccional<sup>10</sup>, i, per tant, es requereix d'un mecanisme que coordini ambdós processos. S'ha proposat que la velocitat de traducció podria ser un d'aquests mecanismes<sup>11</sup> i podria ser regulada mitjançant l'efecte d'estructures secundàries del mRNA i/o de les combinacions adequades de codons abundants i rars en el mRNA<sup>12</sup>. Els codons abundants acostumen a aparellar-se amb tRNAs que es troben en altes concentracions i d'aquesta manera contribueixen tant a l'eficiència de la traducció, ja que són ràpidament transcrits, com a la seva exactitud, ja que són codons d'alta fidelitat<sup>7</sup>. Per contra, els codons rars es tradueixen més lentament i són codons de baixa fidelitat degut a que augmenten la probabilitat de que sigui incorporat un tRNA erroni mentre el complex traduccional espera que el tRNA apropiat, el qual es troba en baixes concentracions, es situï en el lloc A del ribosoma<sup>7</sup>. En aquest sentit, els llocs més importants, per exemple, els que pitjor suporten els errors durant la traducció, solen estar codificats per codons abundants d'alta fidelitat. De fet, la tendència de la selecció ha estat la de col·locar codons abundants d'alta fidelitat en els llocs en que una mutació generaria un canvi en l'estructura de la proteïna que resultaria en el plegament incorrecte d'aquesta<sup>13</sup>. D'altra banda, els codons rars jugarien un paper important en el control de la velocitat de traducció<sup>14,15</sup>, ja que les agrupacions de codons rars indueixen una parada transitòria del complex traduccional, a l'espera de que l'aminoacil-tRNA entri en el lloc A del ribosoma. Aquestes pauses durant la traducció ajudarien a dirigir el procés de plegament de la proteïna que és cotraduccional<sup>16,17</sup>, ja que permetrien el plegament seqüencial i independent dels diferents dominis de la cadena polipeptídica a mesura que aquesta va emergint del ribosoma<sup>12</sup>. Tan és així que en proteïnes que exerceixen funcions similars en espècies diferents, les quals mostren dominis funcionals i estructurals conservats, s'ha observat que el patró d'atenuació de la traducció,

---

<sup>10</sup> Fedorov, A.N. & Baldwin, T.O. 1997. Cotranslational protein folding. *J. Biol. Chem.* 272: 32715-32718.

<sup>11</sup> Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N. & Bukau, B. 2009. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 589-597.

<sup>12</sup> Komar, A.A. 2009. A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends Biochem. Sci.* 34: 16-24.

<sup>13</sup> Zhou, T., Weems, M. & Wilke, C.O. 2009. Translationally optimal codons associate with structurally sensitive sites in proteins. *Mol. Biol. Evol.* 26: 1571-1580.

<sup>14</sup> Chou, T. & Lakatos, G. 2004. Clustered bottlenecks in mRNA translation and protein synthesis. *Phys. Rev. Lett.* 93, 198101.

<sup>15</sup> Sorensen, M.A., Kurland, C.G. & Pedersen, S. 1989. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 207: 365-377.

<sup>16</sup> Zhang, G., Hubalewska, M. & Ignatova, Z. 2009. Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 274-280.

<sup>17</sup> Zhang, G. & Ignatova, Z. 2011. Folding at the birth of the nascent chain: coordinating translation with co-translational folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21: 25-31.

---

induït per les acumulacions de codons rars, ha evolucionant ajustant-se en funció de les variacions en la concentració de tRNAs pròpies de cada espècie per tal de garantir un plegament similar de la proteïna<sup>18</sup>. És a dir, que es conserven les agrupacions de codons rars de proteïnes funcionalment i estructuralment semblants al llarg de les espècies, encara que no específicament els mateixos codons rars. A més, existeixen diversos exemples que demostren que els codons rars tenen un paper important en el control de la velocitat de traducció, i que qualsevol canvi d'aquests per codons més freqüents pot afectar el plegament de la proteïna i, per tant, alterar la seva funció. De fet, la substitució de codons rars per codons més abundants en els gens d'*Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae* té com a resultat una traducció més ràpida, però les proteïnes que se sintetitzen presenten unes activitats específiques reduïdes<sup>19,20</sup>. A més, l'eficiència de plegament de la proteïna Sufl, proteïna multidomini d'*E. coli*, esdevé severament alterada després de la substitució sinònima de codons rars per codons abundants, que s'aparellen amb tRNA que es troben en altes concentracions<sup>16,17</sup>. També n'és un exemple, el fet de que una mutació silenciosa en el gen humà *MDR1*, també conegut com *ABCB1*, provoca un plegament diferencial de la proteïna que codifica, la glicoproteïna P, que és una proteïna transportadora de membrana, indicant que el canvi de conformació és causat per un desajust entre traducció i plegament<sup>21</sup>.

La regió P1 del genoma de l'HAV, que codifica per les proteïnes estructurals de la càpsida, presenta agrupacions de codons rars altament conservades i situades estratègicament als extrems carboxi-terminal de les proteïnes<sup>3</sup>. De fet, la importància de mantenir aquestes agrupacions de codons rars per tal d'assegurar el correcte plegament de la proteïna, podria contribuir en gran part a la baixa variabilitat de la càpsida de l'HAV<sup>22</sup>. Per tant, aquestes constriccions estructurals existents a la càpsida podrien ser una de les causes de la no emergència de nous serotips, malgrat que el virus repliqui seguint una dinàmica de quasiespècies<sup>23</sup>.

---

<sup>18</sup> Zhang, G. Ignatova, Z. 2009. Generic Algorithm to Predict the Speed of Translational Elongation: Implications for Protein Biogenesis. PLoS One 4: e5036.

<sup>19</sup> Crombie, T., Swaffield, J.C. & Brown, A.J.P. 1992. Protein folding within the cell is influenced by controlled rates of polypeptide elongation. J. Mol. Biol. 228: 7-12.

<sup>20</sup> Komar, A.A., Lesnik, T. & Reiss, C. 1999. Synonymous codon substitution affect ribosome traffic and protein folding during *in vitro* translation. FEBS Lett. 462: 387-391.

<sup>21</sup> Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V. & Gottesman, M.M. 2007. A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. Science 315: 525-528.

<sup>22</sup> Aragonès, Ll., Bosch, A., & Pintó, R.M. 2008. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. J. Virol. 82: 1688-1700.

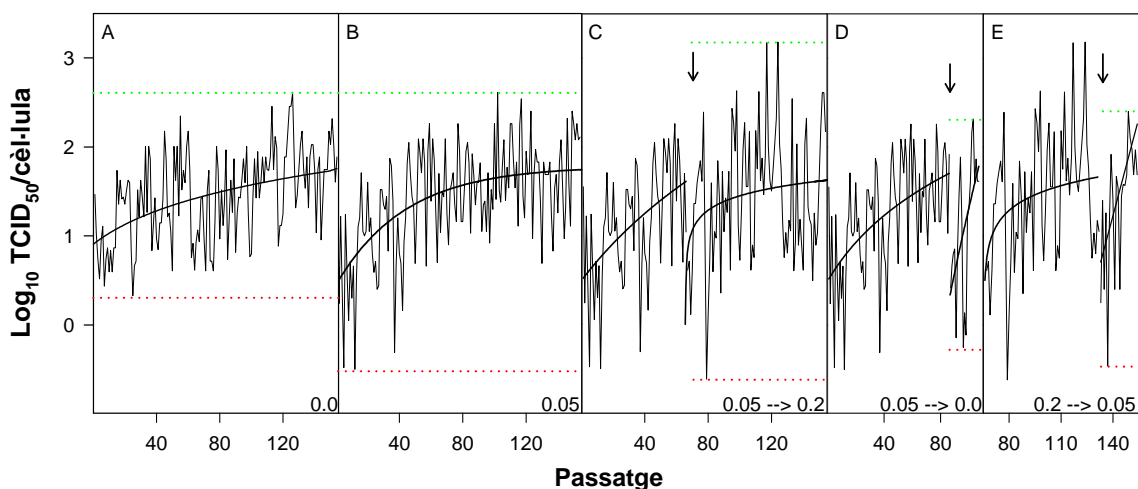
<sup>23</sup> Sánchez, G., Bosch, A., Gomez-Mariano, G., Domingo, E. & Pintó, R.M. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. Virology 315: 34-42.

---



De fet, l'anàlisi de l'espectre de mutants de l'HAV sota la pressió selectiva dels anticossos monoclonals (MAbs) K34C8 i H7C27 ha mostrat una clara selecció negativa de les substitucions que afecten residus codificats per codons rars de la superfície de la càpsida<sup>22</sup>, confirmant així el paper beneficiós d'aquests codons rars.

D'altra banda, estudis realitzats amb la finalitat de reoptimitzar l'ús de codons de l'HAV han suggerit que l'adaptació de l'ús de codons a la disponibilitat de tRNAs necessita trobar un equilibri entre la velocitat de traducció i el correcte plegament de les proteïnes per tal de que el virus assoleixi un *fitness* alt<sup>4</sup>. En aquests estudis, en els que l'HAV replicava en condicions de *shut off* cel·lular induït gràcies a l'Actinomicina D (AMD), droga que inhibeix la síntesi de proteïnes cel·lulars inhibint les RNA polimerases DNA dependents de la cèl·lula sense afectar la RNA polimerasa RNA dependent del virus, s'observava una pèrdua significativa del *fitness* com a resposta immediata del virus en aquest nou ambient amb una major disponibilitat de tRNAs (Fig. 4.1). La recuperació de *fitness* es donava més tard durant el procés d'adaptació (Fig. 4.1) i s'associava a una re-deoptimització en l'ús de codons, i no pas a la optimització que s'esperava en aquestes condicions de menor competència entre virus i cèl·lula<sup>4</sup>. Com que aquesta re-deoptimització s'observava específicament en la regió que codifica les proteïnes de la càpsida, afectant sobretot els codons rars del virus que són utilitzats de forma abundant per la cèl·lula, aquests resultats suggereixen una sintonització fina de la cinètica de traducció com a mecanisme de selecció inherent al biaix d'ús de codons d'aquesta regió<sup>4</sup>.



**Fig. 4.1.** Títol infecció de la soca pHM175 43c de l'HAV en presència o absència d'AMD. El virus es va fer créixer en absència d'AMD (A) i en presència de 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD (B). Al passatge 65 en 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD, es va passar a cultivar el virus en 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD (C). Al passatge 85 en 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD, el virus es va tornar a passar en absència d'AMD (D). Després de 67 passatges en 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD el virus es tornà a passar en 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD (E).

Així doncs, s'ha postulat que l'HAV necessita una cinètica de traducció acurada, basada en les pauses del ribosoma en les agrupacions de codons rars, per un plegament correcte de les proteïnes de la càpsida. A més, cal tenir en compte que, en el plegament de la càpsida de l'HAV no sembla que hi intervinguin chaperones, al contrari del que passa en altres picornavirus<sup>4,24,25</sup>, fet que podria suposar una major dependència de la velocitat de traducció per al correcte plegament de la càpsida.

Malgrat que l'estudi del genoma de les poblacions adaptades i no adaptades a replicar en presència d'AMD ens havia mostrat com evolucionava l'ús de codons en aquestes condicions<sup>4</sup>, restava per demostrar com el canvi en l'ús de codons influïa directament en el plegament de les proteïnes estructurals. En el present treball es recullen una sèrie de resultats que posen de manifest el fet de que l'ús de codons pot afectar a la conformació de la càpsida i, entre altres coses, a l'inici del cicle replicatiu.

---

<sup>24</sup> Geller, R., Vignuzzi, M., Andino, R. & Frydman, J. 2007. Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance. *Genes Dev.* 21: 195-205.

<sup>25</sup> Geller, R., Taguwa, S. & Frydman, J. 2012. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1823: 698-706.

---



## 4.2. MATERIAL I MÈTODES

### 4.2.1. CÈL·LULES I VIRUS

#### 4.2.1.1. Soques víriques

En aquest estudi s'ha utilitzat la soca citopatógena pHM-175 43c de l'HAV<sup>26</sup> i algunes de les poblacions obtingudes després de replicar aquesta soca en presència d'Actinomicina D (AMD, Sigma). Aquestes poblacions havien estat prèviament obtingudes a partir de passatges seriatos, a intervals de 7 dies, en 0.0 µg/ml, 0.05 µg/ml i 0.2 µg/ml d'AMD i utilitzant una multiplicitat d'infecció (m.o.i) d'1<sup>4</sup>. També es disposava de poblacions adaptades a replicar en presència de 0.05 i 0.2 µg/ml d'AMD que s'havien retornat a les condicions de 0.0 i 0.05 µg/ml d'AMD respectivament<sup>4</sup>.

---

<sup>26</sup> Cromeans, T., Sobsey, M.D. & Fields, H.A. 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. J. Med. Virol. 22: 45-56.

---

A continuació es detallen les poblacions que s'han utilitzat al llarg d'aquest estudi:

**L0 o població parental:** passatge 36 de la soca pHM-175 43c de l'HAV, adaptat a 0.0 µg/ml d'AMD, a partir de la qual s'originava l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD.

**F0.05NA o població no adaptada a 0.05 µg/ml d'AMD:** passatge previ a l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD, el qual no presentava canvis estadísticament significatius en l'ús de codons respecte L0.

**F0.05A o població adaptada a 0.05 µg/ml d'AMD:** passatge adaptat a 0.05 µg/ml d'AMD, el qual sí presentava canvis significatius en l'ús de codons respecte L0. L'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD i la reversió de 0.05 a 0.0 µg/ml d'AMD s'originaven a partir d'aquesta població.

**F0.05LA o població llargament adaptada a 0.05 µg/ml d'AMD:** passatge llargament adaptat a 0.05 µg/ml d'AMD, el qual sí presentava canvis significatius en l'ús de codons respecte L0 i respecte F0.05A.

**F0.2NA o població no adaptada a 0.2 µg/ml d'AMD:** passatge previ a l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD, el qual no presentava canvis estadísticament significatius en l'ús de codons respecte F0.05A del qual provenia.

**F0.2A o població adaptada a 0.2 µg/ml d'AMD:** passatge adaptat a 0.2 µg/ml d'AMD, el qual sí presentava canvis significatius en l'ús de codons respecte el F0.05A.

**F0.2LA o població llargament adaptada a 0.2 µg/ml d'AMD:** passatge llargament adaptat a 0.2 µg/ml d'AMD, el qual sí presentava canvis significatius en l'ús de codons respecte F0.05A i F0.2A. La reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD s'originava a partir d'aquesta població.

**RONA o població no adaptada a la reversió de 0.05 a 0.0 µg/ml d'AMD:** passatge previ a la re-adaptació de 0.05 a 0.0 µg/ml d'AMD, el qual no presentava canvis en l'ús de codons respecte F0.05A a partir del qual s'iniciava la reversió.

**ROA o població adaptada a la reversió de 0.05 a 0.0 µg/ml d'AMD:** passatge re-adaptat a 0.0 µg/ml d'AMD, el qual sí presentava canvis en l'ús de codons respecte F0.05A a partir del qual s'iniciava la reversió, i revertia parcialment els canvis en l'ús de codons acumulats durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD .

**R0.05NA o població no adaptada a la reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD:** passatge previ a la re-adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD, el qual no presentava canvis en l'ús de codons respecte F0.2LA a partir del qual s'iniciava la reversió.

**R0.05A o població adaptada a la reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD:** passatge re-adaptat a 0.05 µg/ml d'AMD, el qual sí presentava canvis en l'ús de codons respecte F0.05A a partir del qual s'inicia la reversió, i revertia parcialment els canvis en l'ús de codons acumulats durant l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD .

#### **4.2.1.2. Línies cel·lulars**

La població parental L0 i les diferents poblacions derivades de l'adaptació a AMD, així com les poblacions retornades a les condicions inicials, es feien replicar a les cèl·lules FRhK-4 (ATCC CRL 1688), línia cel·lular epiteloide i contínua derivada de cèl·lules embrionàries de ronyó de mono rhesus (*Macaca mulatta*).

La línia cel·lular FRhK-4 es cultivava a 37°C en medi essencial mínim (MEM) suplementat amb un 15% de sèrum fetal de vedella (*fetal calf serum*, FCS), aminoàcids no essencials, antibiòtics i solucions tamponadores, segons s'ha detallat en l'apartat 1.2.1.2. del capítol anterior. Com ja s'ha comentat, les cèl·lules es subcultivaven cada 7-8 dies i amb una relació de multiplicació 1:3, obtenint una monocapa confluent després de la incubació durant 2-3 dies a 37°C. El suport físic utilitzat per al creixement de les cèl·lules eren flascons plans de poliestirè de 25 cm<sup>2</sup> o 175 cm<sup>2</sup> de superfície (T-25 o T-175 cm<sup>2</sup>).

#### **4.2.1.3. Replicació de l'HAV en presència de 0.0 µg/ml, 0.05 µg/ml i 0.2 µg/ml d'AMD**

Els estocs vírics emprats en els experiments s'obtenien infectant amb cada una de les poblacions a estudiar cèl·lules FRhK-4 que formaven monocapes en flascons de cultiu T-25 cm<sup>2</sup>. El protocol que se seguia es detalla a continuació:

- Decantar el medi de creixement dels flascons de cultiu i infectar la monocapa amb una m.o.i d'1 virus infecció per cada cèl·lula.
- Incubar els flascons infectats a 37°C durant 60 min per a permetre l'adsorció del virus a les cèl·lules.
- Incorporar el medi postinfecció, de composició idèntica al medi de creixement però amb un 2 % de FCS, i la concentració corresponent d'AMD.
- Incubar a 37°C durant 7 dies.

- Lisar les cèl·lules mitjançant tres cicles de congelació-descongelació a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifugar el cultiu lisat a  $4,000 \times g$  durant 20 min per tal d'obtenir una suspensió vírica lliure de restes cel·lulars grolleres.
- Guardar la suspensió vírica a  $-80^{\circ}\text{C}$ , excepte les alíquotes en ús que es guardaven a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.1.4. Obtenció de suspensions víriques concentrades**

El procediment emprat per a la obtenció de suspensions víriques concentrades de les poblacions de l'HAV obtingudes en presència o absència d'AMD era idèntic al detallat en l'apartat 3.2.1.4 del capítol anterior. Tanmateix, el medi postinfecció duia la mateixa concentració d'AMD que s'havia utilitzat per obtenir cada població. A més, quan la concentració d'AMD era de  $0.2 \mu\text{g/ml}$  la infecció es tallava als 4 dies ja que a partir d'aquest moment un alt percentatge de cèl·lules es perdien en el sobrenedant degut a la citotoxicitat ocasionada per l'alta concentració d'AMD. Quan la concentració d'AMD era de  $0.0 \mu\text{g/ml}$  ó  $0.05 \mu\text{g/ml}$  la infecció es tallava als 5-6 dies.

#### **4.2.2. ANÀLISI DEL RECONeixEMENT DE LES POBLACIONS PER DIFERENTS ANTICOSSOS MONOCLONALS**

El reconeixement de les poblacions adaptades i no adaptades a replicar en AMD pels MAb K34C8 i K24F2 (adquirits a Commonwealth Serum Laboratories, Victoria, Australia), dirigits contra el lloc immunodominant<sup>27</sup>, i el MAb H7C27 (cedit pel Dr. R. Decker de Abbot Laboratories, Illinois, E.E.U.U.), dirigit contra el lloc d'unió a la glicoforina A<sup>28</sup>, es van analitzar mitjançant ELISA de captura, en el que l'HAV es capturava amb un sèrum convaléscent, HCS-2, (cedit pel Dr. R. Lluna del Hospital Militar de Barcelona) amb el que prèviament s'havia sensibilitzat la placa, i es detectava mitjançant els MAbs K34C8, K24F2 o H7C27. El protocol que se seguia es detalla a continuació:

---

<sup>27</sup> Ping, L.H. & Lemon, S.M. 1992. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol* 66: 2208-2216.

<sup>28</sup> Sánchez, G., Aragonès, Ll., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2004. Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycoporphin A of the erythrocyte membrane. *J. Virol.* 78: 9807-9813.

---

- Afegir a una placa de 96 pous (Sarsted) 50µl/pou de l'anticòs policlonal HCS-2 diluït 1:10,000 en tampó de recobriment i incubar durant una nit a 4°C.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó d'ELISA.
- Bloquejar la placa amb 50µl/pou de tampó d'ELISA durant 1 h a 37°C.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó d'ELISA.
- Afegir 50µl/pou de les suspensions víriques concentrades de les diferents poblacions a analitzar i incubar a 37°C durant 2 h. Totes les suspensions víriques s'havien ajustat prèviament a una concentració de  $1.6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml. En cada assaig es realitzaven un mínim de 4 rèpliques per població i MAb.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó d'ELISA.
- Afegir 50µl/pou del MAb diluït en tampó d'ELISA i incubar durant 3 h a 37°C. Els MAbs K34C8 i H7C27 s'utilitzaven a una dilució 1:10,000, en canvi, el MAb K24F2 a una dilució 1:250. Tots els MAbs eren de ratolí.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó d'ELISA.
- Afegir 50µl/pou de l'anticòs policlonal anti-IgG de ratolí (Sigma) conjugat amb peroxidasa diluït 1: 10.000 (seguint les instruccions del proveïdor).
- Incubar a 37°C durant 1 h.
- Realitzar tres rentats amb 50µl/pou de tampó d'ELISA.
- Afegir 50µl/pou de tampó citrat-OPD (1,2, fenilendiamine) i incubar a 37°C fins l'aparició de color (aproximadament 10 min).
- Neutralitzar la reacció cromogènica amb 25µl/pou d'àcid sulfúric 1N.
- Lectura de l'absorbància a 492 nm amb un lector automàtic MULTISKAN PLUS (Labsystems).

#### SOLUCIONS NECESSÀRIES:

Tampó de recubriment:

NaCO<sub>3</sub>.....15 mM

NaHCO<sub>3</sub>.....35 mM

En H<sub>2</sub>O<sub>D</sub>, pH 9.6.

Conservar a 4°C durant un màxim de 15 dies.



Tampó ELISA:

BSA.....3mg/ml  
Tween 20.....0.05 % (v/v)  
En PBS.  
Conservar a -20°C.

Tampó citrat:

Citrat sòdic.....30 mM  
Àcid cítric.....20 mM  
En H<sub>2</sub>O Milli-Q.  
Conservar a -20°C.

Tampó citrat-OPD:

OPD.....4 mM  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)...0.1 % (v/v)  
En tampó citrat.  
Ús immediat.

#### **4.2.3. ANÀLISI DE LES PROPIETATS FÍSQUES DE LA CÀPSIDA**

Per tal de valorar la resistència de la càpsida de les diferents poblacions sota estudi, els virus van ser incubats a alta temperatura, a pH àcid i en presència de sals biliars. El tractament a alta temperatura es va realitzar sotmeten als virus a una temperatura de 61°C±0.5°C durant 5 min; el de pH àcid es va realitzar incubant els virus a 37°C durant 1 i 3 h a pH de 2.0 i per al tractament amb sals biliars els virus es van incubar a 37°C amb 1 % de sals biliars durant 4 h. Com a control s'utilitzaven les mateixes poblacions virals que en el cas dels tractaments però, en aquest cas, només eren sotmeses a incubació a 37°C, sense cap tipus de tractament, durant els temps corresponents. Després de les diferents incubacions es quantificava el títol infecció de les poblacions, segons el mètode de la TCID<sub>50</sub> que s'ha detallat en l'apartat 3.2.1.5 del capítol anterior. Comparant les quantificacions de cada població amb i sense tractament, es calculaven les caigudes dels títols després dels tractaments expressant-les com a Log<sub>10</sub> (N<sub>t</sub>/N<sub>0</sub>), on N<sub>0</sub> era el títol infecció sense el tractament i N<sub>t</sub> el títol infecció després del tractament.

#### 4.2.4. ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ AMB EL RECEPTOR

L'estudi de la eficiència de la interacció amb el receptor de les diferents poblacions es va realitzar quantificant els virus infecciosos que restaven a sobrenedant 120 min després de que les poblacions s'inocuessin sobre monocapes de FRhK-4. El protocol que se seguia era el següent:

- Preparar monocapes confluents de FRhK-4 en plaques de 24 pous.
- Aspirar amb pipeta el medi de creixement dels pous i infectar les monocapes amb les diferents poblacions a raó de 200 µl/pou utilitzant una m.o.i d'1.
- Incubar les plaques a 37°C i recollir una mostra de 10 µl de l'inòcul a temps 0 i 120 min.
- Quantificar els virus infecciosos en les diferents mostres recollides emprant el càlcul de la TCID<sub>50</sub>.
- Comparar els nivells de virus infecciosos obtinguts a temps 0 i 120 min per calcular el percentatge de virus units al receptor.

#### 4.2.5. ANÀLISI DE LA CINÈTICA DE DESENCAPSIDACIÓ

Per als estudis de la cinètica de desencapsidació s'utilitzava la tècnica clàssica del roig neutre<sup>29,30</sup>. Aquesta tècnica es basa en fer replicar el virus en presència de roig neutre, de manera que les partícules víriques que es produeixen contenen roig neutre a l'interior de la càpsida. Així els virus esdevenen fotosensibles, ja que en llum visible el roig neutre pateix una reacció de fotoxidació que danya el genoma del virus. Però només són fotosensibles fins al moment en que té lloc la desencapsidació de l'RNA, perquè a partir d'aquest moment el roig neutre queda diluït en el citoplasma de la cèl·lula i l'RNA pot continuar el cicle replicatiu amb normalitat. A continuació es descriu el protocol que es va seguir.

- Preparar monocapes confluents de FRhK-4 en flascons de cultiu de 25 cm<sup>2</sup>.
- Decantar el medi de creixement dels flascons i infectar la monocapa amb les diferents poblacions a estudiar i amb una m.o.i d'1.
- Incubar els flascons infectats a 37°C durant 60 min per a permetre l'adsorció del virus a les cèl·lules.

---

<sup>29</sup> Mandel, B. 1967. The relationship between penetration and uncoating of poliovirus in HeLa cells. *Virology* 82: 25-36.

<sup>30</sup> Crowther, D. & Melnick, J.L. 1961. The incorporation of neutral red and acridine orange into developing poliovirus making them photosensitive. *Virology* 14: 11-21.

---

- Incorporar el medi postinfecció amb un 2 % de FCS, la concentració corresponent d'AMD (0, 0.05 o 0.2 µg/ml) i un 0.001 % de roig neutre (Sigma).
- Tapar els flascons amb paper d'alumini i incubar a 37°C durant 5 dies.
- Lisar les cèl·lules mitjançant tres cicles de congelació-descongelació a -80°C, mantenint sempre els flascons protegits de la llum.
- En una habitació fosca, passar els lisats a tubs de 10 ml i tapar-los amb paper d'alumini.
- Centrifugar el cultiu lisat a 4,000 x g durant 20 min per tal d'obtenir una suspensió vírica lliure de restes cel·lulars.
- En habitació fosca, amb l'ajut d'una llum vermella, inocular 8 plaques de 96 pous amb dilucions seriades 1/10 en PBS de cadascuna de les suspensions víriques obtingudes, tal i com s'ha descrit per al càlcul de la TCID<sub>50</sub> en l'apartat 1.2.1.5. del capítol anterior. Com a control negatiu s'afegia el mateix volum de PBS als 8 pous d'una columna de la placa.
- Incubar les plaques a 37°C durant 60 min en una atmosfera enriquida amb un 5 % en CO<sub>2</sub> i tapades amb paper d'alumini.
- En habitació fosca, afegir el medi postinfecció amb un 2% de FCS i retornar la placa tapada amb paper d'alumini a 37°C i 5 % de CO<sub>2</sub>.
- Exposar les plaques sota la llum de la cabina als temps de 1, 3, 6, 9, 12 i 24 h després de la inoculació, tenint en compte que inicialment s'infectaven per a cada població tantes plaques com temps a analitzar. Com a control s'infectava una placa que es mantenia sempre tapada i protegida de la llum fins el moment de la lectura i una placa que era exposada a la llum a temps 0 h.
- Retornar les plaques exposades a la llum a l'incubador ara sense necessitat de tapar-les amb paper d'alumini.
- Incubar a 37°C i 5 % de CO<sub>2</sub> durant 11 dies.
- Realitzar les lectures de presència/absència d'ECP per cada pou infectat als 8-9 dies i efectuar una lectura addicional i definitiva als 11 dies, moment en el que es considerava que la lectura ja no canviaria.
- Calcular la TCID<sub>50</sub> en cada un dels temps estudiats.
- Calcular el temps necessari per a la desencapsidació del 50 % dels virus (UT<sub>50</sub>) a partir de la cinètica de desencapsidació de cada població.

#### 4.2.6. ANÀLISI DE LA INFECTIVITAT ESPECÍFICA

Per a dur a terme aquests experiments, s'infectaven, utilitzant una m.o.i de 0.1, monocapes de cèl·lules FRhK-4 formades en plaques de 24 pous, amb les diferents poblacions sota estudi. Les monocapes infectades s'incubaven durant 5 dies a 37°C, moment en el que es recollien els sobrenedants. Les infectivitats específiques es determinaven utilitzant el títol de virus infecciosos i genomes presents en el sobrenedant de les cèl·lules infectades als 5 dies postinfecció. La quantificació de virus infecciosos, obtinguda a través del càlcul de la TCID<sub>50</sub>/ml descrit en l'apartat 3.2.1.5. del capítol anterior, es comparava amb la quantificació de les còpies genòmiques/ml, obtinguda mitjançant la RT-PCR a temps real del 5'NCR, per a cada una de les poblacions a estudiar. El protocol de la RT-PCR a temps real del 5'NCR era similar al descrit per Costafreda i col·laboradors<sup>31</sup> (Annex) i detallat en l'apartat 3.2.6.1., però en aquest cas s'utilitzava el *kit Platinum<sup>®</sup> qRT-PCR ThermoScript<sup>™</sup> One-Step System* (Invitrogen), cosa que implicava algunes modificacions del protocol, el qual es mostra a continuació.

Preparació de la barreja de reacció per a la RT-PCR a temps real			
Reactiu		Volum	Concentració final
2X ThermoScript Reaction Mix		12.5 µl	1X
0.1 mM <i>primer</i> HAV 68 (Sigma Aldrich)		0.125 µl	0.5 µM
0.1 mM <i>primer</i> HAV 240 (Sigma Aldrich)		0.225 µl	0.9 µM
50 µM sonda HAV 150(-)		0.125 µl	0.25 µM
ThermoScript <sup>™</sup> Plus/ Platinum <sup>®</sup> Taq Enzyme Mix		0.5 µl	
H <sub>2</sub> O desionitzada lliure de DNAses i RNAses (Invitrogen)		6.525 µl	
Extracte d'àcids nucleics		5 µl	
Volum total		25 µl	
Programa de RT-PCR:			
Fases de la RT-PCR	Temperatura	Temps	Cicles
Transcripció Reversa	55°C	60'	1X
Desnaturalització inicial/ Activació polimerasa	95°C	5'	1X
Desnaturalització	95°C	15''	45X
Hibridació	60°C	1'	
Extensió	65°C	1'	
La fluorescència es mesurava al final de cada cicle			

<sup>31</sup> Costafreda, M.I., Bosch, A. & Pinto, R.M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3846-3855.

La determinació de la infectivitat específica a sobrenedant de 5 dies, sense forçar la lisi cel·lular servia com una estimació del nombre de virus necessaris per dur a terme un cicle infecció i no pas com una mesura dels virus infecciosos produïts a partir de cada genoma.

#### **4.2.7. ANÀLISI DE LES UNITATS MORFOGÈNIQUES EN LES POBLACIONS VÍRIQUES ADAPTADES I NO ADAPTADES A REPLICAR EN PRESENCIA D'AMD**

Per tal de separar el virus infecció (150S i 125S) de les partícules buides que no han encapsidat el genoma (70S) i de les subunitats estructurals (14S), es partia de suspensions concentrades de virus obtingudes tal i com s'ha descrit en l'apartat 3.2.1.4. del capítol anterior i en el 4.2.1.4. del present capítol i se seguia el protocol descrit a continuació:

- Sonicar els virus recuperats en el sobrenedant, tres cicles de 30 segons a 60 W, en presència de 0.4 % de SDS.
- Ultracentrifugar aquests estocs vírics concentrats a través de gradients de sacarosa del 15 % al 45 %, a 205.000 x g durant 170 min. En cada gradient de 9 ml es carregava 1 ml de concentrat de virus, volum corresponent al processament de 2 flascons T-175 cm<sup>2</sup>.
- Recol·lectar el gradient en fraccions de 0.5 ml.

La identificació de les fraccions amb el virus infecció (150S i 125S), amb les partícules buides (70S) i amb els pentàmers (14S) es realitzava en funció del coeficient de sedimentació i l'antigenicitat obtinguda mitjançant ELISA de captura, en el que l'HAV es capturava amb un sèrum convalescent (HCS-2), amb el que prèviament s'havia sensibilitzat la placa, i es detectava mitjançant els MAb's K24F2 i K34C8, dirigits contra l'epítot immunodominant. El protocol seguit era idèntic al descrit per als MAb's K24F2 i K34C8 en l'apartat 4.2.3. i les mostres a analitzar eren les fraccions dels diferents gradients. A partir de la suma de les antigenicitats dels pics corresponents a les fraccions 150S, 125S, 70S i 14S es calculaven les proporcions relatives de cada fracció per a cada població a analitzar.

Abans d'iniciar el procediment descrit es quantificava el títol infecció de les suspensions víriques concentrades, segons el càlcul de la TCID<sub>50</sub> descrit en l'apartat

3.2.1.5. del capítol anterior, per tal d'igualar la concentració de virus infecciosos de la que es partia en els diferents gradients.

#### 4.2.8. ANÀLISI DE LA MORFOLOGIA DE LES CALBES

Amb l'objectiu d'observar possibles canvis en la velocitat de replicació de les poblacions estudiades, es va realitzar un assaig de unitats formadores de calbes o PFUs ("plaque forming unit"), amb la intenció d'analitzar la morfologia de les calbes generades per cada població, ja que, en general, calbes més grans indiquen una major velocitat de replicació. El protocol emprat, descrit inicialment per Cromeans i col·laboradors<sup>26</sup>, era el següent:

- Preparar monocapes confluents de FRhK-4 en plaques de 6 pous.
- Aspirar amb pipeta el medi de creixement dels pous i infectar la monocapa amb dilucions seriades 1:10 de les diferents poblacions a raó de 200 µl/pou.
- Incubar les paques de 6 pous infectades a 37°C durant 60 min per a permetre l'adsorció dels virus a les cèl·lules.
- Afegir 3 ml/pou de medi postinfecció, que contenia un 0.5 % d'agarosa i MgCl<sub>2</sub> a una concentració final de 26 mM, i deixar les plaques a temperatura ambient fins que el medi solidificava (10 min aproximadament). Els experiments es van realitzar sense i amb 0.05 µg/ml d'AMD, que s'afegia al medi postinfecció abans de repartir-lo en els pous infectats. No es va testar 0.2 µg/ml d'AMD degut a la forta toxicitat associada a aquesta concentració.
- Incubar a 37°C durant 10 dies en una atmòsfera enriquida amb un 5% de CO<sub>2</sub>.
- Fixar les cèl·lules amb 2 ml/pou de formaldehid 4 % (MERK) durant 6 h a temperatura ambient.
- Retirar la capa d'agarosa i tenyir les calbes amb una solució de cristall violeta i formaldehid.
- Rentar amb H<sub>2</sub>O l'excés de colorant.
- Mesurar el diàmetre de les calbes.

### SOLUCIONS NECESSÀRIES:

MEM 2X: Es prepara amb sals de Earle i de la mateixa manera que el MEM 1X però a una concentració 2X i se suplementa amb:

FCS.....	4% (v/v)
L-Glutamina (400 mM).....	8mM
NEAA (100x).....	2x
HEPES 1M.....	30mM
Bicarbonat (7.5 % (p/v)).....	4% (v/v)
Penicilina/Estreptomicina.....	200U/ml-200µg/ml

En MEM 2X amb sals de Earle autoclavat 15'  
Suplementar en condicions d'esterilitat

### Agarosa 1 %:

Es prepara una solució amb un 1% d'agarosa *SeaPlaque<sup>®</sup> GTG<sup>®</sup> Agarose* (Lonza), en PBS. L'agarosa es fon al mateix temps que s'esterilitza per autoclau 15 min.

### MgCl<sub>2</sub>:

Es prepara una solució de MgCl<sub>2</sub> 1.3 M, en H<sub>2</sub>O Milli-Q, i s'esterilitza per autoclau 15 min.

### Medi postinfecció:

Es barreja a parts iguals el MEM 2X i l'agarosa al 1 % per tal d'obtenir MEM 1X amb un 0.5 % d'agarosa, i s'afegeix el MgCl<sub>2</sub> 1.3M per a una concentració final de 26 mM de MgCl<sub>2</sub>

### Solució de cristall violeta:

Cristall violeta.....	1.3g/l
Formaldehid 37%.....	30% (v/v)
Alcohol isopropílic 95%.....	5% (v/v)

En H<sub>2</sub>O  
Diluir 1:2 abans d'utilitzar aquesta solució

#### **4.2.9. ANÀLISIS ESTADÍSTIC**

Per determinar si hi havia diferències estadísticament significatives entre les poblacions es va utilitzar el test T-Student. Els resultats s'expressaren com a mitja  $\pm$  l'error estàndard.





## 4.3. RESULTATS

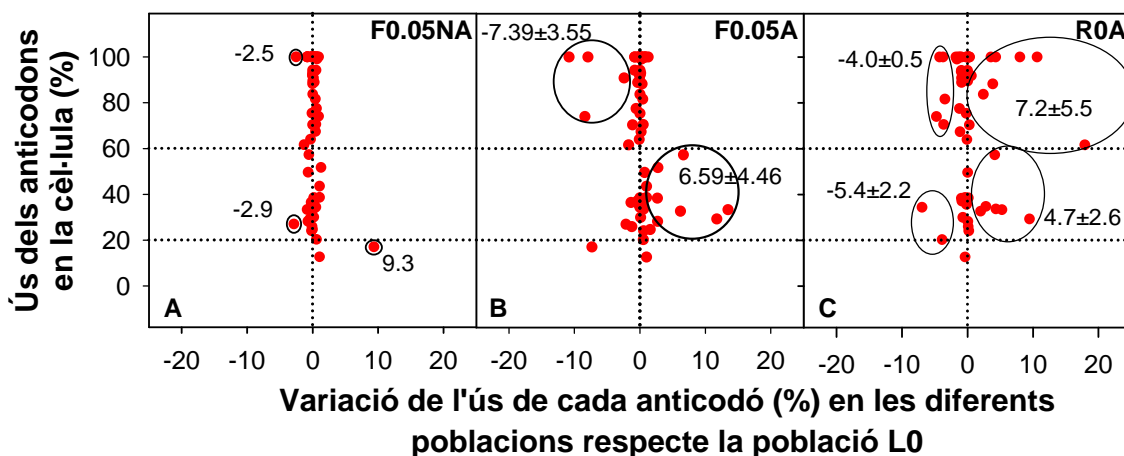
### **4.3.1. LA CAIGUDA I LA RECUPERACIÓ DE *FITNESS* QUE PRESENTA L'HAV AL REPLICAR EN CONDICIONS DE SILENCIAMENT PARCIAL DE LA SÍNTESI DE PROTEÏNES CEL·LULARS, SÓN DEGUEDES A CANVIS EN EL PLEGAMENT DE LA CÀPSIDA QUE DETERMINEN LA CAIGUDA I LA RECUPERACIÓ DE LA INTERACCIÓ AMB EL RECEPTOR, RESPECTIVAMENT**

En estudis previs en els que s'adaptava l'HAV a replicar en condicions de *shut off* cel·lular induït artificialment, inhibint específicament la traducció cel·lular amb l'AMD, es va determinar que una concentració de 0.05 µg/ml d'AMD induïa una inhibició de la síntesi de proteïnes del 60%<sup>4</sup>. En els mateixos estudis es va observar que la replicació de l'HAV en presència de 0.05 µg/ml d'AMD anava acompanyada d'una reducció del *fitness* del virus, definit com la producció de virus, durant els primers passatges, seguida d'una recuperació (Taula 4.3.1.1).

**Taula 4.3.1.1. Evolució de la producció vírica, calculada com el  $\text{Log}_{10}$  ( $\text{TCID}_{50}/\text{cèl}\cdot\text{lula}$ ), durant l'adaptació a  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD així com durant el retorn a absència d'AMD. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres  $a = ab$ ;  $ab = b$ ;  $a \neq b$ .**

	$\text{Log}_{10}$ ( $\text{TCID}_{50}/\text{cèl}\cdot\text{lula}$ )
<b>L0</b>	$1.43 \pm 0.04^a$
<b>F0.05NA</b>	$0.73 \pm 0.12^b$
<b>F0.05A</b>	$1.54 \pm 0.08^a$
<b>F0.05LA</b>	$1.64 \pm 0.05^a$
<b>R0NA</b>	$1.01 \pm 0.17^b$
<b>ROA</b>	$1.70 \pm 0.12^a$

Aquesta recuperació que mostraven les poblacions adaptades a  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD, s'associava a una re-deoptimització de l'ús de codons en la regió de la càpsida<sup>4</sup>. Així, si s'analitzava l'ús teòric d'anticodons, classificant-los en tres grups segons si la cèl·lula els utilitzava en una proporció de menys del 20%, entre el 20% i el 60% o més del 60%, s'observava que durant l'adaptació a  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD el virus incrementava l'ús del grup d'entre el 20% i el 60% i disminuïa l'ús del grup per sobre el 60% (Fig. 4.3.1.1).



**Fig. 4.3.1.1. Variació de l'ús d'anticodons en la regió codificant per la càpsida durant el procés d'adaptació a  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD. Es mostra el percentatge de variació de l'ús de cada anticodó entre les poblacions F0.05NA, F0.05A o R0A i la població L0, respecte l'ús de codons cel·lular. (A) Població no adaptada F0.05NA. (B) Població F0.05A adaptada a replicar en presència de  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD. (C) Població re-adaptada a l'absència d'AMD R0A.**

---

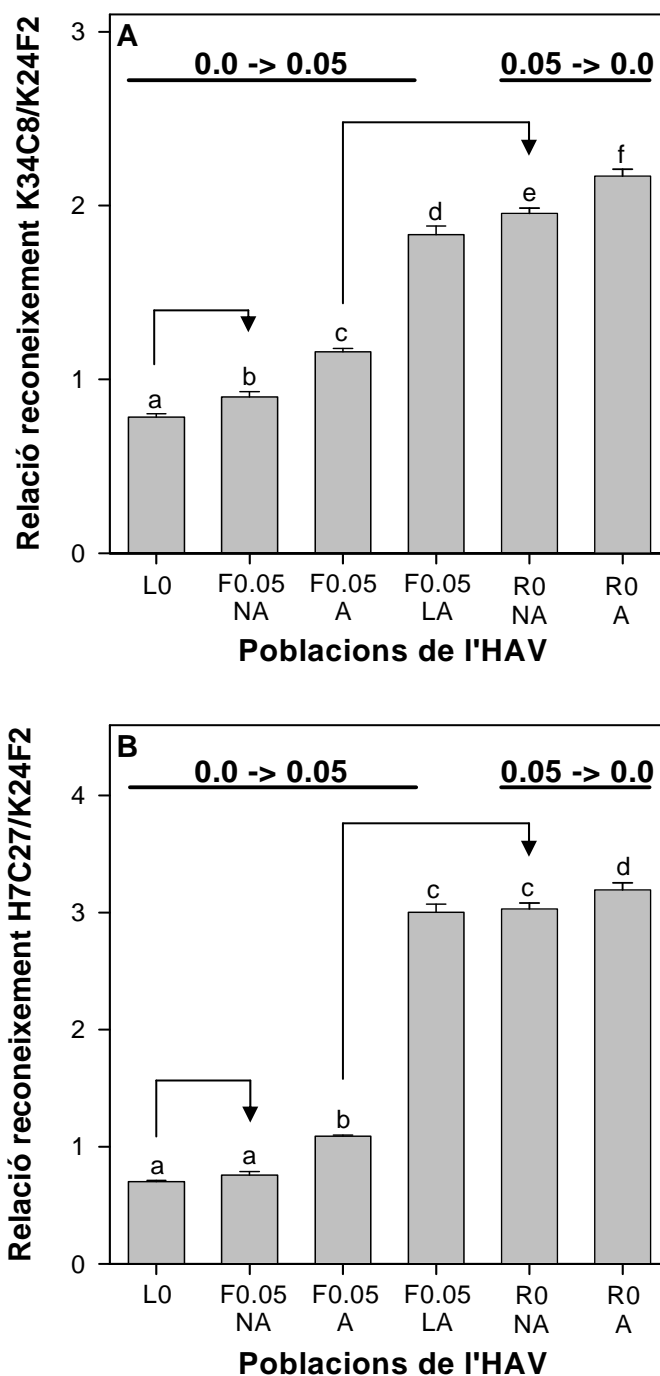
A més, quan la població adaptada es tornava a cultivar en condicions de no silenciament de la síntesi proteica en absència d'AMD, també s'observava una davallada de la producció de virus seguida d'una recuperació (Taula 4.3.1.1), que en aquest cas anava associada a una certa reversió dels canvis en l'ús de codons. En aquest sentit, el virus augmentava l'ús del grup d'anticodons usats per sobre el 60% i disminuïa l'ús del grup d'anticodons usats entre el 20% i el 60% (Fig. 4.3.1.1).

Per tal de confirmar que aquests canvis en l'ús de codons podien afectar el plegament de les proteïnes estructurals i donar lloc a canvis en la conformació de la càpsida es van estudiar diverses característiques.

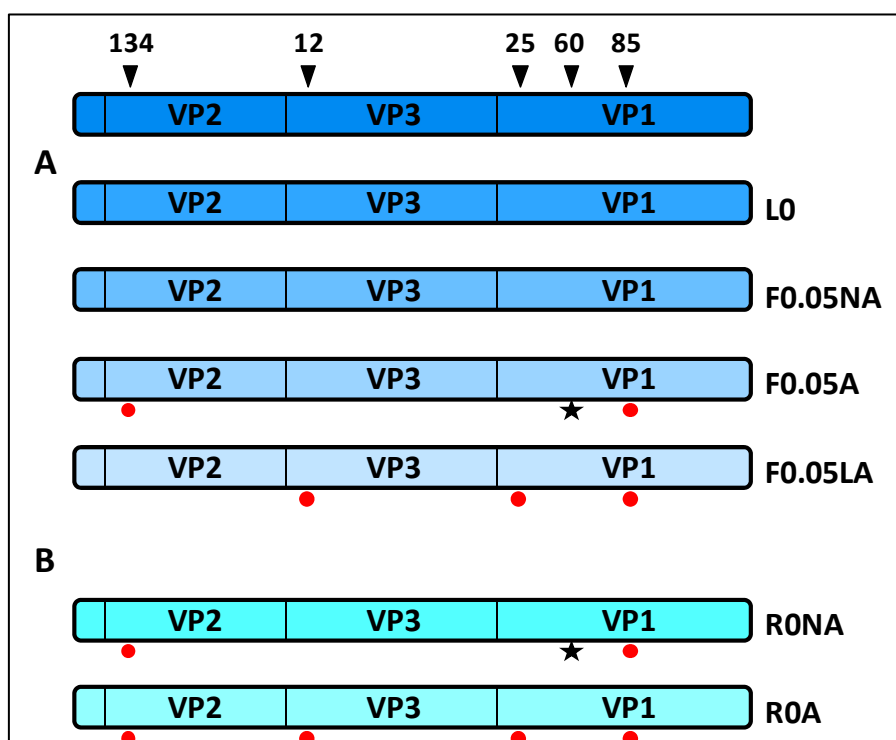
En primer lloc, es va analitzar l'estructura antigènica del virus en les poblacions que replicaven en presència de 0.05 µg/ml d'AMD, incloent la població no adaptada (F0.05NA), l'adaptada (F0.05A) i la llargament adaptada (F0.05LA), així com les poblacions que es retornaven a les condicions d'absència d'AMD abans (R0NA) i després de l'adaptació (R0A) a aquestes condicions, mitjançant el reconeixement amb els MAb K34C8 i K24F2, que s'uneixen a l'epítip immunodominant, i el MAb H7C27, que interacciona amb el lloc d'unió a la glicoforina A. Com a control s'utilitzà la població parental (L0) adaptada a replicar en absència d'AMD. Els resultats es mostren com a relació de reconeixement entre K34C8 i K24F2 i entre H7C27 i K24F2 (Fig. 4.3.1.2), ja que d'aquesta manera els resultats no queden esbiaixats per diferències en la quantitat d'antigen, que pot variar en cada població. Per tant, les diferències observades entre les poblacions serien degudes a canvis en el reconeixement amb els MAb i no a canvis en la producció d'antigen. Tal i com es pot observar en les Fig. 4.3.1.2.A i 4.3.1.2.B, l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD anava acompanyada d'un increment estadísticament significatiu ( $p < 0.05$ ) en les relacions K34C8/K24F2 i H7C27/K24F2, deguda principalment a un descens del reconeixement amb el K24F2, la qual cosa suggeria canvis en la conformació de la càpsida.

D'altra banda, moltes de les mutacions implicades en el canvi de l'ús de codons durant l'adaptació a l'AMD induïen també canvis d'aminoàcids (Fig. 4.3.1.3) que podrien molt bé explicar els canvis en el reconeixement pels diferents MAb. Però cal tenir en compte que els passatges no adaptats, que evidentment presentaven mutacions en la quasiespècie però que no produïen canvis significatius en l'ús de codons en comparació amb les poblacions parentals i que no presentaven

mutacions fixades de cap tipus en la seqüència consens (Fig. 4.3.1.3), mostraven alteracions en el reconeixement pels diferents MAb.



**Fig. 4.3.1.2. Reconeixement antigènic de les càpsides víriques de les diferents poblacions. (A) Relació entre el reconeixement de les poblacions amb els MAbs K34C8 (que reconeix específicament la càpsida) i K24F2 (que reconeix pentàmers i càpsida). (B) Relació entre el reconeixement de les poblacions amb els MAbs H7C27 (que reconeix el lloc d'unió a la glicoforina A) i K24F2. Les fletxes indiquen que l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD s'inicia a partir de la població LO i la reversió de 0.05 a 0.0 µg/ml d'AMD a partir de la població F0.05A. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**



**Fig. 4.3.1.3. Representació esquemàtica de les mutacions sinònimes (indicades amb una estella negra) i les mutacions no sinònimes (indicades amb un punt vermell) que es fixaven en les poblacions durant l'adaptació a diferents condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lulars. (A) Mutacions que es fixaven en les poblacions adaptades i no adaptades a replicar en presència de 0.05 µg/ml d'AMD. (B) Mutacions que es fixaven quan la població adaptada a 0.05 µg/ml d'AMD es tornava a replicar en absència d'AMD. En la part superior s'indiquen les posicions que ocupen en cada una de les proteïnes estructurals els residus que presenten canvis en les diferents poblacions.**

Així, les poblacions L0 i F0.05NA eren pràcticament idèntiques a nivell genòmic però la població no adaptada presentava un increment significatiu ( $p < 0.05$ ) de la relació K34C8/K24F2 (Fig. 4.3.1.2.A). De la mateixa manera, les poblacions F0.05A i R0NA eren pràcticament iguals des del punt de vista genòmic però la població R0NA mostrava també un augment significatiu de les dues relacions de reconeixement (Figs. 4.3.1.2.A i 4.3.1.2.B). Aquests resultats indicaven que el canvi en les condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lular afectava el plegament de la càpsida, ja que l'únic que variava entre les poblacions L0 i F0.05NA i entre F0.05A i R0NA era la concentració d'AMD en la que replicaven les poblacions.

En segon lloc, es va analitzar l'estabilitat de les poblacions mencionades anteriorment en condicions extremes de temperatura (61°C durant 5 min), pH (pH 2 durant 1 h) i sals biliars (4% durant 4 h). Els anàlisis es van dur a terme calculant el  $\text{Log}_{10}$  de la reducció entre els títols infecciosos abans i després del

tractament, obtinguts segons el càlcul de la TCID<sub>50</sub>. Segons els resultats que es mostren en la Taula 4.3.1.2, durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD es va observar una pèrdua d'estabilitat estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ) front el pH àcid i les sals biliars respecte la població parental L0, mentre que no es van observar diferències pel que fa a la resistència a altes temperatures. En el cas de la reversió de 0.0 a 0.05 µg/ml d'AMD, la població R0A va mostrar una recuperació parcial de l'estabilitat front les sals biliars respecte la població F0.05A, tot i que esdevingué molt més sensible al pH, mostrant unes caigudes a pH àcid significativament superiors ( $p < 0.05$ ) a les presentades pel passatge F0.05A a partir del qual s'havia iniciat la reversió.

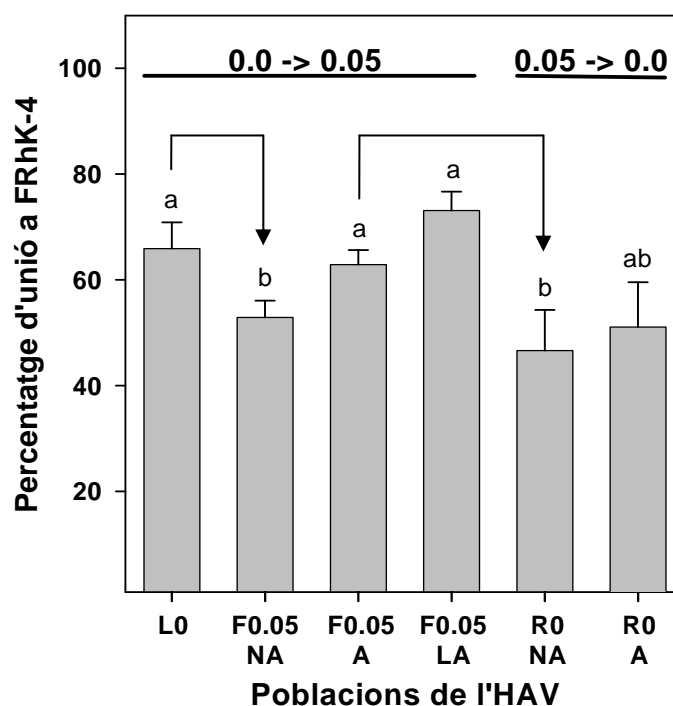
**Taula 4.3.1.2. Estabilitat de les diferents poblacions en condicions d'alta temperatura, pH àcid i sals biliars. Les caigudes del títol víric en les diferents condicions s'expressen com a  $\text{Log}_{10} N_t/N_0$ , on  $N_0$  correspon al títol infecció abans del tractament i  $N_t$  al títol infecció després del tractament. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres  $a=ab$ ;  $ab=b$ ;  $a \neq b$ .**

	61°C 5 min	pH 2 1h	1% sals biliars 4h
<b>L0</b>	-1.30±0.15 <sup>a</sup>	-0.64±0.06 <sup>ac</sup>	0.12±0.11 <sup>a</sup>
<b>F0.05NA</b>	-1.58±0.18 <sup>a</sup>	-0.43±0.13 <sup>ac</sup>	-0.69±0.13 <sup>b</sup>
<b>F0.05A</b>	-1.67±0.23 <sup>a</sup>	-0.90±0.23 <sup>abc</sup>	-1.15±0.07 <sup>c</sup>
<b>F0.05LA</b>	-1.50±0.25 <sup>a</sup>	-1.38±0.12 <sup>b</sup>	-0.69±0.18 <sup>b</sup>
<b>R0NA</b>	-1.57±0.06 <sup>a</sup>	-0.62±0.16 <sup>c</sup>	-0.19±0.11 <sup>a</sup>
<b>R0A</b>	-1.63±0.12 <sup>a</sup>	-3.13±0.17 <sup>d</sup>	-0.81±0.15 <sup>b</sup>

De forma similar al que passava amb el reconeixement antigènic, es detectaven canvis d'estabilitat entre les poblacions L0 i F0.05NA, essent la segona més sensible a les sals biliars, i entre les poblacions F0.05A i R0NA, essent la primera més sensible a les sals biliars. Aquests canvis en l'estabilitat de la càpsida estarien associats a canvis en el plegament de les proteïnes generats en condicions de *shut off* cel·lular induït, ja que aquests parelles de poblacions només difereixen en les condicions d'AMD en les que repliquen i no hi ha ni mutacions que impliquin canvis d'aminoàcids entre elles, ni canvis significatius en l'ús de codons.

En tercer lloc, per tal de valorar si els canvis en la conformació de la càpsida observats en la població no adaptada (F0.05NA), l'adaptada (F0.05A) i la llargament adaptada (F0.05LA) a 0.05 µg/ml d'AMD, així com en les poblacions que es retornaven a les condicions d'absència d'AMD abans (R0NA) i després de

l'adaptació (R0A) a aquestes condicions, podien tenir algun efecte en l'inici del cicle replicatiu, es va analitzar la capacitat d'unió al receptor de les diferents poblacions (Fig. 4.3.1.4). Segons els resultats observats, la població F0.05NA presentava una eficiència d'unió a les cèl·lules FRhK-4 de  $52.9 \pm 8.4\%$ , valor significativament inferior ( $p < 0.05$ ) al del L0, la capacitat d'unió de la qual era de  $65.9 \pm 14.9\%$  (Fig. 4.3.1.4). Tanmateix, les poblacions adaptades a replicar en presència de  $0.05 \mu\text{g/ml}$  d'AMD, F0.05A i F0.05LA, amb uns valors de  $62.9 \pm 11.8\%$  i  $73.1 \pm 10.8\%$  respectivament, havien recuperat la capacitat d'interaccionar amb el receptor cel·lular (Fig. 4.3.1.4). De forma similar, durant la reversió de  $0.05$  a  $0.0 \mu\text{g/ml}$  d'AMD, la població R0NA mostrava una caiguda significativa ( $p < 0.05$ ) de la capacitat d'unió al receptor respecte la població F0.05A a partir de la qual s'iniciava la seva reversió, amb uns valors de  $46.6 \pm 20.4\%$ , i la població R0A, amb uns valors de  $51.1 \pm 20.7\%$  tendia a recuperar parcialment la capacitat d'interaccionar amb el receptor (Fig. 4.3.1.4).



**Fig. 4.3.1.4. Percentatge d'unió a les cèl·lules FRhK-4.** Cada població era inoculada en monocapes confluents de cèl·lules FRhK-4 i a temps 0 min i 120 min es recollien i titulaven alíquotes de  $10 \mu\text{l}$  de l'inòcul segons el mètode de la  $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ . La diferència en el títol de virus infecciosos entre els 0 min i els 120 min corresponia als virus que s'havien unit al receptor. Les fletxes indiquen que l'adaptació a  $0.05 \mu\text{g/ml}$  d'AMD s'inicia a partir de la població L0 i la reversió de  $0.05$  a  $0.0 \mu\text{g/ml}$  d'AMD a partir de la població F0.05A. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.

De nou, les diferències entre les poblacions F0.05NA i L0 i entre R0NA i F0.05A indicaven que les condicions de *shut off* cel·lular induït provocaven alteracions del



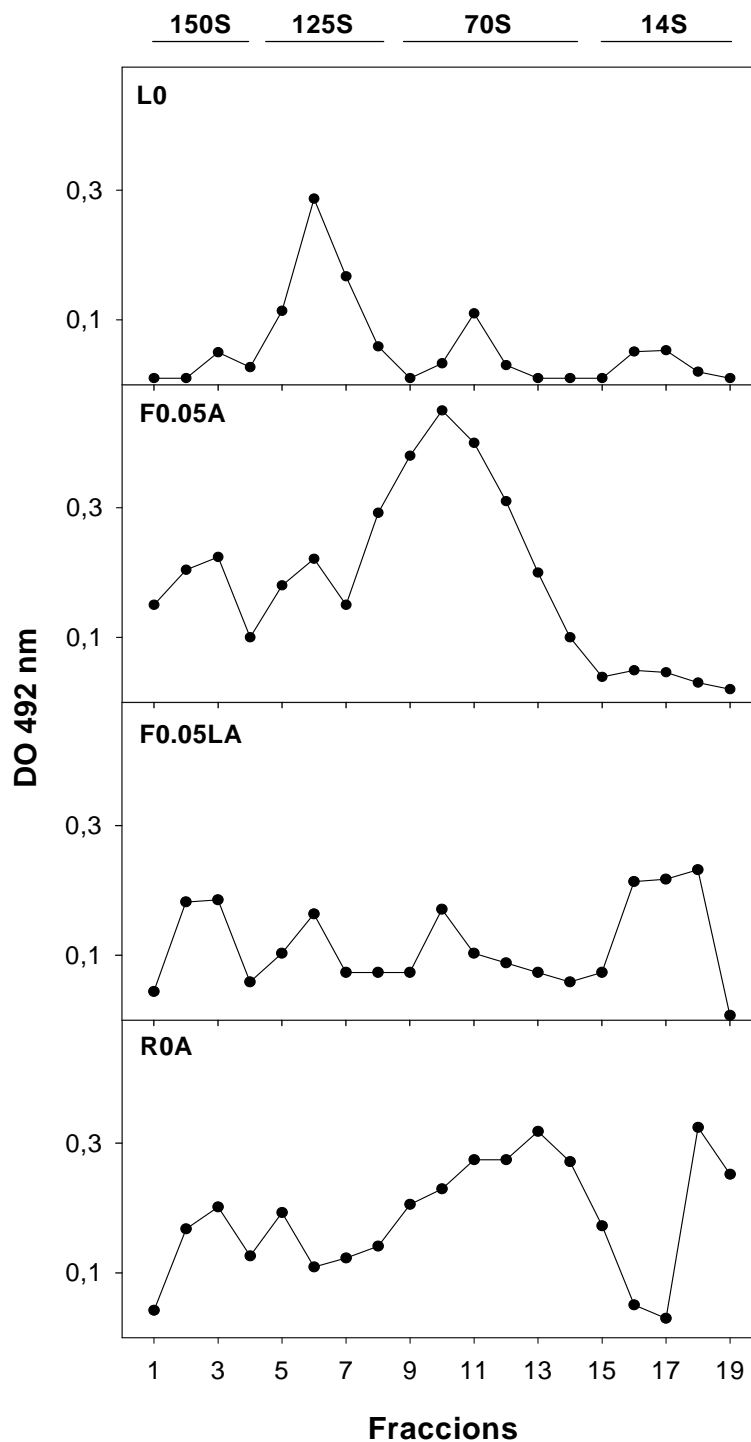
plegament de la càpsida que afectaven a la seva interacció amb el receptor. Les poblacions no adaptades a replicar en 0.05 µg/ml d'AMD (F0.05NA) i en 0.0 µg/ml d'AMD (R0NA) presentaven una capacitat d'interaccionar amb el receptor cel·lular inferior a la que presentaven les poblacions de les que procedien (L0 i F0.05, respectivament). Per contra les poblacions adaptades a replicar en 0.05 µg/ml d'AMD (F0.05A i F0.05LA) i en 0.0 µg/ml d'AMD (R0A) recobraven la capacitat d'unió al receptor fins a percentatges similars als de la població parental L0. La caiguda i la recuperació de la unió al receptor podrien ser, doncs, les responsables de la pèrdua i la recuperació del *fitness* del virus durant l'adaptació als canvis de les condicions de *shut off* artificial (Taula 4.3.1.1).

Una altra característica de les poblacions que es va estudiar va ser la seva eficiència de desencapsidació, ja que els canvis en el plegament de les proteïnes de la càpsida podrien interferir en aquest procés. Amb aquesta finalitat es van dur a terme una sèrie d'experiments per tal de calcular el temps que necessitava cada població per assolir una desencapsidació del 50% (UT<sub>50</sub>). Tal i com es pot observar en els resultats mostrats en la Taula 4.3.1.3, no es van detectar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre L0 i les poblacions F0.05NA, F0.05A i F0.05LA, així com tampoc es van trobar canvis significatius ( $p < 0.05$ ) entre F0.05A i les poblacions R0NA i R0A. En totes aquestes poblacions el valor de la UT<sub>50</sub> oscil·lava entre 16.0 i 18.5 h aproximadament. Per tant, els canvis en el plegament de la càpsida que tenien lloc en les poblacions durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD i durant la reversió de 0.05 a 0.0 µg/ml d'AMD no alteraven l'eficiència de desencapsidació. Així doncs, la caiguda i la recuperació del *fitness* del virus durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD i durant la re-adaptació a 0.0 µg/ml d'AMD (Taula 4.3.1.1), no s'explicava per canvis en l'eficiència de desencapsidació.

**Taula 4.3.1.3. Temps necessari per assolir la desencapsidació del 50 % dels virus (UT<sub>50</sub>) en les diferents poblacions. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

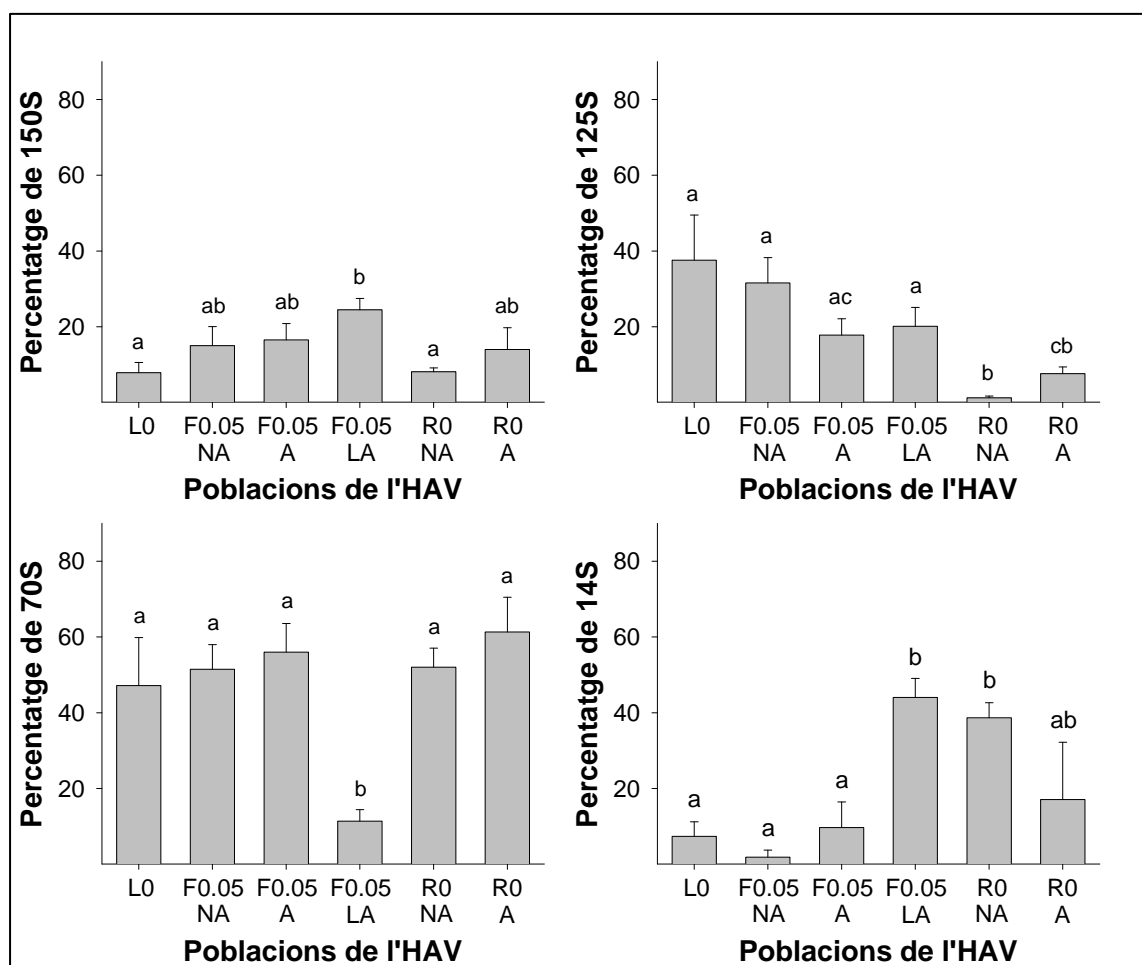
	UT <sub>50</sub> (hores)
<b>L0</b>	18.53±0.55 <sup>a</sup>
<b>F0.05NA</b>	17.76±1.13 <sup>a</sup>
<b>F0.05A</b>	16.91±2.18 <sup>a</sup>
<b>F0.05LA</b>	17.51±1.76 <sup>a</sup>
<b>R0NA</b>	18.52±2.58 <sup>a</sup>
<b>R0A</b>	15.95±3.39 <sup>a</sup>

Finalment, es va determinar la proporció relativa de les fraccions 150S, amb els virions madurs, 125S, amb els virions immadurs o provirions, 70S, amb les càpsides buides i 14S, amb els pentàmers, en les diferents poblacions sota estudi.



**Fig. 4.3.1.5. Pics antigènics obtinguts després de separar les fraccions 150S, 125S, 70S i 14S, mitjançant gradients de sacarosa. En la figura es mostren els gradients obtinguts amb les poblacions L0, F0.05A, F0.05LA i R0A. La suma de les antigenicitats dels pics de les diferents fraccions s'utilitzava per calcular el percentatge de cada una d'elles.**

Per obtenir aquesta informació, les suspensions víriques concentrades obtingudes després d'infectar monocapes de FRhK-4 amb les diferents poblacions es van centrifugar en gradients de sacarosa, els quals van ser posteriorment fraccionats. L'antigenicitat de cada fracció va ser analitzada mitjançant ELISA, i els resultats van revelar la existència de quatre pics majoritaris, corresponents a les fraccions dels virions madurs o 150S, provirions o 125S, càpsides buides o 70S i pentàmers o 14S. Tal i com es pot observar en la Fig. 4.3.1.5, per un mateix títol infecció, tan les poblacions adaptades a 0.05 µg/ml d'AMD, F0.05A i F0.05LA, com la població re-adaptada a 0.0 µg/ml d'AMD, R0A, produïen més 150S que la població L0 (Fig. 4.3.1.5). A més, les poblacions F0.05 i R0A produïen més 70S que la població L0, i les poblacions F0.05LA i R0A produïen més 14S. En canvi, no s'observaven diferències quant a la 125S (Fig. 4.3.1.5). A més, les variacions en el reconeixement per part dels MAb's K24F2 i K34C8, que presentaven les poblacions durant l'adaptació a les diferents condicions de *shut off* artificial, en cap cas eren suficients per explicar les diferències en la producció de les diferents fraccions.



**Fig. 4.3.1.6. Percentatge de les fracció 150S, 125S, 70S i 14S . Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

Amb els valors d'antigenicitat dels pics es va calcular el percentatge de les fraccions 150S, 125S, 70S i 14S (Fig. 4.3.1.6). El percentatge de la fracció 150S tendia a augmentar durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD, mentre que la fracció 125S mostrava una certa tendència a disminuir. De fet, la fracció 150S en la població llargament adaptada F0.05LA representava un 24.5%±3.0% de l'antigenicitat total associada a les diferents fraccions, percentatge significativament superior ( $p < 0.05$ ) al de 7.9%±5.4% de la població L0. Pel que fa a la fracció 125S, no es van observar diferències significatives entre les poblacions adaptades a replicar en 0.05 µg/ml d'AMD i la població parental L0. Respecte les fraccions 70S i 14S, la població llargament adaptada F0.05LA presentava un descens en el percentatge de 70S si es comparava amb el de les poblacions L0, F0.05NA i F0.05A, descens que coincidia amb un increment del percentatge de 14S. Quan el mateix anàlisi va ser efectuat en les poblacions que es tornaven a cultivar en les condicions originals de 0.0 µg/ml d'AMD, es va observar que les poblacions R0NA i R0A produïen menys 125S que la població L0. i, en canvi, produïen més 14S, encara que en el cas de la població re-adaptada a l'absència d'AMD R0A, les diferències pel que fa a la 14S no eren estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

D'altra banda, si ens fixàvem només en les fraccions que contenen les partícules víriques potencialment infeccioses, 150S i 125S, i analitzàvem la relació de la variació de la 150S i la 125S en les diferents poblacions respecte la població parental L0, podíem observar com aquesta relació incrementava significativament ( $p < 0.05$ ) durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD, i continuava augmentant durant la reversió de 0.05 a 0.0 µg/ml d'AMD (Taula 4.3.1.4). En les poblacions F0.05NA, F0.05A i F0.05LA, aquest fet era degut tan a l'augment de la 150S com a la disminució de la 125S en respecte la població L0, mentre que en la població re-adaptada a l'absència d'AMD, R0A, era degut principalment a la caiguda de la fracció 125S; en canvi, en el cas de la població no re-adaptada, R0NA, l'augment de la relació era degut exclusivament a la disminució de la 125S. La reducció de la fracció 125S en les poblacions R0NA i R0A donava lloc a una reducció de la relació entre les partícules víriques i les càpsides buides ( $150S+125S/70S$ ) en respecte la població L0, indicant que aquestes poblacions podrien ser menys eficients encapsidant l'RNA. Aquestes mateixes poblacions, R0NA i R0A, així com la població F0.05LA, presentaven una caiguda de la relació entre les càpsides i els pentàmers ( $150S+125S+70S/14S$ ) respecte la població L0, la qual podria indicar una menor eficiència d'ensamblatge de les proteïnes en aquestes poblacions; al contrari, l'augment de la relació  $150S+125S+70S/14S$  en la població F0.05NA, indicaria que és més eficient ensamblant les proteïnes durant la morfogènesi de la càpsida.

Així doncs, els canvis en la conformació de la càpsida que experimentaven les poblacions de l'HAV en les condicions de *shut off* artificial, deguts als canvis en l'ús de codons per una cinètica de traducció adequada, tenien també un cert efecte en la proporció de partícules víriques infeccioses, càpsides buides i pentàmers.

**Taula 4.3.1.4. Relació de la variació de les fraccions 150S i 125S en les diferents poblacions respecte la població parental L0. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

	<b>150S/125S</b>	<b>150S+125S/70S</b>	<b>150S+125S+70S/14S</b>
<b>L0</b>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>
<b>F0.05NA</b>	4.07±2.07 <sup>ab</sup>	1.16±0.60 <sup>a</sup>	7.57±2.11 <sup>b</sup>
<b>F0.05A</b>	7.44±3.19 <sup>b</sup>	0.96±0.61 <sup>a</sup>	1.84±1.65 <sup>ab</sup>
<b>F0.05LA</b>	7.63±3.23 <sup>b</sup>	3.79±1.79 <sup>a</sup>	0.10±0.05 <sup>c</sup>
<b>R0NA</b>	43.86±18.53 <sup>c</sup>	0.17±0.08 <sup>b</sup>	0.13±0.06 <sup>c</sup>
<b>R0A</b>	14.00±6.55 <sup>bc</sup>	0.35±0.21 <sup>b</sup>	0.25±0.17 <sup>c</sup>

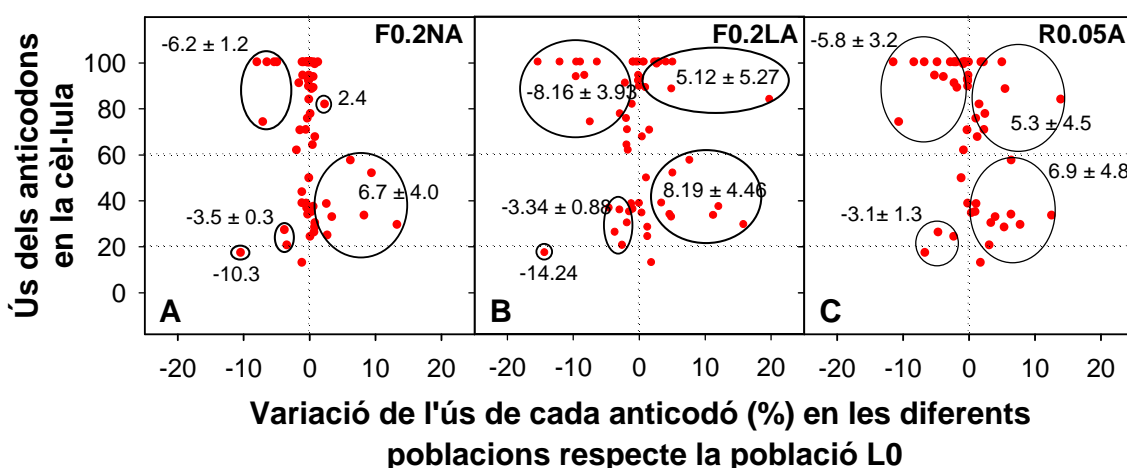
#### **4.3.2. LA CAIGUDA DE *FITNESS* QUE PRESENTA L'HAV AL REPLICAR EN CONDICIONS D'ALT SILENCIAMENT DE LA SÍNTESI DE PROTEÏNES CEL·LULARS NO ES DEGUDA A UNA INEFICIENT INICIACIÓ DEL CICLE REPLICATIU, ENCARA QUE LA RECUPERACIÓ DE *FITNESS* VE DONADA PER CANVIS EN EL PLEGAMENT DE LA CÀPSIDA QUE DETERMINEN UNA MAJOR EFICIÈNCIA DE DESENCAPSICACIÓ.**

Al mateix temps que l'HAV s'adaptava a replicar a 0.05 µg/ml d'AMD, també s'intentà la seva adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD, condicions que induïen una inhibició de la síntesi de proteïnes del 90% en cèl·lules FRhK-4<sup>4</sup>. Tanmateix, no s'aconseguí l'adaptació directa del virus a 0.2 µg/ml d'AMD, doncs la població disminuï fins desaparèixer<sup>4</sup>. Tot i això, a partir de la població adaptada a 0.05 µg/ml d'AMD (F0.05A), sí s'aconseguí l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD<sup>4</sup>. En aquestes condicions també es va observar una caiguda del *fitness*, que implicava un descens de la producció de virus en les poblacions no adaptades, seguida per la recuperació del *fitness* (Taula 4.3.2.1). A més, quan la població adaptada a 0.2 µg/ml d'AMD es tornava a replicar en condicions d'inhibició més suaus de la síntesi proteica, en presència de 0.05 µg/ml d'AMD, també s'observava una davallada de la producció de virus seguida d'una recuperació (Taula 4.3.2.1).

**Taula 4.3.2.1. Evolució de la producció vírica, calculada com el  $\text{Log}_{10}$  ( $\text{TCID}_{50}/\text{cèl}\cdot\text{lula}$ ), durant l'adaptació a les  $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD així com durant el retorn a  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

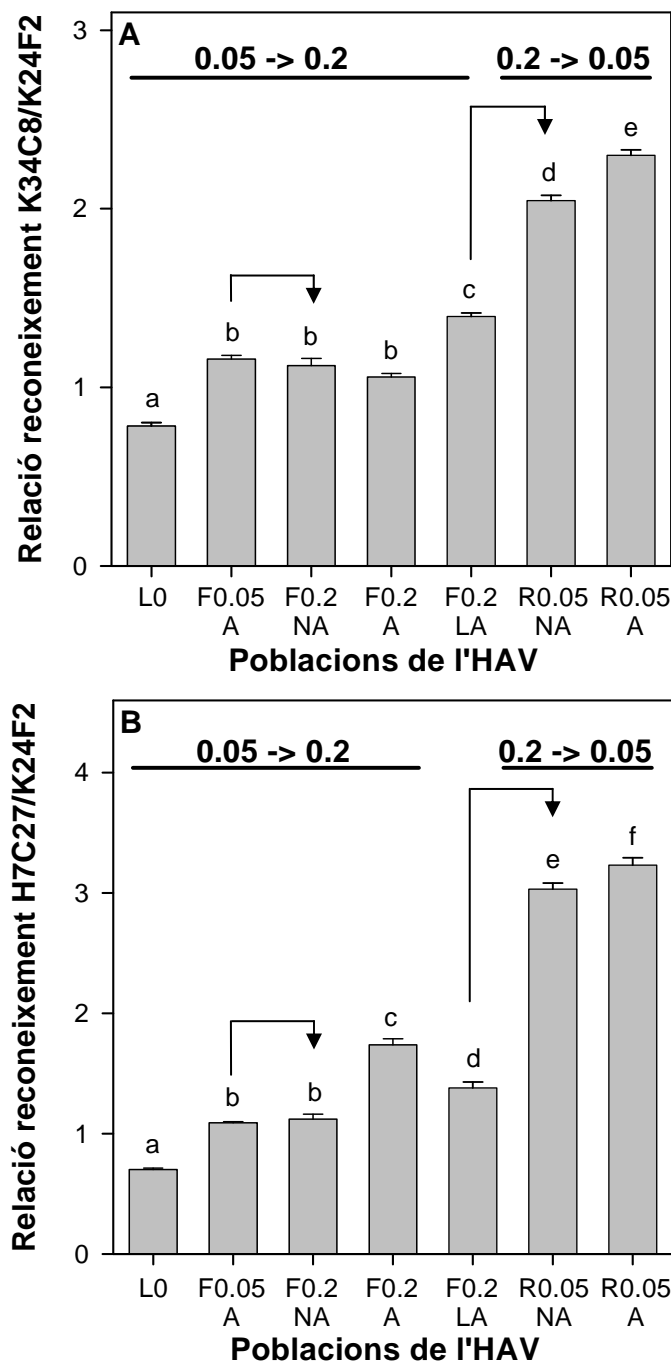
<b><math>\text{Log}_{10}</math> (<math>\text{TCID}_{50}/\text{cèl}\cdot\text{lula}</math>)</b>	
<b>LO</b>	$1.43 \pm 0.04^a$
<b>F0.05A</b>	$1.54 \pm 0.08^a$
<b>F0.2NA</b>	$1.07 \pm 0.13^{bc}$
<b>F0.2A</b>	$1.70 \pm 0.12^a$
<b>F0.2LA</b>	$1.39 \pm 0.14^{ab}$
<b>R0.05NA</b>	$0.85 \pm 0.25^c$
<b>R0.05A</b>	$1.60 \pm 0.18^a$

La recuperació del *fitness* en l'adaptació a  $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD s'associava a una re-optimització de l'ús de codons en la regió de la càpsida<sup>4</sup>. Com a conseqüència d'aquesta re-optimització, el virus incrementava l'ús del grup d'anticodons que la cèl·lula utilitzava entre el 20% i el 60% i disminuïa l'ús del grup d'anticodons que la cèl·lula usava per sobre el 60%<sup>4</sup> (Fig. 4.3.2.1). En canvi, quant la població adaptada a  $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD es tornava a replicar en  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD, la re-adaptació anava associada a una certa reversió dels canvis en l'ús de codons. Així, en la població re-adaptada a  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD (R0.05A) augmentava l'ús del grup d'anticodons usats per sobre el 60% i disminuïa l'ús del grup d'anticodons usats entre el 20% i el 60% (Fig. 4.3.2.1).



**Fig. 4.3.2.1. Variació de l'ús d'anticodons en la regió codificant per la càpsida durant el procés d'adaptació a  $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD i re-adaptació a  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD. Es mostra el percentatge de variació de l'ús de cada anticodó entre les poblacions F0.2NA, F0.2A o R0.05A i la població L0, respecte l'ús de codons cel·lular. (A) Població no adaptada a  $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD, F0.2NA. (B) Població adaptada a  $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD, F0.2A. (C) Població re-adaptada a  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'AMD R0.05A.**

Per tal de confirmar que els canvis en l'ús de codons que es donen durant l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD i la reversió a 0.05 µg/ml d'AMD poden afectar el plegament de les proteïnes estructurals i donar lloc a canvis en la conformació de la càpsida es van estudiar diverses característiques.



**Fig. 4.3.2.2. Reconeixement antigènic de les càpsides víriques de les diferents poblacions. (A)** Relació entre el reconeixement de les poblacions amb els MAbs K34C8 (que reconeix específicament la càpsida) i K24F2 (que reconeix pentàmers i càpsida). **(B)** Relació entre el reconeixement de les poblacions amb els MAbs H7C27 (que reconeix el lloc d'unió a la glicoforina A) i K24F2. Les fletxes indiquen que l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD s'originava a partir de la població F0.05A i la reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD a partir de la població F0.2LA. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.

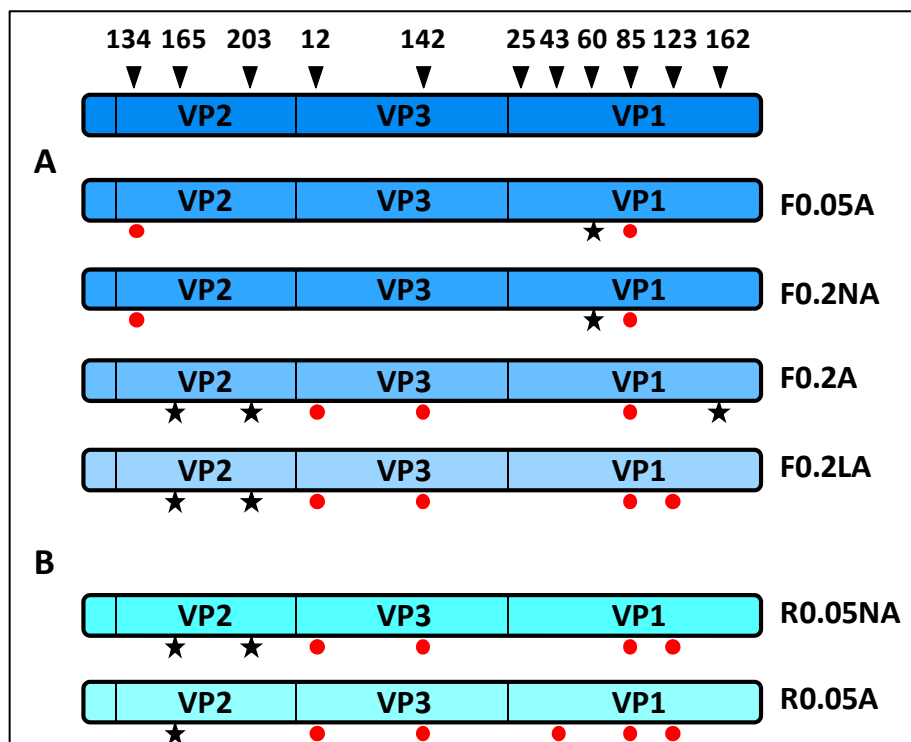
---

Primerament, es va analitzar l'estructura antigènica del virus en les poblacions que replicaven en 0.2 µg/ml d'AMD, incloent la població no adaptada (F0.2NA), l'adaptada (F0.2A) i la llargament adaptada (F0.2LA), així com les poblacions que es retornaven a 0.05 µg/ml d'AMD abans (R0.05NA) i després de l'adaptació (R0.05A) a aquestes condicions. L'estructura antigènica es valorava mitjançant el reconeixement amb els MAbs K34C8, K24F2 i H7C27. Com a control s'utilitzava la població L0.

El procés d'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD anava acompanyat per variacions de les relacions entre el reconeixement pels MAbs K34C8 i K24F2 (Fig. 4.3.2.2.A) i pels MAbs H7C27 i K24F2 (Fig. 4.3.2.2.B), degudes sobretot a la disminució del reconeixement per part del MAb K24F2, les quals indicaven la existència de canvis en la conformació de la càpsida. Així, les poblacions F0.2NA, F0.2A i F0.2LA presentaven un increment estadísticament significatiu ( $P < 0.05$ ) de la relació K34C8/K24F2 respecte la població L0, i aquesta relació continuava augmentant de forma significativa en durant la reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD (Fig. 4.3.2.2.A). De forma similar, la relació H7C27/K24F2 també augmentava significativament ( $p < 0.05$ ) durant l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD. En aquest cas, les poblacions F0.2NA, F0.2A i F0.2LA presentaven un augment significatiu de la relació H7C27/K24F2 respecte la població L0. No obstant, si es comparava la relació H7C27/K24F2 en les poblacions F0.2A i F0.2LA, s'observava que aquesta era significativament inferior en el cas de la segona població. Tanmateix, s'observava també un increment significatiu de la relació H7C27/K24F2 durant la re-adaptació de la població F0.2LA a 0.05 µg/ml d'AMD, de manera que tan la població R0.05NA com la R0.05A mostraven una relació H7C27/K24F2 significativament superior a la de la població L0.

Novament, les poblacions adaptades a replicar en presència de 0.2 µg/ml d'AMD presentaven alguns canvis d'aminoàcids com a conseqüència de les mutacions implicades en el canvi en l'ús de codons (Fig. 4.3.2.3). Aquests canvis d'aminoàcids podrien explicar el canvi de l'estructura antigènica de les poblacions F0.2A i F0.2LA. No obstant, la població no adaptada a la reversió a 0.05 µg/ml d'AMD (R0.05NA), sense canvis significatius en l'ús de codons respecte la població F0.2LA a partir de la que s'havia originat i sense mutacions fixades que impliquessin canvis d'aminoàcids (Fig. 4.3.2.3), ja presentava alteracions en el reconeixement pels diferents MAbs. Aquests resultats suggereixen que l'estructura de la càpsida podria variar com a conseqüència de l'adaptació del virus a les condicions de silenciament de la síntesi proteica.





**Fig. 4.3.2.3.** Representació esquemàtica de les mutacions sinònimes (indicades amb una estrella negra) i les mutacions no sinònimes (indicades amb un punt vermell) que es fixaven en les poblacions durant l'adaptació a diferents condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lulars. (A) Mutacions que es fixaven en les poblacions adaptades i no adaptades a replicar en presència de 0.2 µg/ml d'AMD. (B) Mutacions que es fixaven quan la població adaptada a 0.2 µg/ml d'AMD es tornava a replicar en 0.05 µg/ml d'AMD. En la part superior s'indiquen les posicions que ocupen en cada una de les proteïnes estructurals els residus que presenten canvis en les diferents poblacions.

Per tal d'obtenir més evidències dels canvis en el plegament de les proteïnes de la càpsida, es va analitzar l'estabilitat de les poblacions F0.2NA, F0.2A, F0.2LA, R0.05NA i R0.05A en condicions extremes de temperatura (61°C durant 5 min), pH (pH 2 durant 1 h) i sals biliars (4% durant 4 h). Els anàlisis es van dur a terme calculant el  $\text{Log}_{10}$  de la reducció entre els títols infecciosos abans i després dels tractaments, obtinguts segons el càlcul de la  $\text{TCID}_{50}$  (Taula 4.3.2.2). Les poblacions adaptades a créixer en presència de 0.2 µg/ml d'AMD són les que van presentar una estabilitat inferior en totes les condicions estudiades. En particular, la població F0.2A és la que va mostrar menys resistència a l'alta temperatura, el pH àcid i les sals biliars, patint unes caigudes en aquestes condicions de  $-2.80 \pm 0.14 \text{ Log}_{10}$ ,  $-3.81 \pm 0.07 \text{ Log}_{10}$  i  $-2.39 \pm 0.11 \text{ Log}_{10}$ , respectivament. Aquesta pèrdua de resistència era menor en la població llargament adaptada F0.2LA, la qual presentava unes caigudes de  $-2.60 \pm 0.14 \text{ Log}_{10}$  als 5 min a 61°C,  $-2.93 \pm 0.22 \text{ Log}_{10}$  a les 2 h a pH2 i de  $-1.06 \pm 0.26 \text{ Log}_{10}$  a les 4 h amb 1 % de sals biliars. En el cas de les reversió a 0.05 µg/ml d'AMD, es va observar una recuperació parcial de

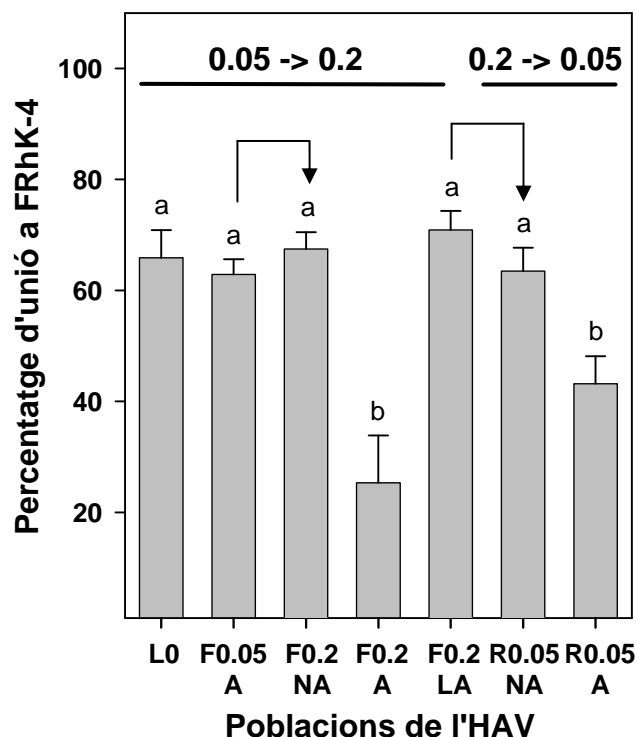
l'estabilitat front l'alta temperatura i les sals biliars, tot i que després de la re-adaptació la població R0.05A van mostrar una caigudes a pH àcid de  $-3.49 \pm 0.20$   $\text{Log}_{10}$ , caiguda significativament superior ( $p < 0.05$ ) a les presentades per la població L0 i la població F0.2LA a partir de la qual s'havia iniciat la reversió. Aquests canvis en l'estabilitat de la càpsida estarien associats als canvis en el plegament de les proteïnes que es donen durant el procés d'adaptació a les condicions de *shut off* cel·lular induït.

**Taula 4.3.2.2. Estabilitat de la càpsida de les diferents poblacions en condicions d'alta temperatura, pH àcid i sals biliars. Les caigudes del títol víric en les diferents condicions s'expressen com a  $\text{Log}_{10} N_t/N_0$ , on  $N_0$  correspon al títol infecció abans del tractament i  $N_t$  al títol infecció després del tractament. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

	61°C 5 min	pH 2 1h	1% sals biliars 4h
<b>L0</b>	$-1.30 \pm 0.15^a$	$-0.64 \pm 0.06^a$	$0.12 \pm 0.11^a$
<b>F0.05A</b>	$-1.67 \pm 0.23^a$	$-0.90 \pm 0.23^{ab}$	$-1.15 \pm 0.07^b$
<b>F0.2NA</b>	$-1.75 \pm 0.17^a$	$-1.00 \pm 0.12^b$	$0.31 \pm 0.04^a$
<b>F0.2A</b>	$-2.80 \pm 0.10^b$	$-3.81 \pm 0.04^c$	$-2.39 \pm 0.04^c$
<b>F0.2LA</b>	$-2.60 \pm 0.10^b$	$-2.93 \pm 0.11^d$	$-1.06 \pm 0.13^b$
<b>R0.05NA</b>	$-1.25 \pm 0.25^a$	$-0.31 \pm 0.04^e$	$-0.75 \pm 0.21^{bd}$
<b>R0.05A</b>	$-1.81 \pm 0.57^{ab}$	$-3.49 \pm 0.10^c$	$-0.44 \pm 0.04^d$

La capacitat d'unió al receptor de les poblacions anteriors va ser també analitzada amb l'objectiu de valorar si els canvis en la conformació de la càpsida que presentaven tenien algun efecte en l'inici del cicle replicatiu. Tal i com es pot observar en la Figura 4.3.2.4, la població que va mostrar una menor capacitat d'unió al receptor durant l'adaptació a 0.2  $\mu\text{g/ml}$  d'AMD no va ser la F0.2NA sinó la F0.2A, amb un valor de  $25.3 \pm 19.1\%$ , el qual era significativament inferior ( $p < 0.05$ ) al de la població L0 i també al de les poblacions F0.2NA i F0.2LA (Fig. 4.3.2.4). Durant la reversió de 0.2 a 0.05  $\mu\text{g/ml}$  d'AMD tampoc s'observà una disminució de la capacitat d'interacció amb el receptor en la població no adaptada R0.05NA. En aquest cas però, la població re-adaptada R0.05A presentava una eficiència d'unió del  $43.2 \pm 13.1\%$ , la qual era significativament inferior a la del  $65.9 \pm 14.9\%$  de la població L0 i a la del  $70.9 \pm 14.6\%$  de la població F0.2LA a partir de la qual s'originava la reversió (Fig. 4.3.2.4). Per tant, la caiguda i la recuperació de la producció vírica durant el procés d'adaptació a 0.2  $\mu\text{g/ml}$  d'AMD (Taula 4.3.2.1) no

era deguda a la pèrdua i recuperació de la capacitat d'unió al receptor. Per altra banda, la caiguda i la recuperació de la producció vírica durant la re-adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD tampoc podien explicar-se per una pèrdua i recuperació de l'eficiència d'unió al receptor.



**Fig. 4.3.2.4. Percentatge d'unió a FRhK-4.** Cada població era inoculada en monocapes confluents de cèl·lules FRhK-4 i a temps 0 min i 120 min es recollien i titulaven alíquotes de 10 µl de l'inòcul segons el mètode de la TCID<sub>50</sub>/ml. La diferència en el títol de virus infecciosos entre els 0 min i els 120 min corresponia als virus que s'havien unit al receptor. Les fletxes indiquen que l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD s'originava a partir de la població F0.05A i la reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD a partir de la població F0.2LA. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.

Tanmateix, quan es va analitzar l'eficiència de desencapsidació d'aquestes poblacions, es va observar que l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD estava relacionada amb una disminució del temps de desencapsidació, ja que, sorprenentment, la població F0.2A només necessitava  $3.21 \pm 1.79$  h per a que desencapsidessin el 50% dels virus (Taula 4.3.2.3). Aquesta alta eficiència de desencapsidació podia molt bé compensar la baixa taxa d'unió al receptor que presentava aquesta població. No obstant, aquesta UT<sub>50</sub> no es mantenia tan baixa en passatges posteriors a 0.2 µg/ml d'AMD sinó que tendia a augmentar, de manera que la població F0.2LA presentava una UT<sub>50</sub> de  $8.18 \pm 4.84$  h (Taula 4.3.2.3). Malgrat aquest augment, la

UT<sub>50</sub> de la població F0.2LA seguia sent significativament inferior ( $p < 0.05$ ) a la de la població L0.

**Taula 4.3.2.3. Temps necessari per assolir la desencapsidació del 50 % dels virus (UT<sub>50</sub>) en les diferents poblacions. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

	UT <sub>50</sub> (hores)
<b>L0</b>	18.53±0.55 <sup>a</sup>
<b>F0.05A</b>	16.91±2.18 <sup>ab</sup>
<b>F0.2NA</b>	15.10±0.58 <sup>b</sup>
<b>F0.2A</b>	3.21±0.90 <sup>c</sup>
<b>F0.2LA</b>	8.18±2.79 <sup>cd</sup>
<b>R0.05NA</b>	12.10±1.09 <sup>db</sup>
<b>R0.05A</b>	14.11±1.29 <sup>db</sup>

D'altra banda, durant la reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD, la UT<sub>50</sub> continuava augmentant fins els valors de 14.11±2.23 h que presentava la població R0.05A (Taula 4.3.2.3). Per tant, la re-adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD no podia explicar-se ni per un augment de l'eficiència de desencapsidació ni, com s'ha vist, per la recuperació de la capacitat d'interacció amb el receptor.

Per acabar, es van analitzar les fraccions 150S, 125S, 70S i 14S en les poblacions adaptades i no adaptades a replicar en 0.2 µg/ml d'AMD i en les adaptades i no adaptades a la reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD. Tal i com s'ha comentat anteriorment, les diferents fraccions se separaven centrifugant les suspensions víriques concentrades de les diferents poblacions en gradients de sacarosa. En la Fig. 4.3.2.5 es pot observar com, per un mateix títol infecció, les poblacions adaptades a 0.2 µg/ml d'AMD, F0.2A i F0.2LA, presentaven una producció de 150S i 70S superior a la de la població L0, mentre que la producció de 125S i 14S era menor. D'altra banda, la població re-adaptada a 0.05 µg/ml d'AMD, R0.05A, produïa més 150S i 70S i menys 14S que la població L0, però no es van observar diferències entre les poblacions L0 i R0.05A pel que fa a la producció de 125S (Fig. 4.3.2.5).

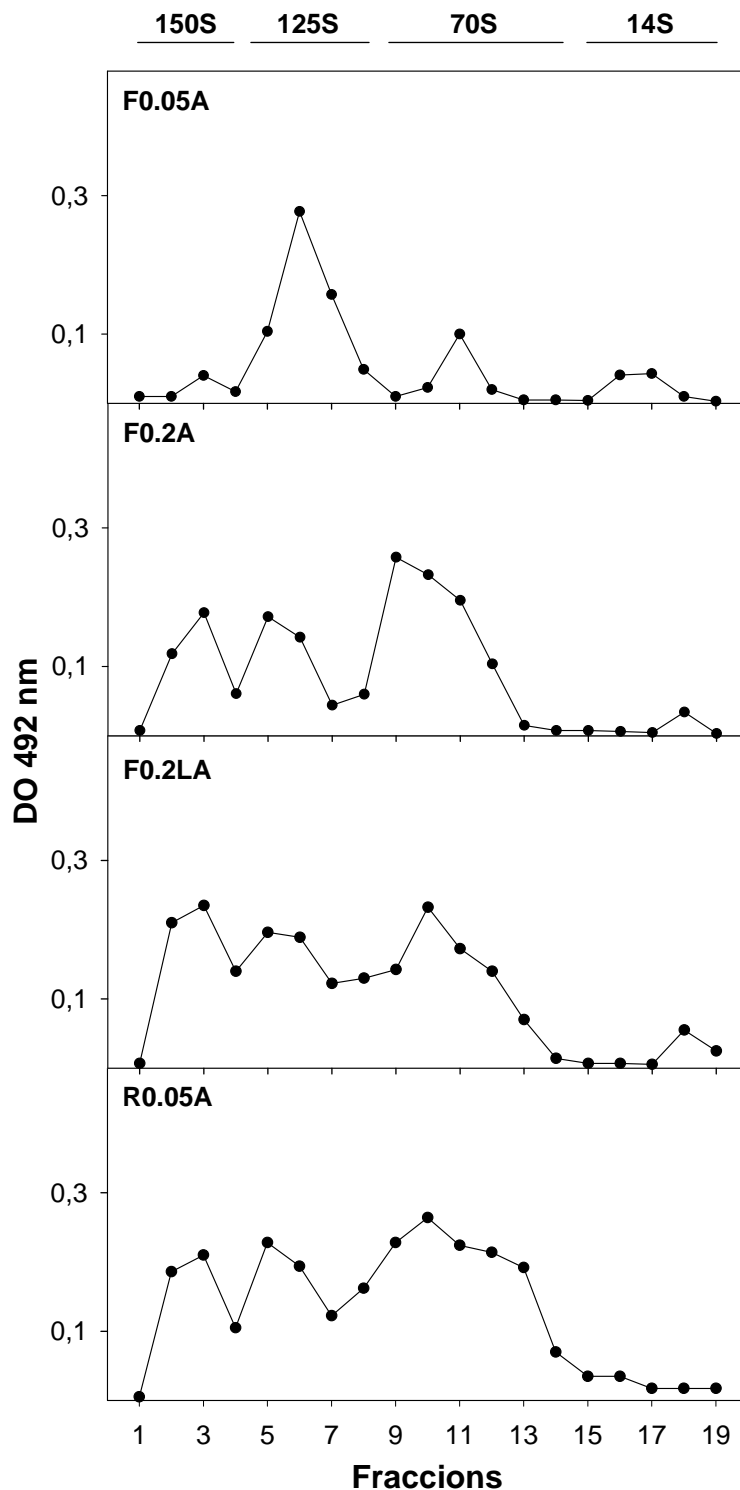
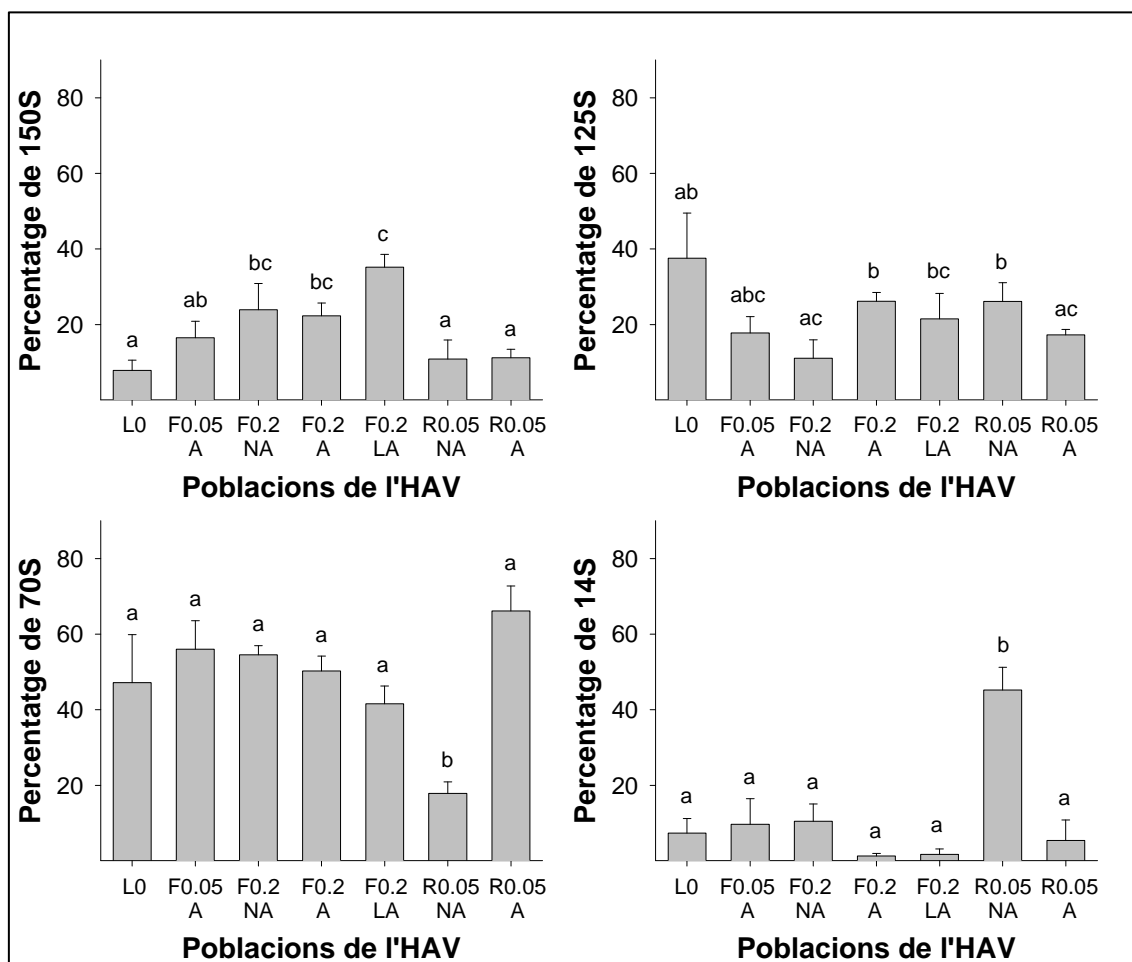


Fig. 4.3.1.5. Pics antigènics obtinguts després de separar les fraccions 150S, 125S, 70S i 14S, mitjançant gradients de sacarosa. En la figura es mostren els gradients obtinguts amb les poblacions F0.05A, F0.2A, F0.2LA i R0.05A. La suma de les antigenicitats dels pics de les diferents fraccions s'utilitzava per calcular el percentatge cada una d'elles.

La suma de les antigenicitats associades a cada fracció, obtingudes mitjançant ELISA, s'emprava per calcular la proporció 150S, 125S, 70S i 14S (Fig. 4.3.2.6).

Els resultats obtinguts van mostrar una proporció de 150S significativament superior ( $p < 0.05$ ) en les poblacions durant el procés d'adaptació a  $0.2 \mu\text{g/ml}$  d'AMD. Destacar també la població R0.05NA per la seva major producció de partícules 14S, que sumat a la menor proporció de 70S podia indicar la existència d'alteracions en l'ensamblatge durant la morfogènesi de la càpsida.



**Fig. 4.3.2.6. Percentatge de les fracció 150S, 125S, 70S i 14S . Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

Tal i com s'havia fet per l'adaptació a  $0.05 \mu\text{g/ml}$  d'AMD i la reversió de  $0.05$  a  $0.0 \mu\text{g/ml}$  d'AMD, es va analitzar la relació de la variació de la 150S i la 125S en les diferents poblacions respecte la població L0 (Taula 4.3.2.4). En aquest cas podíem observar que la relació entre les dues partícules víriques amb capacitat infectiva ( $150\text{S}/125\text{S}$ ) tendia a augmentar durant l'adaptació a  $0.2 \mu\text{g/ml}$  d'AMD, ja que l'increment de la producció de 150S era superior a l'increment de la 125S, en respecte la producció de 125S i 150S de la població L0, indicant que en aquestes poblacions la maduració dels provirions podria ser més eficient que en la població L0. A més, l'increment de la relació entre les partícules víriques potencialment

infeccioses i les càpsides buides (150S+125S/70S) en les poblacions adaptades a 0.2 µg/ml d'AMD, F0.2A i F0.2LA, suggeriria que ambdues presenten una eficiència d'encapsidació superior a la de la població L0.

**Taula 4.3.2.4. Relació de la variació de les fraccions 150S i 125S en les diferents poblacions respecte la població parental F0.05A. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

	<b>150S/125S</b>	<b>150S+125S/70S</b>	<b>150S+125S+70S/14S</b>
<b>L0</b>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>
<b>F0.05A</b>	7.44±3.19 <sup>b</sup>	0.96±0.61 <sup>a</sup>	1.84±1.65 <sup>a</sup>
<b>F0.2NA</b>	6.45±4.71 <sup>ab</sup>	1.89±0.44 <sup>ab</sup>	1.07±0.74 <sup>a</sup>
<b>F0.2A</b>	6.30±2.68 <sup>ab</sup>	3.05±0.87 <sup>bc</sup>	1.47±0.64 <sup>a</sup>
<b>F0.2LA</b>	8.75±1.24 <sup>b</sup>	4.26±1.26 <sup>bc</sup>	1.04±0.50 <sup>a</sup>
<b>R0.05NA</b>	2.61±1.11 <sup>ab</sup>	6.06±1.42 <sup>c</sup>	0.03±0.02 <sup>b</sup>
<b>R0.05A</b>	5.25±2.25 <sup>ab</sup>	1.44±0.38 <sup>ab</sup>	1.19±0.89 <sup>a</sup>

Durant la re-adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD la relació entre els virions madurs i els provirions també tendia a augmentar en respecte la de la població L0, però les diferències no arribaven a ser estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ). L'augment de la relació entre les partícules víriques potencialment infeccioses i les càpsides buides (150S+125S/70S) en la població R0.05NA indicarien que aquesta presenta una eficiència d'encapsidació de l'RNA superior a la de la població L0. A més, la disminució de la relació entre les càpsides i els pentàmers (150S+125S+70S/14S) en la mateixa població indicaria que és menys eficient que la població L0 ensamblant les proteïnes durant la morfogènesi de la càpsida.

Aquestes variacions en la producció de partícules víriques infeccioses, càpsides buides i pentàmers suggerien que els canvis en la conformació de la càpsida, que experimenta l'HAV en les condicions de *shut off* artificial, podien afectar a la producció de les diferents fraccions. De ser així, els canvis en el plegament de les proteïnes que li permetessin al virus incrementar la producció de partícules víriques infeccioses, 150S i 125S, podrien contribuir a augmentar el *fitness* del virus.

### 4.3.3. LA REGULACIÓ FINA DE LA CINÈTICA DE TRADUCCIÓ VS LA SELECCIÓ TRADUCCIONAL COM A MECANISMES SUBJACENTS A L'EVOLUCIÓ GENÒMICA PER GARANTIR LA INFECTIVITAT ESPECÍFICA MÉS ALTA EN LES CONDICIONS DE SILENCIAMENT DE LA SÍNTESI PROTEÏCA.

En treballs anteriors en els que l'HAV es feia replicar en condicions de silenciament de la síntesi proteica s'havia observat que el virus s'adaptava a aquests condicions modificant el seu ús de codons en funció de la disponibilitat de tRNA per a obtenir una velocitat de traducció regulada amb llocs de frenada que permetessin el plegament correcte de les proteïnes de la càpsida<sup>4</sup>. Aquesta regulació fina de la cinètica de traducció difereix de la selecció traduccional, la qual aniria dirigida cap a una adaptació màxima de l'ús de codons al contingut de tRNAs per a una traducció ràpida i eficient.

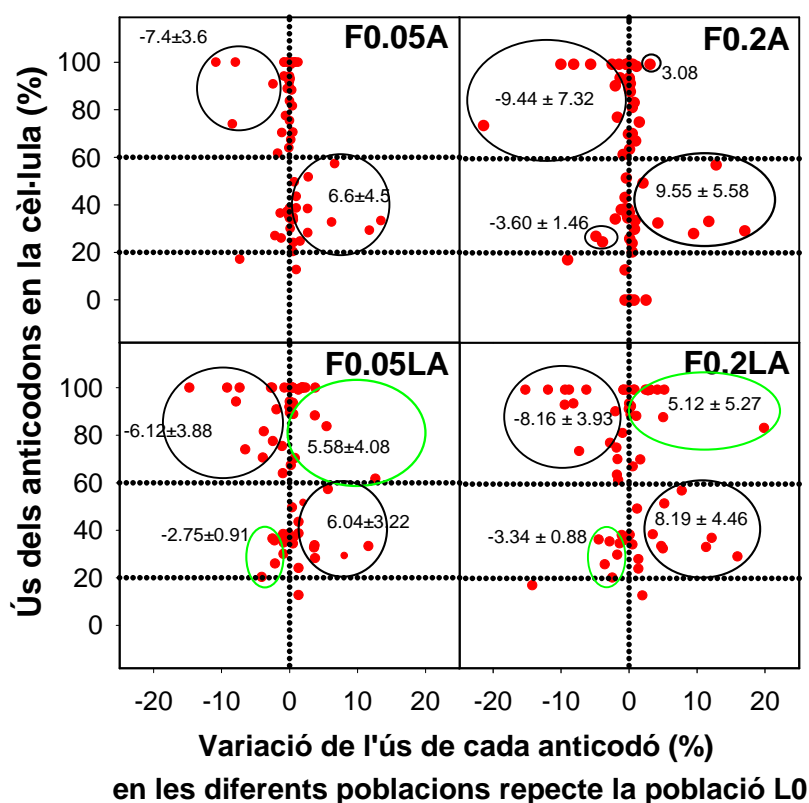


Fig. 4.3.3.1. Percentatge de variació de l'ús d'anticodons en la regió de la càpsida durant l'adaptació a 0.05 i 0.2 µg/ml d'AMD. En la figura es mostren els percentatges de variació de l'ús de cada un dels anticodons del virus respecte l'ús dels anticodons de la cèl·lula durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD (a l'esquerra) i a 0.2 µg/ml d'AMD (a la dreta) en comparació a la variació en absència d'AMD. En cada gràfic es mostra la mitja i la desviació estàndard dels grups d'anticodons amb els nivells més grans de variació. Els canvis sobre els que actuaria la selecció per a una cinètica de traducció acurada estan encerclats en negre i els canvis sobre els que actuaria la selecció traduccional estan encerclats en verd.



Així doncs, l'adaptació a les condicions de *shut off* cel·lular s'esperava que derivés cap una optimització de l'ús de codons del virus en respecte el de la cèl·lula, però es va observar que s'associava a una re-deoptimització de l'ús de codons, ja de per sí deoptimitzat, per tal de regular la velocitat de traducció i assegurar el correcte plegament de les proteïnes estructurals (Fig. 4.3.3.1). En canvi, quan s'analitzà l'ús de codons de les poblacions llargament adaptades s'observà que aquestes presentaven una sèrie de canvis en l'ús de codons que podien contribuir a un augment de la velocitat de traducció, i per tant, que la selecció traduccional podia actuar també sobre aquestes poblacions (Fig. 4.3.3.1).

A partir de les quantificacions dels virus infecciosos i les còpies genòmiques en els sobrenedants de les cèl·lules infectades es va calcular la infectivitat específica de les diferents poblacions (Taules 4.3.3.1 i 4.3.3.2), entesa com la relació entre el nombre de partícules infeccioses i el de partícules físiques presents en el sobrenedant, que es pot interpretar també com el nombre de partícules necessàries per tirar endavant un cicle replicatiu.

**Taula 4.3.3.1. Infectivitat específica de les diferents poblacions, calculada com el nombre de partícules víriques necessàries per dur a terme un cicle replicatiu. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b.**

	<b>Infectivitat específica</b>
<b>LO</b>	0.04±0.01 <sup>a</sup>
<b>F0.05NA</b>	0.08±0.02 <sup>a</sup>
<b>F0.05A</b>	0.12±0.03 <sup>b</sup>
<b>F0.05LA</b>	0.07±0.03 <sup>a</sup>
<b>R0NA</b>	0.43±0.14 <sup>c</sup>
<b>R0A</b>	0.36±0.12 <sup>c</sup>
<b>F0.2NA</b>	0.05±0.02 <sup>a</sup>
<b>F0.2A</b>	0.44±0.12 <sup>c</sup>
<b>F0.2LA</b>	0.04±0.02 <sup>a</sup>
<b>R0.05NA</b>	0.32±0.05 <sup>c</sup>
<b>R0.05A</b>	0.26±0.01 <sup>c</sup>

---

Tal i com es mostra en la Taula 4.3.3.1, durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD la infectivitat específica va incrementar significativament, passant de  $0.04 \pm 0.02$  en la població L0 a  $0.12 \pm 0.06$  en la població F0.05A. És a dir, la relació entre les partícules infeccioses i físiques passava de 1/25 en la població L0 a 1/8.3 en la població F0.05A. A més, en la reversió de 0.05 a 0.0 µg/ml d'AMD, la infectivitat específica de les poblacions R0NA i R0A era significativament superior a la de la població F0.05A, a partir de la qual s'originava la reversió, la qual cosa indicava que la infectivitat específica continuava augmentant durant la re-adaptació a les condicions originals d'absència d'AMD. Tanmateix, la població llargament adaptada a 0.05 µg/ml d'AMD F0.05LA, amb uns valors de  $0.07 \pm 0.04$ , tornava a presentar uns valors similars als de la població L0. De la mateixa manera, durant l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD la infectivitat específica també augmentava significativament durant l'adaptació, assolint uns valors de  $0.44 \pm 0.21$  (1/2.3) en la població F0.2A, però, al igual que passava en la població F0.05LA, la població llargament adaptada a 0.2 µg/ml d'AMD presentava un descens en infectivitat específica que queia fins uns valors de  $0.04 \pm 0.03$  (1/25), valors significativament inferiors als de la població F0.05A a partir de la que s'originava l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD (Taula 4.3.3.1). En canvi, durant la re-adaptació de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD, la infectivitat específica de les poblacions R0.05NA i R0.05A incrementava fins arribar a uns valors de  $0.32 \pm 0.09$  (1/3.1) i  $0.26 \pm 0.01$  (1/3.8) respectivament, els quals eren significativament superiors als de la F0.2LA, població a partir de la qual s'originava aquesta reversió (Taula 4.3.3.1).

Per tant, tenint en compte que la infectivitat específica ens informa de quantes partícules víriques són necessàries per dur a terme un cicle infecció, aquests resultats indicaven que les poblacions F0.05A i F0.2A, juntament amb les poblacions R0NA, R0A, R0.05NA i R0.05A requerien de menys partícules víriques per tirar endavant el cicle infecció. D'altra banda, el fet que les poblacions llargament adaptades a 0.05 i 0.2 µg/ml d'AMD presentessin canvis en l'ús de codons sobre els que podia actuar la selecció traduccional i un descens en les infectivitats específiques, suggeria que la selecció traduccional seria la responsable de la caiguda de la infectivitat específica. A més, l'optimització de l'ús de codons en la població F0.2LA podia contribuir a la pèrdua de *fitness* que presentava quan es tornava a replicar en 0.05 µg/ml d'AMD, ja que en suavitzar el grau d'inhibició de la síntesi de proteïnes, la població R0.05NA entraria en competència amb la cèl·lula pels anticodons que aquesta usa en una proporció superior al 60%, i que havien incrementat en la població F0.2LA. En canvi l'augment de la infectivitat específica

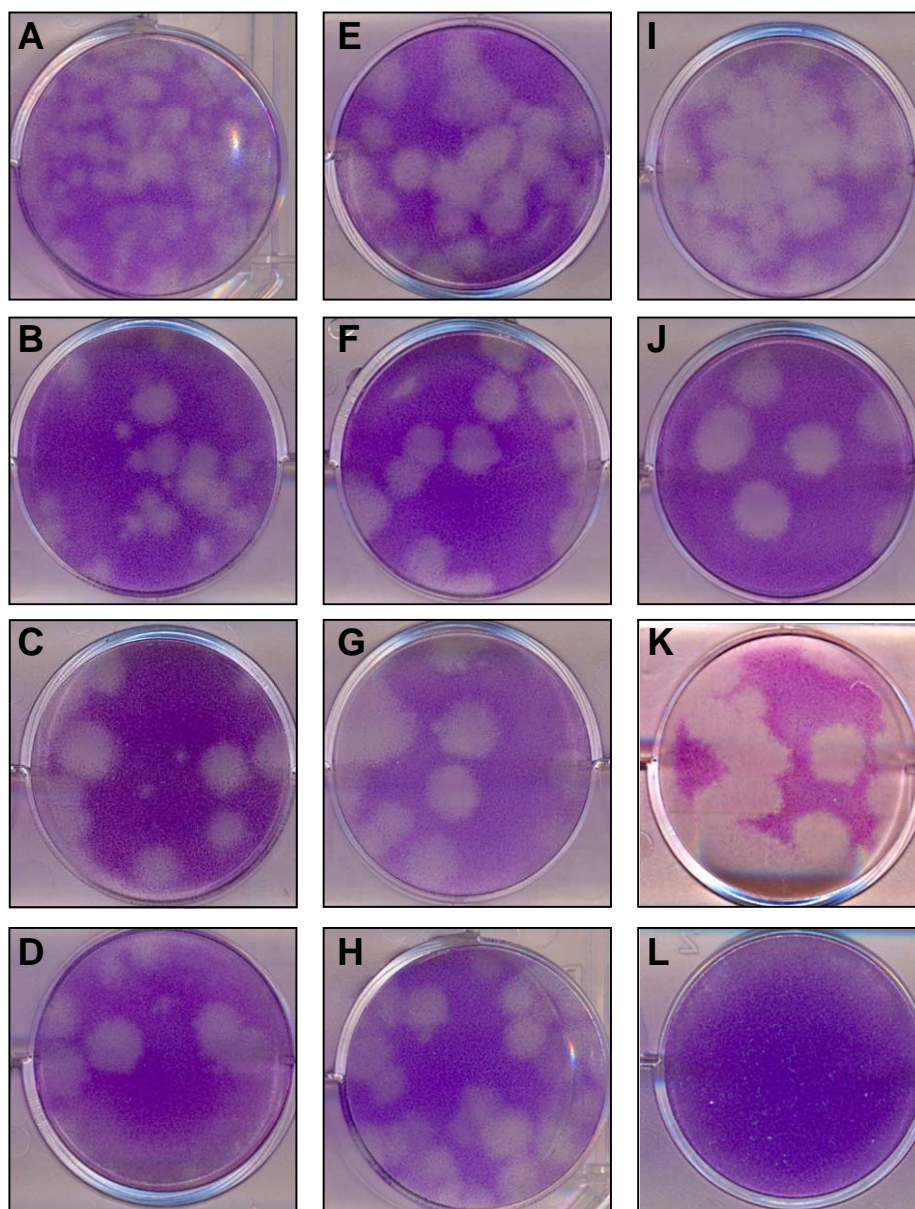
---

en la resta de poblacions vindria donada per la selecció d'una cinètica de traducció adequada.

#### **4.3.4. DURANT L'ADAPTACIÓ A LES CONDICIONS DE SILENCIAMENT DE LA SÍNTESI DE PROTEÏNES CEL·LULARS SE SELECCIONEN POBLACIONS DE CREIXEMENT RÀPID**

Per tal d'estudiar possibles canvis en la velocitat de replicació de les diferents poblacions, es va realitzar l'assaig de PFU infectant plaques de 6 pous que contenien monocapes confluents de FRhK-4 amb les diferents poblacions a estudiar. Als 10 dies post-infecció es fixaven les cèl·lules amb formaldehid i es tenyien les monocapes amb cristall violeta. Amb les calbes resultants després de la tinció, algunes de les quals es mostren en la Fig. 4.3.4, s'observà que les poblacions adaptades a replicar en presència d'AMD generaven unes calbes més grans que les poblacions no adaptades a l'AMD i la població inicial L0. En la Taula 4.3.4.1 es mostren els diàmetres de les calbes de les diferents poblacions. Segons aquests, en presència de 0.05 µg/ml d'AMD, F0.05A i F0.05LA presentaven uns diàmetres de  $0.61\pm 0.15$  i  $0.61\pm 0.11$  cm respectivament, els quals eren significativament superiors ( $p < 0.05$ ) als que presentava L0, tan en les seves condicions òptimes d'absència d'AMD, on generava unes calbes de  $0.20\pm 0.09$  de diàmetre, com en 0.05 µg/ml d'AMD, condicions en les que formava unes calbes de  $0.28\pm 0.09$ cm (Taula 4.3.4.1). Quan la població F0.05A es tornava a cultivar en condicions d'absència d'AMD experimentava una reducció del diàmetre de les calbes abans de l'adaptació, encara que la població adaptada R0A tornava a presentar un diàmetre de calba que no diferia del de població F0.05A a partir de la qual s'havia originat la reversió (Taula 4.3.4.1).

Durant l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD, després de la reducció de la mida de les calbes que presentava F0.2NA respecte la població F0.05A a partir de la qual s'havia originat, el diàmetre de les calbes continuava augmentant fins els valors de  $0.73\pm 0.07$  i  $0.71\pm 0.15$  cm que mostraven, en presència d'AMD, les poblacions F0.2A i F0.2LA respectivament (Taula 4.3.4.2). En canvi, durant la re-adaptació de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD, ni la població R0.05NA ni la R0.05A presentaven diferències significatives ( $p < 0.05$ ) respecte la població F0.2LA, a partir de la que s'havien originat, pel que fa al diàmetre de les calbes que produïen (Taula 4.3.4.2).



**Fig. 4.3.4. Imatge de les calbes generades després de la infecció amb les diferents poblacions sota estudi. (A) Població L0 en absència d'AMD. (B) Població F0.05NA en presència d'AMD. (C) Població F0.05A en presència d'AMD. (D) Població F0.05LA en presència d'AMD. (E) Població R0NA en absència d'AMD. (F) Població R0A en absència d'AMD. (G) Població R0.05NA en presència d'AMD. (H) Població R0.05A en presència d'AMD. (I) Població F0.2NA en presència d'AMD. (J) F0.2A en presència d'AMD. (K) Població F0.2LA en presència d'AMD. (L) Cèl·lules FRhK-4 sense infectar.**

**Taula 4.3.4.1. Diàmetre de les calbes generades per les diferents poblacions. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les poblacions s'assenyalen utilitzant el criteri de lletres a=ab; ab=b; a≠b i en minúscula. Les diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ) entre les condicions d'absència i presència d'AMD per una població determinada s'indiquen en majúscula.**

	<b>Diàmetre de calba (cm) en absència d'AMD</b>	<b>Diàmetre de calba (cm) en presència d'AMD</b>
<b>LO</b>	0.20±0.02 <sup>a,A</sup>	0.28±0.03 <sup>a,B</sup>
<b>F0.05NA</b>	0.21±0.01 <sup>a,A</sup>	0.33±0.04 <sup>a,B</sup>
<b>F0.05A</b>	0.45±0.02 <sup>b,A</sup>	0.61±0.03 <sup>b,B</sup>
<b>F0.05LA</b>	0.53±0.03 <sup>c,A</sup>	0.61±0.04 <sup>b,B</sup>
<b>R0NA</b>	0.49±0.03 <sup>bc,A</sup>	0.51±0.03 <sup>c,A</sup>
<b>R0A</b>	0.56±0.03 <sup>c,A</sup>	0.71±0.04 <sup>b,B</sup>
<b>F0.2NA</b>	0.32±0.02 <sup>d,A</sup>	0.44±0.05 <sup>d,B</sup>
<b>F0.2A</b>	0.50±0.05 <sup>bc,A</sup>	0.73±0.03 <sup>b,B</sup>
<b>F0.2LA</b>	0.50±0.04 <sup>bc,A</sup>	0.71±0.04 <sup>b,B</sup>
<b>R0.05NA</b>	0.50±0.02 <sup>bc,A</sup>	0.59±0.04 <sup>c,B</sup>
<b>R0.05A</b>	0.53±0.03 <sup>bc,A</sup>	0.55±0.06 <sup>c,A</sup>

També resulta interessant destacar el fet que en les condicions de *shut off* cel·lular artificialment induït totes les poblacions presentaven uns diàmetres de calbes significativament superiors ( $p < 0.05$ ) als diàmetres de les calbes que generaven en absència d'AMD (Fig. 4.3.4. i Taula 4.3.4.1).

## 4.4. DISCUSSIÓ

Cada vegada existeixen més treballs que suggereixen que la seqüència de nucleòtids no només conté la informació per a la seqüència d'aminoàcids sinó que també té la capacitat de regular la cinètica de traducció. S'ha observat que els codons sinònims que s'utilitzen amb menys freqüència s'aparellen amb tRNAs que es troben en concentracions baixes<sup>32,33</sup>, provocant una pausa del ribosoma durant la traducció donada la dificultat de trobar el tRNA correcte<sup>15,34</sup>.

S'ha proposat que la cinètica de traducció, a través de la combinació de codons freqüents i codons rars, podria contribuir al plegament de les proteïnes, ja que

---

<sup>32</sup> Ikemura, T. 1985. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.* 2: 13-34.

<sup>33</sup> Duret, L. 2000. tRNA gene number and codon usage in the c. *Elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes. *Trends Genet.* 16: 287-289.

<sup>34</sup> Varenne, S., Buc, J., Llobes, R. & Lazdunski, C. 1984. Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. *J. Mol. Biol.* 180: 549-576.

---

aquest és un procés que té lloc de forma co-traduccional i en el que la cadena polipeptídica que se sintetitza està interaccionant amb components cel·lulars i amb els seus propis residus. La velocitat a la que el polipèptid és sintetitzat determina el temps que tenen els residus que van abandonant el ribosoma per adquirir el plegament correcte<sup>35</sup>. Així doncs, les pauses que el ribosoma efectuarà en els codons rars podrien regular el procés de plegament ja que permetrien coordinar aquest procés amb el de traducció<sup>36</sup>. De fet, s'ha demostrat que els canvis de codons sinònims, malgrat que no alteren la seqüència d'aminoàcids de la proteïna, poden donar lloc a diferents plegaments<sup>37</sup>, fet que indueix a pensar que les proteïnes no tenen únicament una estructura òptima des del punt de vista termodinàmic, sinó que les seqüències de plegaments que tenen lloc durant la traducció és el que determina en última instància la formació de les conformacions òptimes i estables de les proteïnes.

L'HAV presenta un ús de codons altament deoptimitzat, és a dir, oposat al de la cèl·lula hoste, ja que ha adaptat el seu ús de codons per a utilitzar de forma abundant els tRNAs menys utilitzats per la cèl·lula. Com a conseqüència, l'HAV utilitza molts codons rars, doncs utilitza com a rars els que són rars per la cèl·lula però també els que són abundants per la cèl·lula<sup>3</sup>. Amb aquesta estratègia es creu que aconseguiria minimitzar la competència que ha d'establir amb la cèl·lula hoste pels tRNAs, ja que no indueix silenciament de la síntesi proteica com ho fan altres virus<sup>3</sup>.

En estudis previs s'havia adaptat l'HAV a replicar en condicions de silenciament de la síntesi proteica cel·lular induïdes artificialment amb AMD. La replicació del virus en presència de 0.05 µg/ml de la droga, concentració que inhibia la síntesi de proteïnes cel·lulars en un 60%, anava acompanyada d'una reducció de la producció de virus després de la qual hi havia una adaptació i recuperació de *fitness*. El mateix comportament s'observava quan la població adaptada a 0.05 µg/ml d'AMD era cultivada en 0.2 µg/ml d'AMD, condicions en les que s'inhibia la síntesi de proteïnes cel·lulars en un 90%; en aquestes condicions, la producció patia també una caiguda durant els primers passatges però més endavant es recuperava. A més, quan les poblacions adaptades a 0.05 i 0.2 µg/ml d'AMD es tornaven a

---

<sup>35</sup> Deane, C.M. & Sauders, R. 2011. The imprint of codons on protein structure. *Biotechnol. J.* 6: 641-649.

<sup>36</sup> Chartier, M., Gaudreault, F. & Najmanovich, R. 2012. Large scale analysis of conserved rare codon clusters suggests an involvement in co-translational molecular recognition events. *Bioinformatics* 28: 1438-1445.

<sup>37</sup> Tsai, C-J. 2008. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *J. Mol. Biol.* 383: 281-291.

cultivar en les condicions originals de 0.0 i 0.05 µg/ml d'AMD respectivament, també s'observava la davallada de la producció vírica seguida per una recuperació, encara que en aquest cas la recuperació era molt més ràpida que durant l'adaptació, fet que probablement es pot explicar per la memòria de la quasiespècie<sup>38</sup>.

L'adaptació del virus a les condicions de silenciament de la síntesi proteica s'associà a una re-deoptimització en l'ús de codons específicament en la regió que codifica per les proteïnes de la càpsida<sup>4</sup>. L'atenuació de la traducció, mitjançada per les parades que el ribosoma efectuaria en els llocs amb codons rars, permetria el correcte plegament de les proteïnes de la càpsida i així permetria aconseguir la càpsida tan estable i cohesiva que té l'HAV<sup>4,39</sup>. Tan és així que una traducció massa ràpida, com la que podria tenir lloc en les condicions de *shut off* cel·lular degut a l'augment de la disponibilitat de tRNAs, que no proporcionés les parades del ribosoma necessàries per permetre el correcte plegament de les proteïnes, podria resultar en la formació de càpsides amb canvis conformacionals. Aquests canvis en la conformació de la càpsida podrien modificar la seva estabilitat o afectar al comportament dels virus en alguna de les fases del cicle replicatiu, fet que explicaria la caiguda del *fitness* prèvia a l'adaptació a l'AMD.

En aquest sentit, existeixen molts exemples en la literatura que demostren que canvis en la velocitat de traducció, deguts a substitucions de codons rars per codons més freqüents, poden afectar el plegament de la proteïna i, per tant, alterar la seva funció. Així, canvis sinònims de codons rars per altres més freqüents en el gen *EgFABP1* d'*E. coli* fan que el producte d'aquest gen presenti una menor solubilitat deguda al plegament incorrecte de la proteïna<sup>40</sup>. De forma similar, l'eficiència de plegament de la proteïna *Sufl* d'*E. coli* pateix fortes alteracions després de la substitució sinònima de codons rars per altres més freqüents<sup>16</sup>. També a *E. coli*, la substitució sinònima de codons rars per altres més freqüents en el gen de la cloramfenicol acetiltransferasa resulta en un descens de l'activitat específica de la proteïna<sup>20</sup>. Finalment, estudis realitzats amb la glicoproteïna-P humana han demostrat que aquesta pateix canvis conformacionals en la seva estructura terciària quan s'introdueixen mutacions sinònimes de codons freqüents

---

<sup>38</sup> Ruiz-Jarabo, C.M., Arias, A., Baranowski, E., Escarmís, C. & Domingo, E. 2000. Memory in viral quasispecies. *J. Virol.* 74: 3543-3547.

<sup>39</sup> Abad, F.X., Pintó, R.M. & Bosch, A. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3704-3710.

<sup>40</sup> Cortazzo, P., Cervenansky, C., Marin, M., Reiss, C., Ehrlich, R. & Deana, A. 2002. Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 537-541.

---



per altres de rars en el gen que la codifica<sup>21</sup>. Així, encara que la selecció per una traducció eficient seria el factor més determinant en l'ús de codons a nivell genòmic, la selecció per una traducció acurada explicaria l'ús de codons en residus crítics per a l'estructura i/o la funció de la proteïna<sup>41</sup>.

Com que l'estructura tridimensional de la càpsida de l'HAV encara no s'ha aconseguit resoldre, i, per tant, era impossible detectar canvis en el plegament de les proteïnes de la càpsida per visualització estructural, es van analitzar algunes de les característiques físiques i biològiques de la càpsida, per tal de determinar si la caiguda i la recuperació del *fitness* al llarg del procés d'adaptació a les condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes eren degudes a canvis en el plegament de les proteïnes estructurals derivats dels canvis en les velocitats de traducció.

Les variacions en les relacions dels reconeixements pels diferents MAb, K34C8/K24F2 i H7C27/K24F2, que presentaven les poblacions adaptades a 0.05 µg/ml d'AMD i a 0.2 µg/ml d'AMD, suggeria l'existència de canvis en l'estructura de la càpsida que acompanyaven el procés d'adaptació a la droga i que podrien ser el resultat de l'alteració de la velocitat de traducció en aquestes condicions de major disponibilitat de tRNAs. A més, encara que les poblacions adaptades a l'AMD presentaven bastants canvis d'aminoàcids en la regió de la càpsida, el fet de que les poblacions no adaptades ja mostressin variacions en el reconeixement pels diferents MAb sense tenir cap canvi aminoacídic fixat, indicava que les mutacions no eren les úniques responsables d'aquest augment en les relacions de reconeixement, tot i que hi podien contribuir. A més, quan les poblacions adaptades a replicar en presència de 0.05 i 0.2 µg/ml d'AMD es re-adaptaven a les condicions originals de 0.0 i 0.05 µg/ml d'AMD respectivament, les relacions de reconeixement variaven en les poblacions adaptades però també en les no adaptades, les quals eren, a nivell genòmic, pràcticament idèntiques a la població a partir de la que s'originava la reversió i, sobretot, no presentaven canvis en l'ús de codons. Per tant, sembla que el canvi en les condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lulars, i el canvi en el *pool* de tRNAs, afectava el plegament de la càpsida, ja que l'únic que variava entre la població parental i les poblacions no adaptades era la concentració d'AMD en la que replicava la població.

Aquesta idea es veia reforçada pel fet de que les poblacions adaptades i no adaptades a replicar en condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes

---

<sup>41</sup> Shah, P. & Gilchrist, M.A. 2011. Explaining complex codon usage patterns with selection for translational efficiency, mutation bias, and genetic drift. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108: 10231-10236.

presentaven diferents resistències front l'alta temperatura, el pH àcid i les sals biliars. En general, les poblacions adaptades a l'AMD, tant a 0.05 µg/ml com a 0.2 µg/ml, mostraven una pèrdua d'estabilitat en totes les condicions testades. En particular, les poblacions adaptades a 0.2 µg/ml d'AMD eren les que es mostraven menys resistents davant l'alta temperatura, el pH àcid i les sals biliars. Durant la re-adaptació de les poblacions adaptades a 0.05 i 0.2 µg/ml d'AMD a les condicions originals de 0.0 i 0.05 µg/ml d'AMD respectivament, es va observar una recuperació parcial de l'estabilitat front l'alta temperatura i les sals biliars, tot i que després de l'adaptació les poblacions esdevenien molt sensibles al pH àcid. Aquests canvis en l'estabilitat de la càpsida estarien també associats als canvis en el plegament de les proteïnes, generats en les diferents condicions de *shut off* cel·lular artificial, ja que les poblacions no adaptades, que, com ja s'ha dit anteriorment, no diferien de la població parental a nivell genòmic, presentaven canvis en l'estabilitat de la càpsida simplement per haver replicat en unes condicions de *shut off* diferents. Per tant, les mutacions que es fixaven en les poblacions durant l'adaptació a l'AMD no serien les úniques responsables dels canvis en l'estabilitat del virus, encara que hi podien contribuir. En aquest sentit, s'han descrit en altres picornavirus mutacions que donaven lloc a variants més sensibles a l'alta temperatura o al pH àcid. Per exemple, un canvi en el residu 54 de VP1 del virus de la febre aftosa (FMDV)<sup>42</sup> i un canvi en el residu 225 de VP3 de PV<sup>43</sup> resultaven en un fenotip menys estable a alta temperatura. Ara bé, la mutació en el residu 134 de VP2 que presentaven les poblacions F0.05A i F0.2A, i que es localitzava en una regió propera al residu 54 de VP1 de FMDV, no produïa cap canvi en l'estabilitat d'aquestes poblacions front l'alta temperatura. A més, la població F0.2LA tenia un canvi en el residu 123 de VP1, que també es trobava pròxim al residu 54 de VP1 de FMDV, però tenia la mateixa sensibilitat que la població F0.2A davant l'alta temperatura i aquesta última no presentava la mutació. D'altra banda, la mutació en el residu 142 de VP3, propera al residu 225 de VP3 de PV, la presentaven tan les poblacions F0.2A i F0.2LA, més sensibles a la temperatura, com les poblacions R0.05NA i R0.05A, que recuperaven l'estabilitat front l'alta temperatura. Pel que fa a l'estabilitat front el pH àcid, havia estat prèviament descrit que un canvi en el residu 123 de VP3 del FMDV comportava una pèrdua d'estabilitat a pH àcid<sup>44</sup>.

---

<sup>42</sup> Escarmís, C., Perales, C. & Domingo, E. 2009. Biological effect of Mueller's Ratchet: distant capsid site can affect picornavirus protein processing. *J. Virol.* 83: 6748-6756.

<sup>43</sup> Bouchard, M.J., Lam, D-H. & Racaniello, V.R. 1995. Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. *J. Virol.* 69: 4972-4978.

<sup>44</sup> Martín-Acebes, M.A., Rincón, V., Armas-Portela, R., Mateu, M.G. & Sobrino, F. 2010. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid lability and confer resistance to acid-dependent uncoating inhibition. *J. Virol.* 84: 2902-2912.

---

Durant l'adaptació a 0.2 µg/ml l'AMD i la reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml l'AMD, les poblacions de l'HAV adquirien una mutació en el residu 142 de VP3, proper al residu 123 de VP3 de FMDV però, encara que les poblacions F0.2A, F0.2LA i R0.05A eren les més sensibles front el pH àcid, la població R0.05NA recuperava l'estabilitat a pH àcid tot i presentar la mateixa mutació. Quant a l'estabilitat front les sals biliars, tot i que les poblacions F0.05A i R0NA presentaven les mateixes mutacions, tenien un comportament diferent. Tot plegat suggereix que no són les mutacions puntuals sinó el canvi en el plegament de les proteïnes de la càpsida en les diferents condicions de *shut off* cel·lular artificial el que acaba determinant l'estabilitat de les partícules víriques. La importància del patró d'atenuació de la traducció en el plegament proteic és tal que ha evolucionat ajustant-se en funció de les variacions en les concentracions de tRNAs pròpies de cada espècie, per tal de mantenir el plegament de proteïnes que tenen funcions i estructures similars en espècies diferents<sup>18</sup>. Per tant, els resultats aquí mostrats en referència a l'adaptació de l'HAV al *shut off* cel·lular mostren que per poder mantenir els patrons d'atenuació de la traducció fins i tot són vàlides les mutacions que donen lloc a canvis d'aminoàcids.

Els canvis en la conformació de la càpsida de l'HAV, deguts al plegament diferencial de les proteïnes estructurals en les diferents condicions de *shut off* cel·lular, afectaven a la producció de partícules víriques (150S i 125S), càpsides buides (70S) i pentàmers (14S) i suggerien canvis en les diferents etapes de la morfogènesi. Mentre que en la població L0 el pas de provirió a virió a madur era un punt limitant, durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD es va observar una tendència a incrementar l'eficiència de maduració de la càpsida tot i que algunes poblacions esdevenien menys eficients en altres fases de la morfogènesi, com l'ensamblatge de les càpsides en el cas de les poblacions F0.05LA, R0NA i R0A, o l'encapsidació de l'RNA en el cas de les poblacions R0NA i R0A. Tot i haver-se descrit que petites delecions en la proteïna VP1 de poliovirus donen lloc a variants que encapsiden l'RNA més lentament<sup>45</sup>, el canvi en l'eficiència d'encapsidació de l'RNA en les poblacions R0NA i R0A no podia associar-se a canvis d'aminoàcids, perquè la població F0.05A, idèntica a nivell genòmic a la població R0NA, presentava una eficiència d'encapsidació diferent. Durant l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD també s'observava una tendència a incrementar l'eficiència de maduració dels provirions i d'encapsidació de l'RNA. En canvi, abans de la re-adaptació de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD, la població R0.05NA presentava un descens de l'eficiència d'ensamblatge

---

<sup>45</sup> Kirkegaard, K. 1990. Mutations in VP1 of Poliovirus specifically affect both encapsitation and release of viral RNA. J. Virol. 64: 195-206.

---

de les càpsides. De totes maneres, com que cap de les mutacions fixades durant els processos d'adaptació a les diferents condicions d'inhibició de la síntesi proteica cel·lular es podia associar a un fenotip de morfogènesi determinat sembla, *a priori*, que els canvis durant la morfogènesi haurien d'estar més relacionats amb canvis en el plegament que amb mutacions puntuals.

Alguns dels canvis en la conformació de la càpsida observats, afectaven també a la unió del virus al receptor cel·lular. De fet, la caiguda i la recuperació de *fitness* durant l'adaptació del virus a les condicions d'inhibició de la síntesi de proteïnes cel·lulars del 60%, inhibició que s'aconseguia amb una concentració de 0.05 µg/ml d'AMD, podien explicar-se per canvis en l'eficiència d'unió al receptor. La població no adaptada F0.05NA experimentava una reducció en el percentatge d'unió al receptor, mentre que les poblacions adaptades F0.05A i F0.05LA recuperaven uns percentatges d'unió al receptor iguals als de la població L0. Per tant, durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD, el virus hauria canviat l'ús de codons per modular la velocitat de traducció de les proteïnes estructurals de manera que aquestes recuperaven el plegament que els hi retornava la capacitat d'interaccionar amb el receptor. De forma similar, la caiguda i la recuperació de *fitness* que experimentava la població F0.05A quan es feia replicar de nou en absència d'AMD, també s'explicava per la disminució i la recuperació de la unió al receptor que presentaven les poblacions R0NA i R0A respectivament. Altre cop és temptador pensar que els canvis d'aminoàcids produïts eren els responsables d'aquestes diferències pel que fa a la capacitat d'unió al receptor, però no hem d'oblidar que les poblacions F0.05NA i R0NA eren idèntiques a nivell genòmic que les poblacions a partir de les quals s'havien originat (L0 i F0.05A respectivament). Per tant, les diferències en la capacitat d'unió al receptor entre les poblacions L0 i F0.05NA i entre F0.05A i R0NA només podien ser causades pels canvis en les condicions de shut off cel·lular en les que es feien replicar. En canviar aquestes condicions variava la disponibilitat de tRNAs i, per consegüent, el patró d'atenuació de la traducció, que depèn de les agrupacions de codons rars, es veia alterat i donava lloc a canvis en el plegament de les proteïnes. El resultat eren aquestes càpsides de les poblacions no adaptades, que interaccionaven de forma menys eficient amb el receptor. Els canvis en l'ús de codons que experimentaven les poblacions durant l'adaptació els hi permetien recuperar la interacció amb el receptor.

Durant l'adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD el virus mostrava una re-deoptimització de l'ús de codons ja que, en unes condicions de menor competència amb la cèl·lula pels tRNAs, incrementava l'ús del grup d'anticodons que la cèl·lula utilitzava en una

proporció d'entre el 20% i el 60% i disminuïa l'ús del grup d'anticodons que la cèl·lula utilitzava per sobre el 60%; durant la re-adaptació a 0.0 µg/ml d'AMD també re-deoptimitzava l'ús de codons doncs, en unes condicions de competència amb la cèl·lula pels tRNAs, augmentava l'ús del grup d'anticodons usats en una proporció per sobre el 60% i disminuïa l'ús del grup d'anticodons que la cèl·lula usava entre el 20% i el 60%. En deoptimitzar l'ús de codons aconseguia alentir la traducció i recuperar un plegament de la càpsida que tornés a interaccionar amb el receptor de la mateixa manera que ho feia la de la població parental L0.

D'altra banda, la caiguda de la producció vírica observada en 0.2 µg/ml d'AMD, condicions que induïen una inhibició del 90% de la síntesi de les proteïnes cel·lulars, no es va associar a canvis en l'inici del cicle replicatiu del virus. En aquest cas, l'alta toxicitat que aquesta concentració d'AMD produïa en les cèl·lules, amb una mortalitat del 90% als 4 dies<sup>4</sup>, podria ser la responsable de la caiguda de la producció vírica que experimentava la població F0.2NA.

No obstant, l'adaptació de l'HAV a aquestes condicions d'alt silenciament de la síntesi de proteïnes s'associà a una cinètica de desencapsidació molt més ràpida, la qual permetria a la població F0.2A finalitzar el cicle replicatiu abans que la cèl·lula morís degut a la toxicitat de l'AMD. Per tant, els canvis de l'ús de codons van donar com a resultat aquesta càpsida capaç de lliberar l'RNA molt eficientment, tot i que a expenses d'interaccionar amb el receptor d'una forma menys eficient. Cal destacar que en estudis *in vitro* del cicle replicatiu de l'HAV s'havia observat que la desencapsidació és un procés lent i asincrònic<sup>46</sup> i que dura més de 18h<sup>47</sup>. Aquests temps de desencapsidació coincidirien amb els observats en la població L0, que necessitava d'unes 18h per a que desencapsidessin el 50% dels virus. Per tant, la població adaptada F0.2A, que només necessitava unes 3h per a que desencapsidessin el 50% dels virus, seria molt més eficient completant aquesta etapa del cicle replicatiu, el que li suposaria un gran avantatge sobretot tenint en compte les condicions de toxicitat cel·lular en les que replicava. Per tant, la recuperació del *fitness* en presència de 0.2 µg/ml d'AMD venia donada per una disminució dels temps de desencapsidació, gràcies a la qual el virus necessitava menys temps per finalitzar el cicle replicatiu en unes condicions en les que als 4 dies la viabilitat cel·lular era només del 10%. Tanmateix, aquest temps de

---

<sup>46</sup> Wheeler, C.M., Fields, H.A., Schable, C.A., Meinke, W.J. & Maynard, J.E. 1985. Adsorption, purification, and growth characteristics of hepatitis A virus strain HAS-15 propagated in fetal rhesus monkey kidney cells. *J. Clin. Microbiol.* 23: 434-440.

<sup>47</sup> Bishop, N.E. & Anderson, D.A. 1999. Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. *J. Virol.* 74: 3423-3426.

---

desencapsidació tan baix no es mantenia en la població F0.2LA, doncs aquesta mostrava una tendència a augmentar-lo respecte el de la població F0.2A, encara que continuava essent prou ràpid i només requeria d'unes 8h aproximadament per la desencapsidació del 50% de les partícules víriques. D'altra banda, la població F0.2LA recuperava la capacitat d'interacció amb el receptor, motiu pel qual no presentaria una davallada en la producció vírica respecte la població F0.2A, tot i presentar aquesta tendència a augmentar el temps de desencapsidació. Quan la població F0.2LA es tornava a cultivar en 0.05 µg/ml d'AMD també s'observava una tendència a augmentar el temps de desencapsidació que era d'unes 14h en la població adaptada R0.05A.

Cal destacar que la població F0.2A és la que mostrà una desencapsidació més ràpida i, al mateix temps, la que presentava la càpsida més làbil a pH àcid. Això suggereix que la sensibilitat al pH àcid de la població F0.2A podria contribuir a la ràpida desencapsidació d'aquesta població. Aquesta idea es veuria reforçada pel fet que la disminució de la sensibilitat a pH àcid en la població F0.2LA anés acompanyada d'una desencapsidació més lenta que la de la població F0.2A. De fet, el pH àcid dels endosomes és un mecanisme universal de desencapsidació de virus<sup>48,49</sup>. S'ha descrit que l'HAV pateix canvis conformacionals que augmenten la hidrofobicitat de la càpsida en condicions de pH àcid<sup>50</sup> però, malgrat que l'increment de la hidrofobicitat de les partícules víriques gràcies al pH àcid dels endosomes és el mecanisme que permet la desencapsidació de molts picornavirus<sup>51</sup>, existeixen una sèrie de discrepàncies en els estudis realitzats amb l'HAV<sup>52,53,54</sup> i, per consegüent, caldria realitzar nous estudis de l'entrada del virus en presència d'inhibidors de l'acidificació del pH endosomal per tal de determinar si l'HAV necessita del pH àcid per iniciar un cicle infecciós.

De totes maneres, sí podem concloure que el canvi de l'ús de codons que experimentaven les poblacions per adaptar-se a 0.2 µg/ml d'AMD donava lloc a una

---

<sup>48</sup> Carr, C.M. & Kim, P.S. 1994. Flu virus invasion: halfway there. *Science* 266: 234-236.

<sup>49</sup> Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75: 477-486.

<sup>50</sup> Bishop, N.E. 1999. Conformational changes in the hepatitis A virus capsid in response to acidic conditions. *J. Med. Microbiol.* 48: 443-450.

<sup>51</sup> Tuthill, T.J., Gropelli, E., Hogle, J.M. & Rowlands, D.J. 2010. Picornaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 343: 43-89.

<sup>52</sup> Bishop, N.E. 1998. Examination of potencial inhibitors of hepatitis A virus uncoating. *Intervirology* 41:261-271.

<sup>53</sup> Superti, F., Seganti, L., Orsi, N., Divizia, M., Gabrieli, R. & Paná, A. 1989. Effect of cellular function inhibitors on the infection of Frp/3 cells by hepatitis A virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 178: 29-36.

<sup>54</sup> Superti, F., Seganti, L., Orsi, N., Divizia, M., Gabrieli, R. & Paná, A. 1987. The effect of lipophilic amines on the growth of hepatitis A virus. *Antiviral. Res.* 96: 289-296.

---

càpsida que desencapsidava l'RNA més fàcilment. Durant el procés d'adaptació a aquestes condicions el virus re-deoptimitzava l'ús de codons en la regió de la càpsida, doncs, incrementava l'ús del grup d'anticodons que la cèl·lula utilitzava en una proporció d'entre el 20% i el 60% i disminuïa l'ús del grup d'anticodons que la cèl·lula utilitzava per sobre del 60% en un ambient en el que no havia de competir amb la cèl·lula pels tRNAs. En deoptimitzar l'ús de codons aconseguiria modificar el patró d'atenuació de la traducció i, per tant, el plegament de les proteïnes estructurals. El resultat era una conformació de la càpsida que desencapsidava l'RNA més ràpidament. Quan la població llargament adaptada F0.2LA es tornava a replicar en 0.05 µg/ml d'AMD, la re-adaptació anava associada a una certa reversió dels canvis en l'ús de codons, augmentant l'ús del grup d'anticodons que la cèl·lula utilitzava per sobre del 60% i disminuint l'ús del grup d'anticodons que la cèl·lula utilitzava en una proporció d'entre el 20% i el 60%. Però en aquest cas, els canvis que això suposava en la conformació de la càpsida no donaven lloc a modificacions de la interacció amb el receptor o la desencapsidació que poguessin explicar la recuperació de *fitness* del virus re-adaptat a aquestes condicions.

D'altra banda, és important senyalar que, mentre inicialment la re-deoptimització en l'ús de codons, que s'observava en les poblacions durant l'adaptació al *shut off* cel·lular, aniria dirigida a regular la cinètica de traducció, adaptant-se al *pool* de tRNAs per obtenir el correcte plegament de les proteïnes estructurals<sup>4</sup>, posteriorment (poblacions llargament adaptades F0.05LA i F0.2LA) hi hauria una sèrie de canvis en l'ús de codons sobre els que podria haver actuat la selecció traduccional, ja que implicaven una optimització de l'ús de codons que podia permetre una traducció més ràpida. La disminució de la infectivitat específica que s'observà en aquestes dues poblacions, podria ser resultat de l'augment de la velocitat de traducció, degut a la selecció traduccional, que podria contribuir al plegament incorrecte de les proteïnes de la càpsida i la consegüent formació de partícules víriques menys infeccioses. Així doncs, l'increment de la velocitat de traducció donaria lloc a un descens de la seva infectivitat específica i, per tant, en un augment del nombre de partícules víriques necessàries per a dur a terme un cycle infecció. El cas contrari és el que s'havia observat en variants de PV en les que s'havia introduït un alt nivell de deoptimització de l'ús de codons en la regió de la càpsida<sup>55</sup>. Aquestes variants presentaven un descens de la infectivitat específica associat a l'alentiment de la traducció, ja sigui per que l'augment de codons rars

---

<sup>55</sup> Mueller, S., Papamichail, D., Coleman, J.R., Skiena, S. & Wimmer, E. 2006. Reduction of the rate of Poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J. Virol.* 80: 9687-9696.

incrementava el temps de traducció, o per que les excessives parades del ribosoma causaven la dissociació prematura del complex traduccional donant lloc a proteïnes truncades destinades a degradació, o les dues coses<sup>55</sup>. Aquesta discrepància entre l'HAV i PV podia ser deguda a que la baixa traducció en les variants deoptimitzades de PV no els hi permetria assolir les concentracions suficients de les proteïnes víriques necessàries per a inhibir la resposta antivírica cel·lular. De ser així, augmentaria el nombre de infeccions avortades per la resposta antivírica de la cèl·lula, fet que podria ajudar a explicar el descens de la infectivitat específica observat en aquestes variants<sup>55</sup>. L'HAV presentaria una estratègia ben diferent a la de PV per tal d'evadir la resposta antivírica, doncs es serveix de la seva lenta replicació i baixa producció, junt amb altres mecanismes que li permeten inhibir la síntesi d'INF<sup>56,57</sup>, per evitar o reduir aquesta resposta. Tenint en compte que el virus de l'hepatitis C (HCV) també interromp la via de síntesi de l'INF però d'una manera menys eficient, la infecció amb l'HAV es podria considerar un paradigma únic en la interacció virus-hoste<sup>58</sup>. En aquest sentit, una traducció lenta no suposaria un problema per l'HAV, ja que és el propi virus el que ha adoptat aquesta estratègia per adequar la traducció al plegament correcte de les proteïnes, sense el qual mai aconseguiria una càpsida tan estable i cohesiva. Cal tenir en compte que, en general, el fet de no concloure amb èxit qualsevol de les etapes prèvies a l'establiment d'una infecció productiva durant el cicle replicatiu dona lloc a una infecció avortada, i, per tant, a la pèrdua de la partícula infecciosa. Això vol dir que les partícules infeccioses han de ser capaces de interaccionar amb el receptor, internalitzar-se i desencapsidar, iniciar la traducció, traduir les proteïnes, replicar l'RNA i, finalment, encapsidar la progènie vírica. En el cas de les poblacions llargament adaptades, l'augment de la velocitat de traducció donaria lloc a un plegament incorrecte de les proteïnes de la càpsida en un percentatge dels RNAs que es tradueixen, de manera que aquesta seria deficient interaccionant amb el receptor i/o desencapsidant. De ser així, les partícules víriques amb càpsides no funcionals i, per tant, no infeccioses, serien les responsables de la caiguda de la infectivitat específica en les poblacions llargament adaptades. Malgrat la caiguda de la infectivitat específica, aquestes poblacions mantindrien el *fitness* gràcies a que

---

<sup>56</sup> Yang, Y., Liang, Y., Qu, L., Chen, Z., Yi, M., Li, K. & Lemon, S.M. 2007. Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. PNAS 104: 7253-7258.

<sup>57</sup> Qu, L., Feng, Z., Yamane, D., Liang, Y., Landford, R.E., Li, K. & Lemon, S.M. 2011. Disruption of TLR3 signaling due to cleavage of TRIF by the hepatitis A virus protease-polymerase processing intermediate, 3CD. PLoS path. 7: e1002169.

<sup>58</sup> Landford, R.E., Feng, Z., Chavez, D., Guerra, B., Brasky, K.M., Zhou, Y., Yamane, D., Perelson, A.S., Walker, C.M. & Lemon, S.M. 2011. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. PNAS 108: 11223-11228.

---



l'augment de la velocitat de traducció també els hi serviria per finalitzar el cicle replicatiu més ràpidament.

Quant a la infectivitat específica de la resta de poblacions, cal destacar que durant l'adaptació tan a 0.05 com a 0.2 µg/ml d'AMD, s'observava un augment de la infectivitat específica i, per tant, una disminució de la quantitat de virus infecciosos necessaris per a dur a terme un cicle infecció. En aquest sentit, seria interessant destacar que l'HAV ja presenta una infectivitat específica relativament alta, si es compara amb la de la resta de picornavirus. Per exemple, s'ha descrit que PV necessita entre 100<sup>55</sup> i 293<sup>59</sup> partícules físiques per a iniciar un cicle infecció. Tenint en compte que la població parental L0 de l'HAV, amb una infectivitat específica de 0.05, només necessitava 25 partícules físiques per iniciar un cicle infecció, les poblacions adaptades a l'AMD F0.05A i F0.2A, les quals en necessitaven 8.3 i 2.3 respectivament, presentaven unes infectivitats específiques extremadament altes. També eren altes les que presentaven les poblacions adaptades a l'AMD i que es tornaven a replicar en les condicions originals, les quals necessitaven entre 2.3 i 3.8 partícules físiques per dur a terme un cicle infecció. Aquests resultats indicarien que els canvis en l'ús de codons per conservar el patró d'atenuació de la traducció en les diferents condicions de disponibilitat de tRNAs contribueixen a disminuir el nombre de partícules víriques necessàries per dur a terme un cicle infecció. Per tant, en les poblacions adaptades al *shut off* cel·lular es veuria reduïda la producció de partícules víriques que no donguessin lloc a infeccions productives. A aquest augment de la infectivitat específica hi contribuirien la recuperació de la capacitat d'unió al receptor en el cas de les poblacions adaptades a 0.05 µg/ml d'AMD i l'augment de la velocitat de desencapsidació en el cas de les poblacions adaptades a 0.2 µg/ml d'AMD. Pel que fa a l'inici de la traducció, les diferents poblacions estudiades no presentaven canvis en la regió de l'IRES. Per tant, havien de ser igual d'eficients que la població L0 en l'ensamblatge del complex d'inici de la traducció. Respecte a la replicació de l'RNA, es va detectar el canvi A39V en el motiu PAV/A de la polimerasa 3D, que apareixia en la població F0.05A i es mantenia en totes les poblacions durant l'adaptació a 0.2 µg/ml d'AMD i la reversió de 0.2 a 0.05 µg/ml d'AMD. Com que prèviament s'havia descrit que un mutant de l'HAV amb el canvi F42L en la 3D mostrava un increment en la cinètica de replicació de l'RNA<sup>60</sup>, no es podia descartar que el canvi A39V

---

<sup>59</sup> Burns, C.C., Shaw, J., Campagnoli, R., Jorba, J., Vincent, A., Quay, J. & Kew, O. 2006. Modulation of Poliovirus replicative fitness in Hela cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region.

<sup>60</sup> Konduru, K. & Kaplan, G. 2010. Determinants in 3D<sup>pol</sup> modulate the rate of growth of hepatitis A virus. *J. Virol.* 84: 8342-8347.

---

tingués algun efecte en les poblacions estudiades. El que és evident, però, és que en cap cas aquesta mutació era la responsable de les caigudes i recuperacions de *fitness* durant les adaptacions a les diferents condicions de *shut off* cel·lular ja que totes les poblacions excepte la L0 i F0.05NA la presentaven. Aquesta mutació tampoc podia explicar l'augment de les infectivitats específiques durant l'adaptació al *shut off* cel·lular, doncs estava present en les poblacions llargament adaptades F0.05LA i F0.2LA les quals presentaven un descens de la infectivitat específica. A més, cal destacar que aquesta posició 39 de la 3D presenta en altres picornavirus tan el residu A com el residu V, donant lloc al motiu PAA (HAV i FMDV) o PAV (PV, CV-B3 i HRV)<sup>60</sup>, sense que s'hagi descrit que estigui involucrat en l'eficiència de polimerització.

En el cas de la població F0.05A i les poblacions durant la re-adaptació de la població F0.05A a l'absència de l'AMD, R0NA i R0A, l'augment de la infectivitat específica podia estar relacionat amb la major eficiència de maduració de les partícules víriques 125S per donar lloc al virió madur o 150S. La població F0.2A també presentava una tendència a augmentar l'eficiència de maduració, encara que aquesta no arribava a ser significativament diferent a la de la població L0. En el cas d'aquesta població, al igual que en la població R0.05NA, l'increment de la infectivitat específica podia venir de l'augment de l'eficiència d'encapsidació de l'RNA.

A pesar de que en la població R0.05NA la infectivitat específica augmentava respecte la de la població F0.2LA, a partir de la qual s'originava, el *fitness* de la primera població presentava una caiguda en les noves condicions de *shut off*. Com que en 0.05 µg/ml d'AMD el grau de *shut off* era inferior que en 0.2 µg/ml d'AMD, podria ser que en aquestes condicions els codons optimitzats per la població F0.2LA fossin els responsables dels canvis en la cinètica de traducció i la conseqüent caiguda de *fitness*. De fet, la població F0.2LA havia incrementat l'ús del grup d'anticodons utilitzats per sobre el 60% per la cèl·lula, fet que, en les condicions d'inhibició de la síntesi de proteïnes del 90% en les que s'havia adaptat, podia suposar una optimització de l'ús de codons per a una cinètica de traducció més eficient. Tanmateix, quan aquesta població es tornava a cultivar en 0.05 µg/ml d'AMD, com que la inhibició de la síntesi de proteïnes passava a ser només del 60%, entrava en competència amb la cèl·lula per utilitzar aquests anticodons. Per tant, en aquestes condicions, el fet d'haver augmentat l'ús del grup d'anticodons més utilitzats per la cèl·lula podia implicar un alentiment de la traducció, que podria derivar en la caiguda del *fitness*. Els canvis en l'ús de codons que incorporava la

---

població R0.05A durant la re-adaptació a 0.05 µg/ml d'AMD li haurien permès retrobar una cinètica de traducció adequada i recuperar el *fitness*, mantenint una infectivitat específica alta.

En qualsevol cas, el procés d'adaptació va anar acompanyat d'un augment molt significatiu del diàmetre de les calbes de les diferents poblacions, fet que indicava que s'havien seleccionat poblacions amb un cicle replicatiu més ràpid. El fet de que totes les poblacions, inclosa la parental, presentessin un diàmetre de calba superior en condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lulars, era una prova més de que, en aquestes condicions de major disponibilitat de tRNAs i altres recursos com ribonucleòtids, la velocitat de replicació del virus incrementava, probablement per l'augment de la velocitat de traducció en aquestes condicions. Com a conseqüència d'aquest increment en la velocitat de traducció, el virus patia una sèrie de canvis en el plegament de les proteïnes de la càpsida que resultaven en una caiguda de la producció de virus infecciosos. Per tal d'adaptar-se a aquestes condicions, el virus va haver de modificar el seu ús de codons, adaptant-se a les noves concentracions de tRNAs, per mantenir un patró d'atenuació de la traducció que li permetés plegar correctament les proteïnes estructurals i aconseguir recuperar el *fitness*. Amb tot, durant el procés d'adaptació, s'acabaven seleccionant poblacions que replicaven més ràpidament. En aquest sentit, resulta interessant destacar que, mentre en el cas de l'HAV una re-deoptimització de l'ús de codons acabava generant poblacions de replicació més ràpida, en el cas de PV les variants deoptimitzades presentaven una replicació més lenta, acompanyada d'una forta reducció del diàmetre de les calbes que generaven<sup>55</sup>. Cal tenir en compte, però, que mentre l'HAV presenta un ús de codons ja de per sí deoptimitzat, amb un RCDI de 1.63, PV, amb un RCDI de 1.14, presenta un ús de codons molt més adaptat al de la cèl·lula hoste<sup>4</sup>. Aquesta diferència podria explicar-se pel fet de que l'HAV ha de competir amb la cèl·lula hoste pels tRNAs, motiu pel qual ha adoptat un ús de codons en certa manera antagònic al de la cèl·lula hoste. En canvi, PV no ha de competir amb la cèl·lula, ja que es capaç d'induir el silenciament de la síntesi de proteïnes en la cèl·lula hoste i, en aquestes condicions, un ús de codons optimitzat li seria més favorable. Durant l'adaptació a l'AMD, tan a 0.05 com a 0.2 µg/ml i durant la reversió a les condicions originals de 0.0 i 0.05 µg/ml respectivament, les poblacions experimentaven un augment en la seva infectivitat específica, el qual s'associava a un increment del diàmetre de les calbes, al igual que el descens de la infectivitat específica anava acompanyat d'una reducció del diàmetre de calbes en poliovirus<sup>55</sup>. En canvi, en les poblacions llargament adaptades, F0.05LA i F0.2LA, el retorn de la infectivitat específica als mateixos valors que presentava la L0 no

---

implicava un descens del diàmetre de les calbes que generaven aquestes poblacions. Aquesta falta de correlació entre la infectivitat específica i el diàmetre de les calbes, és podria explicar en funció dels canvis en l'ús de codons que experimentaven les poblacions F0.05LA i F0.2LA, els quals suposaven una certa optimització que permetria una velocitat de traducció més ràpida. Així doncs, aquest increment de la velocitat de traducció seria el responsable de la caiguda de la infectivitat específica, ja que donaria lloc a un plegament incorrecte de les proteïnes; d'altra banda, seria també el responsable del manteniment del diàmetre de les calbes, disminuint el temps d'elongació durant la traducció i, per tant, disminuint el temps necessari per concloure el cicle replicatiu del virus.

Tot plegat sembla indicar que la regulació de la cinètica de traducció, mitjançant la combinació de codons rars i abundants per controlar la cinètica de traducció contribuiria al plegament de les proteïnes i tindria un paper important en els primers estadis de l'adaptació al *shut off* induït per l'AMD. Tanmateix, en els estadis finals de l'adaptació entraria en joc la selecció traduccional, la qual permetria assolir una major velocitat de traducció però a canvi d'un mal plegament de les proteïnes de la càpsida, fet que causaria un descens de la infectivitat específica.

El control de l'expressió gènica té lloc a diferents nivells, des de la transcripció a la traducció i les modificacions post-traduccional, per tant, la concentració de proteïnes no només depèn dels nivells de mRNAs. La regulació de l'expressió gènica mitjançant la composició nucleotídica dels mRNAs contribueix al balanç final, tan a nivell quantitatiu<sup>61</sup> com qualitatiu<sup>21</sup>. Aquest mecanisme adquireix més importància si és té en compte que la desregulació de la traducció pot estar relacionada amb certes patologies, com càncer i desordres neurològics<sup>62</sup>, i que les mutacions sinònimes poden afectar els nivells de proteïna funcional plegada correctament alterant l'activitat fisiològica<sup>63</sup>.

L'HAV representa un model excel·lent de com la composició de nucleòtids *per se* pot jugar un paper essencial en la regulació de l'expressió gènica. Aquest treball ha

---

<sup>61</sup> Huang, T., Wan, S., Xu, Z., Zheng, Y., Feng, K-Y., Li, H-P., Kong, X. & Cai, Y-D. 2011. Analysis and prediction of translational rate based on sequence and functional features of the mRNA. PLoS One 6: e16036.

<sup>62</sup> Le Quesne, J.P., Spriggs, K.A., Bushell, M. & Willis, A.E. 2010. Dysregulation of protein synthesis and disease. J. Pathol. 220: 140-151.

<sup>63</sup> Sauna, Z.E. & Kimchi-Sarfaty, C. 2011. Understanding the contribution of synonymous mutation to human disease. Nat. Rev. Genet. 12: 683-691.

---

permès comprovar l'estreta relació entre el manteniment d'una combinació adequada de codons rars i freqüents i el *fitness* del virus. Tan és així que en l'intent d'obtenir una població de l'HAV amb una major capacitat de replicació *in vitro*, adaptant el virus en un ambient amb una major disponibilitat de tRNAs, el virus va respondre re-deoptimitzant el seu ús de codons, ja de per sí deoptimitzat, en respecte l'ús de codons de la cèl·lula. Actualment, la biologia sintètica s'ha emprat tan per a generar virus atenuats com per incrementar la producció de virus. Mitjançant aquesta tècnica s'han obtingut variants de poliovirus<sup>55,64</sup> i del virus influença<sup>65</sup> atenuades, les quals tenen un gran potencial com a candidats per a la producció de noves vacunes. La mateixa tècnica ha permès incrementar la producció *in vitro* d'antigen de parvovirus B19, mitjançant la optimització de l'ús de codons<sup>66</sup>. Tanmateix, la optimització de l'ús de codons de l'HAV per incrementar la seva capacitat de replicar en cultiu cel·lular no sembla factible, *a priori*, ja que caldria dissenyar el genoma per a que mantingués la combinació adequada de codons rars i freqüents en la regió de la càpsida, mantenint el patró d'atenuació i augmentant l'eficiència de la traducció. Això vol dir que en la regió de la càpsida caldria col·locar codons rars en els punts en que el virus necessita les parades del ribosoma i codons freqüents en la resta. I, en el cas de que s'aconseguís elucidar quin seria el disseny apropiat, encara caldria resoldre altres aspectes que poden limitar la replicació del virus en cultiu cel·lular, com són l'IRES ineficient<sup>67</sup> i el fet de que no indueixi *shut off* cel·lular<sup>68</sup>. Donada la complexitat d'aplicar la biologia sintètica per aconseguir variants de l'HAV amb una capacitat de replicació més alta, la selecció de poblacions ràpides mitjançant tècniques clàssiques és una alternativa.

---

<sup>64</sup> Coleman, J.R., Papamichail, D., Skiena, S., Fitcher, B., Wimmer, E. & Mueller, S. 2008. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science* 320: 1784-1787.

<sup>65</sup> Mueller, S., Coleman, J.R., Papamichail, D., Ward, C.B., Nimnual, A., Fitcher, B., Skiena, S. & Wimmer, E. 2010. Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design. *Nature Biotech.* 28: 723-726.

<sup>66</sup> Zhi, N., Wan, Z., Liu, X., Wong, S., Kim, D.J., Young, N.S. & Kajigaya, S. 2010. Codon optimization of Human Parvovirus B19 capsid genes greatly increases their expression in nonpermissive cells. *J.Virol.* 84: 13059-13062.

<sup>67</sup> Whetter, L.E., Day, S.P., Elroystein, O., Brown, E.A. & Lemon, S.M. 1994. Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J. Virol.* 68: 5253-5263.

<sup>68</sup> Borman, A.M. & Kean, K.M. 1997. Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology* 237: 129-136.

---

## 4.5. CONCLUSIONS

- Els canvis en la disponibilitat de tRNAs donen lloc a canvis de la càpsida que afecten a la seva estabilitat i a la seva funció.
- La pèrdua i la recuperació de la capacitat d'unió al receptor cel·lular, associades als canvis de conformació de la càpsida en condicions de silenciament parcial de la síntesi de proteïnes cel·lulars, determinen el *fitness* del virus en aquestes condicions.
- L'adaptació del virus a condicions d'alt silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lulars va acompanyada de canvis en el plegament de les proteïnes de la càpsida que li confereixen una major eficiència de desencapsidació.

- L'adaptació a condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lulars contribueix a l'augment de la infectivitat específica durant una primera fase.
- Més endavant aquesta adaptació comporta una nova caiguda de la infectivitat específica acompanyada d'un increment de la velocitat del cicle replicatiu.
- Els canvis que experimenten els virus per tal d'adaptar-se a les condicions de silenciament de la síntesi de proteïnes cel·lulars donen lloc a la selecció de poblacions que repliquen més ràpidament que la població parental.

## **5. ANNEX: ARTICLES**





### 5.1. ARTICLES DERIVATS DEL TREBALL DE TESI

Costafreda, M.I., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for quantification of Hepatitis A Virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3846-3855.

\*Pérez-Sautu, U., \*Costafreda, M.I., Caylà, J., Tortajada, C., Lite, J., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2011. Hepatitis A virus vaccine escape mutants and potential new serotype emergence. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 734-737.

Costafreda, M.I., Ribes, E., Franch, A., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2012. A single mutation in the glycoprotein A binding site of hepatitis A virus enhances virus clearance from the blood and results in a lower fitness variant. *Journal of Virology*, 86: 7887-7895.

Costafreda, M.I., Pérez-Rodríguez, F.J., D'Andrea, L., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R.M. Adaptation to host shutoff entails dynamic adjustments of codon usage critical for folding, stability and function of hepatitis A virus capsid. (Manuscript in preparation).

---

\*L'asteric indica que els autors van tenir la mateixa contribució.

---



Costafreda, M.I., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for quantification of Hepatitis A Virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3846-3855.



# Development, Evaluation, and Standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Quantification of Hepatitis A Virus in Clinical and Shellfish Samples

M. Isabel Costafreda, Albert Bosch,\* and Rosa M. Pintó

*Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 10 November 2005/Accepted 18 March 2006

**A standardized real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay has been developed for an accurate estimation of the number of genome copies of hepatitis A virus (HAV) in clinical and shellfish samples. Real-time procedures were based on the amplification of a fragment of the highly conserved 5' noncoding region and detection through an internal fluorescent probe, including TaqMan and beacon chemistries, in one- and two-step RT-PCR formats. The best performance in terms of sensitivity and reproducibility was achieved by a one-step TaqMan RT-PCR, with a sensitivity enabling the detection of 0.05 infectious unit and 10 copies of a single-stranded RNA (ssRNA) synthetic transcript. Standard reagents, such as a mengovirus strain and an ssRNA transcript, were employed as controls of nucleic acid extraction and RT-PCR, respectively. The test proved to be highly specific after a broad panel of enteric viruses was tested. Sequence alignment of target regions of the primers and probe proved them to be adequate for the quantification of all HAV genotypes. In addition, a quasispecies analysis of the mutant spectrum indicated that these regions are not prone to variability, thus confirming their robustness.**

Hepatitis A virus (HAV) infection is the leading cause of acute viral hepatitis throughout the world (11). The distribution patterns of hepatitis A in different geographical areas of the world are closely related to socioeconomic development (11). The endemicity is low in developed regions and high in underdeveloped countries. HAV infection is propagated mainly via the fecal-oral route, with person-to-person contact being the most common mode of transmission (18). Transmission through the parental route may also occur (19, 30). While in approximately 40% of the reported cases of hepatitis A the source of infection cannot be identified, waterborne (3) and food-borne (8, 25, 29) outbreaks of the disease have been reported. Within these categories, shellfish grown and harvested from waters receiving urban contaminants is a cause of large outbreaks of infectious hepatitis (10, 29). However, due to technical limitations, the roles of lightly contaminated blood products, water, and food in the burden of sporadic cases remain unknown. The development of sensitive, reliable techniques for the accurate quantification of HAV in these types of samples is required to ensure the safety of these products.

HAV is the prototype of the *Hepatovirus* genus within the *Picornaviridae* family. Its 7.5-kb single-stranded RNA (ssRNA) genome bears different regions: the 5' and 3' noncoding regions (NCRs); the P1 region, which encodes the structural proteins VP1, VP2, VP3, and a putative VP4; and the P2 and P3 regions, encoding nonstructural proteins associated with replication (11). Immunological evidence has determined the existence of a single serotype of HAV (16), although sequencing of the putative VP1/2A junction allows the differentiation of six genotypes (6, 27), based on nucleotide homologies lower

than 85%. However, all six genotypes are very closely related in the 5'NCR, which is the most conserved region of the genome due to its functional structure in the processes of translation and replication and a maximum nucleotide divergence of less than 5%. Consequently, the 5'NCR is a very convenient region for the design of an accurate real-time quantification technique.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells and virus.** The cytopathogenic pHM175 43c strain of HAV (a gift of T. Cromeans, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.) was used throughout this study. Virus replication in FRhK-4 cells was performed as previously described (2). Infectious mengovirus was obtained after transfection of a cDNA clone, pMC<sub>0</sub> (kindly provided by Ann Palmenberg, University of Wisconsin), into HeLa cells as previously described (17), and viral stocks were thereafter produced in the same cells. Additionally a broad collection of enteric viruses, including different members of the *Picornaviridae* family as well as rotavirus, norovirus, adenovirus, astrovirus, and hepatitis E virus, were tested for their amplification/detection by using the HAV-derived primers and probe.

**Selection of primers and probe.** Multiple-sequence alignments with the HAV sequences available at GenBank, including strains belonging to all human genotypes and subgenotypes so far described, were carried out with the ClustalW program (European Bioinformatics Institute). Two software programs, Primer Express from Applied Biosystems and Primer 3 from Stratagene, were used for the search for optimal primer and probe targets.

**Quasispecies analysis.** For the analysis of the quasispecies distribution, the pHM175 43c HAV strain was plaque purified three times in FRhK-4 cells as previously described (28). A biological clone (pHM175 43c P0) was serially passaged 50 times in the same cell line as previously described (2), and two populations, pHM175 43C P26 and pHM175 43C P50, were analyzed. RNA extracted from both viral populations was retrotranscribed to a cDNA with the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Roche) using the primer HAV295 (5'-TGCTAATCATGGAGTTGACC-3'), and the cDNA was copied and amplified with the thermostable *Pwo* polymerase (Roche) from *Pyrococcus woesei*, which has proofreading activity, by adding the primer HAV30BamHI (5'-CGGGATCCCTCTTGGAAGTCCATG-3') to the reaction mix. The latter primer incorporates a BamHI restriction site to facilitate its cloning into the pGEM-3Zf(+) vector. The synthesis of the cDNA was performed as previously described (28). Since the DNA fragments produced by *Pwo* polymerase are blunt ended, a single digestion with the BamHI enzyme was necessary for the am-

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, School of Biology, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Phone: (34) 934034620. Fax: (34) 934034629. E-mail: abosch@ub.edu.

plimer, while the plasmid vector was digested with both BamHI and HincII restriction enzymes. Digested DNAs were purified with the High Pure PCR product purification kit (Roche) according to the directions of the manufacturer. DNA ligations were performed overnight at 16°C using T4 DNA ligase (Roche), and transformant clones were screened by the standard white/blue galactosidase colorimetric reaction. Plasmid DNA from each of 100 clones was purified by using the Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega). Nucleotide sequencing was carried out in an ABI PRISM 377 automated DNA sequencer, the ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems), and vector-derived primers. All mutations were confirmed by sequencing both strands of DNA.

**Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) TaqMan assays.** The TaqMan probe was labeled with 6-carboxyfluorescein at the 5' end and was modified with a minor-groove binder at the 3' end. The real-time instruments used were the ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) and the Mx3000P (Stratagene). Kits from different companies, including Applied Biosystems, QIAGEN, Invitrogen, and Stratagene, were evaluated. However, the one-step Brilliant QRT-PCR Core Reagent kit from Stratagene and a two-step assay with a home-designed RT reaction combined with the FullVelocity QPCR master mix from Stratagene and the Mx3000P apparatus were employed for the final development of the technique. For the one-step reaction, the concentrations of primers, probe, and Mg<sup>2+</sup> were optimized at 0.6 μM, 0.25 μM, and 3 mM, respectively, in a final volume of 25 μl containing 5 μl of sample. The temperature-time program was as follows: 1 h at 50°C for the RT reaction, 10 min at 95°C as a hot start, and 45 cycles of 15 s at 95°C for denaturation, 1 min at 60°C for annealing, and 1 min at 70°C for extension. The fluorescence was measured at the end of each cycle. In the two-step assay the RT reaction was performed at 45°C for 1 h, using the Expand reverse transcriptase (Roche) with 0.5 μM of the reverse primer, 0.2 mM of nucleotides, and 5 mM of dithiothreitol in a final volume of 25 μl containing 10 μl of sample. The optimized composition for the PCR mix using the FullVelocity QPCR kit was 0.9 μM of the reverse primer, 0.5 μM of the forward primer, and 0.25 μM of probe in a final volume of 25 μl, in which 5 μl of the RNA template had been added. The amplification program consisted of preheating for 2 min at 95°C and 40 cycles of 10 s at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for annealing-extension. The fluorescence was read at the end of each cycle.

**Construction of an RNA standard.** A synthetic RNA molecule to be used as an internal standard was obtained by *in vitro* transcription of a cloned cDNA corresponding to the amplicon resulting from the RT-PCR with the reverse primer HAV240 (5'-GGAGAGCCCTGGAAGAAAG-3') and the forward primer HAV68BamHI (5'-TCACCGCCGTTTGCCTAGGCTATAGGCTAAA TTTCCCTTTGGATCCCCC3') of the pHM175 43c HAV strain. This amplicon corresponds to the one synthesized by the real-time techniques presented here but includes a newly generated BamHI restriction site in order to be distinguished from the viral amplicon in case of cross-contamination. The cloned amplicon was synthesized in an RT-PCR with the Expand reverse transcriptase enzyme and the *Pwo* DNA polymerase (Roche), which generates blunt-ended termini. The pGEM-3Zf(+) vector was digested with the enzyme HincII. After purification, both amplicon and vector were ligated overnight at 16°C using T4 DNA ligase. Ligation products were transformed in *Escherichia coli* DH5α, and transformant clones were screened by the standard white/blue galactosidase colorimetric reaction. Several positive clones were analyzed, and one containing the cDNA under the control of the SP6 polymerase was selected. The *in vitro* transcription was performed on linearized plasmid samples by using the Riboprobe *in vitro* transcription system SP6 kit (Promega), following the manufacturer's instructions. The concentration of RNA transcripts was measured by optical density at 260 nm (OD<sub>260</sub>) after their purification with the RNeasy Plant minikit (QIAGEN), following the recommended procedure.

**Mengovirus control.** The infectious clone mentioned above (pMC<sub>0</sub>), which lacks the poly(C) tract (17) in comparison to the wild-type mengovirus, gives rise to a mutant virus strain, vMC<sub>0</sub>, with growth properties identical to those of the wild-type virus but with an avirulent phenotype (17). vMC<sub>0</sub> may be thus considered a good candidate for controlling the process of nucleic acid extraction based on the fact that it belongs to the same *Picornaviridae* family as HAV. For this purpose a real-time TaqMan technique has been developed based on the amplification of a target sequence structurally related to that of HAV.

**Clinical samples, shellfish samples, and viral RNA extraction.** Clinical samples included stool and serum samples from patients affected by hepatitis A. Additionally, stool and serum samples from patients not affected by hepatitis A were experimentally contaminated with the pHM175 43c HAV strain. Stools were suspended (10%, wt/vol) in phosphate-buffered saline containing 2 M NaNO<sub>3</sub>, 1% bovine serum albumin (BSA) (fraction V), and 0.1% Triton X-100 (pH 7.2) and pelleted at 1,000 × g for 5 min, and nucleic acids were extracted from 150 μl of the resulting supernatant by using the RNeasy Plant minikit

(QIAGEN). Nucleic acids were purified from 150 μl of serum by using the NucleoSpin RNA virus (Macherey-Nagel).

Frozen samples of clams directly associated with an outbreak of hepatitis A (29) were analyzed. Processing of shellfish was performed essentially by the method described by Atmar et al. (1). Briefly, the stomachs and digestive diverticula were dissected from the clams and subjected to high-speed homogenization (Sorval OCI Omni mixer; Omni International, Waterbury, Conn.). Viruses were extracted from the homogenates (corresponding to 1.5 g of shellfish tissue) by sequential extractions with chloroform-butanol and Cat-Floc T (Calgon Corp., Elwood, Pa.) and concentrated by polyethylene glycol precipitation. Nucleic acids from these concentrates were extracted with the RNeasy Plant minikit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions.

RNA extraction from viruses harvested from cell cultures was performed with the NucleoSpin RNA virus (Macherey-Nagel).

## RESULTS

**Primer-probe set selection.** The development of an optimal real-time RT-PCR methodology relies on the proper selection of the target sequences for primers and probe annealing. Despite the existence of different software programs to design these optimized primers and oligoprobes, the level of genetic conservation among different viral strains is not accurately analyzed, although it probably is as important as the nucleotide composition for an efficient quantitation. In this context, the selection of a highly conserved primer-probe set should be the first step in the design of a real-time RT-PCR for viral quantitation.

The most conserved region of HAV corresponds to the 5'NCR, being the regions spanning positions 66 to 95 and 227 to 262 (numbering corresponds to strain HM175, accession number M14707) (11). Although some HAV strains include some deletions in the region from position 99 to 207, it is otherwise quite well conserved between nucleotides 150 and 190. Taking this information into account, a standard RT-PCR–Southern blot was previously designed (29) based on the reverse primer HAV240 (5'-GGAGAGCCCTGGAAGAAA G-3'), the forward primer HAV68 (5'-TCACCGCCGTTTGC CTAG-3'), and the probe HAV150 (5'-TTAATTCCTGCAG GTTCAGG-3') and proved to be successful with both serum and shellfish samples.

The adaptation of this technique to the real-time format could be straightforward or intricate depending on the software used for the design of primers and probe. The sequences for the reverse primer and the probe suggested by the Primer 3 software mostly matched the HAV240 and HAV150 regions. In contrast, the sequence advised for the forward primer was located exactly 20 nucleotides to the 5' end of the HAV68 primer, probably making the length of the amplicon too long for an efficient assay. The Primer Express software suggested a complete adjustment for the primer sequences with no change of the probe sequence. However, the proposed regions were not highly conserved among the HAV sequences available in GenBank in comparison to the HAV240 and HAV68 primers. In the HAV240 primer region, the single mutation detected was a point insertion in genotype III (Fig. 1), while in the HAV68 primer region, no mutations were observed among the available consensus sequences of the five human genotypes (Fig. 1). In contrast, six mutations were detected in each of the regions recommended for the reverse HAV214 (5'-AAGCGT GAAATGAGTGTTCCTTATAGA-3') and forward HAV121 (5'-TCCTATCCCTTTGTTTTGCTTGTA-3') primers. Most

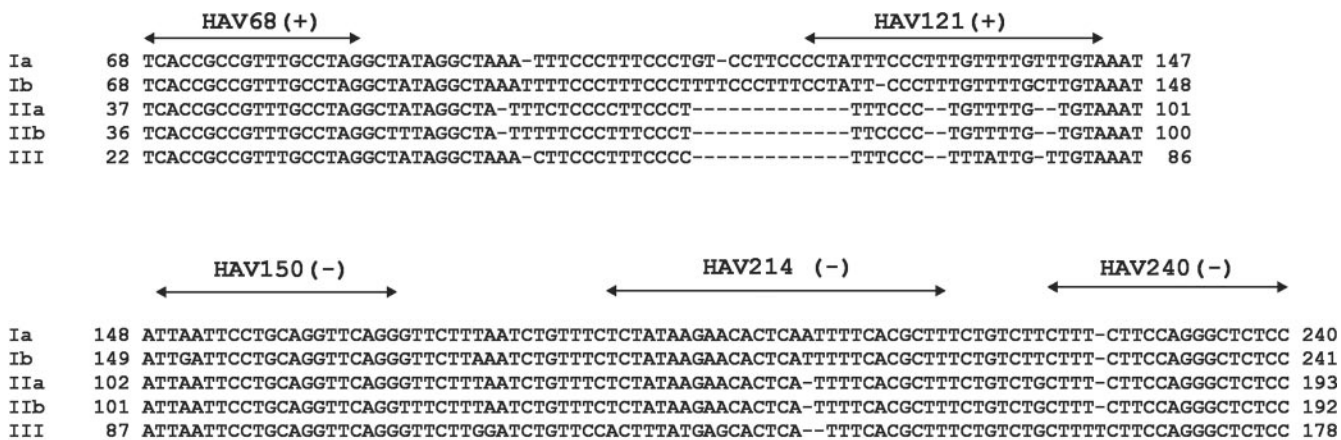


FIG. 1. Consensus sequence alignment of human HAV genotypes in the amplified region, including the primer and probe target sequences. Nucleotide numbering is according to the HM-175 strain. Terminal 5' end nucleotides in the available sequences from genotypes II and III are missing.

important, however, was the occurrence of important deletions in genotypes IIa, IIb, and III in the HAV121 primer region.

Concerning the probe target, a negative-strand oligoprobe, HAV150(-) (5'CCTGAACCTGCAGGAATTA3'), was synthesized in order to increase the C/G ratio. Finally, the potential loss of sensitivity due to the extended length of the amplified fragment could be amended by modifying the amplification program, as discussed below.

**Quasispecies analysis of the primer-probe annealing regions.** To further analyze the degree of variability of the target sequences, an analysis of the quasispecies distribution of the pHM175 43c strain of HAV was undertaken. One hundred molecular clones were analyzed at each of two passages (passage 26 [P26] and P50) of replication in the FrhK4 cell line. Regarding the target sequences for the HAV240 reverse primer, no mutations were detected at either P26 or P50. In contrast, one point mutation was observed at P50 in the region of the suggested primer HAV214. The numbers of mutations found in the forward primer regions were one at P50 in the HAV68 target sequence and two at P26 in the HAV121 region. Finally, the target region for the probe showed a point mutation at P50.

**Specificity of the chosen primer-probe set.** In order to confirm the specific detection of HAV, a wide variety of enteric viruses were tested for their amplification/detection by using the HAV240 and HAV68/HAV150 primer-probe set. The assayed viruses included 10 different picornaviruses: *Poliovirus* (serotype 1 vaccine strain), *Human Enterovirus B* (echovirus 1, echovirus 11, echovirus 30, and coxsackievirus B5), *Human Enterovirus C* (coxsackievirus A24), *Human Enterovirus D* (enterovirus 70), *Bovine Enterovirus*, *Porcine teschovirus* (porcine enterovirus 1), and *Encephalomyocarditis virus*. Other enteric viruses, such as *Hepatitis E virus*, human and porcine *Rotavirus* (group A), *Norovirus* (Norwalk-like virus), *Mamastrovirus* (human astrovirus type 1), and *Human adenovirus F* (enteric adenovirus type 40), were also employed. As expected, none of the tested virus gave positive results at either high concentrations ( $10^6$  to  $10^8$  50% tissue culture infective doses [TCID<sub>50</sub>]/ml or undiluted 10% fecal suspensions) or low concentrations ( $10^4$  50% TCID<sub>50</sub>/ml or 1/10 dilutions of 10% fecal suspen-

sions). The HAV strain pHM175 43c, belonging to genotype IB, was used as a positive control.

#### Best standard molecules for generation of standard curves.

One of the crucial steps in a real-time quantification is the choice of the most proper molecule for the generation of the standard curve. There are three candidates that are able to be amplified and detected by means of the selected primers and probe and whose concentration may be determined: a double-stranded DNA (dsDNA) molecule corresponding to the actual amplicon, an ssRNA molecule obtained after in vitro transcription of a cloned cDNA corresponding to the amplicon, and the actual virus (pHM175 43c strain) genome. The concentration of each of these molecules was estimated by determining the OD<sub>260</sub> in the two former cases and by infectivity in the third case. In this last case, however, the final concentration was refined by applying a factor of  $\times 60$  to the infectious titer in order to achieve a reliable number of physical genomes (7, 13). As an example, a representative set of standard curves for a one-step TaqMan reaction is depicted in Fig. 2. The estimated regression lines for the dsDNA, ssRNA, and viral genome molecules in distilled water were  $y = 38.56 - 3.46x$  ( $r^2 = 0.999$ ),  $y = 43.75 - 3.50x$  ( $r^2 = 0.999$ ), and  $y = 38.13 - 3.32x$  ( $r^2 = 0.999$ ), respectively (Fig. 2). Although the slopes of the three curves are similar, the intercept value in the case of the ssRNA molecule is significantly higher. From these results it is advisable to recommend the use of either the dsDNA molecule or the actual viral genome for the construction of the standard curve. Using the pHM175 43c strain, a linear range of detection from 1 physical particle/reaction or 200 physical particles/ml to  $10^5$  physical particles/reaction or  $2 \times 10^7$  physical particles/ml was achieved. With the dsDNA molecule, the upper limit was extended to at least  $2 \times 10^{10}$  molecules/ml.

#### Limits of detection for different real-time RT-PCR formats.

Two real-time RT-PCR formats based on the detection of amplicons through two different fluorogenic chemistries were assayed for the development of an HAV quantification technique. A TaqMan probe on the one hand and a beacon probe on the other were assayed. Additionally, in the case of the TaqMan probe, several one-step and two-step formats were also evaluated. In each case standard curves were drawn using



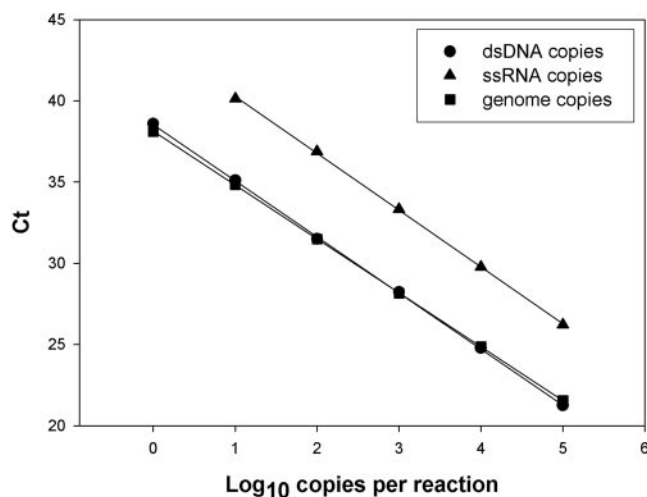


FIG. 2. Standard curves for the HAV real-time TaqMan RT-PCR assay. Three molecules were employed: a dsDNA, an ssRNA, and the strain pHM175 43c viral genome. The concentrations of the synthetic molecules were estimated by determining the  $OD_{260}$ . Virus titer was determined by infectivity, and physical genomes were estimated by applying a factor of  $\times 60$  to the infectious titer (7, 13).

the ssRNA molecule, the dsDNA amplicon, and the actual virus. Once optimized (i.e., adjusting primers and probe concentration for each kit), all of them gave very good detection limits in both one- and two-step formats (10 ssRNA molecules, 1 viral RNA molecule, and 0.05 infectious virus per reaction), with the sole exception of the Applied Biosystems one-step kit, which showed a significantly lower sensitivity. However the beacon probe format was neither as sensitive nor as reproducible as the TaqMan probe format (10 ssRNA molecules, 10 viral RNA molecules, and 0.5 infectious virus per reaction). Since the use of a two-step format did not increase the sensitivity of detection, the one-step format is recommended for less time-consuming and more convenient manipulation, thus reducing cross-contamination risks.

**Best standard molecules for accurate quantification.** Another set of controls are required for reliable quantifications of the samples. These controls, added at known concentrations to the samples, and so-called internal controls should be able to trace both the efficiency of the nucleic acid extraction and the efficiency of the RT-PCR. The ssRNA molecule may be a good candidate for the last step, provided that an RNase-free nucleic acid suspension is achieved. The actual virus, although by itself the best control for the extraction efficiency, is hardly useful since it is indistinguishable from the potential naturally occurring HAV present in the same samples. Alternatively, a model virus should be used for this purpose, such as the mengovirus.

A one-step TaqMan real-time RT-PCR based on the amplification of a related 5'NCR fragment from the mengovirus genome was developed and optimized for the working conditions of the HAV assay, in order that it could be quantified in the same plate. The sensitivity of this technique was 100 physical particles/reaction, with a linear range of from  $2.0 \times 10^2$  to  $2.0 \times 10^9$  particles/ml.

A schematic representation of the whole proposed control process is shown in Fig. 3. This approach consists of the addi-

tion of a known concentration of mengovirus to the sample to be analyzed, before performing the virus nucleic acids extraction. Once the extraction is performed, three separate subsamples of the nucleic acid suspension are analyzed. To one subsample a known concentration of the ssRNA control is added. With two of the subsamples, including the one with the ssRNA control, quantification of HAV is performed. With the third subsample, quantification of mengovirus is assessed. Two values will be obtained for HAV, corresponding to the level of virus present in the sample on the one hand and to the addition of the HAV genomes plus the ssRNA molecules on the other. At this point the efficiency of the RT-PCR may be estimated by comparing the number of ssRNA molecules detected (by subtracting the number of HAV genomes quantified in one subsample from the sum of HAV plus ssRNA in the other subsample) with the number of ssRNA molecules added. Finally, from the third subsample, the efficiency of the nucleic acid extraction may be calculated by comparing the numbers of detected and added mengovirus genomes.

Altogether, an accurate estimation of the numbers of HAV genomes present in a given sample may be achieved. However, an important issue must be solved before conducting the whole test: the determination of the optimal amount of mengovirus to be added. Three different concentrations of mengovirus were tested in serum, stool suspensions and shellfish digestive tissues (Table 1), ranging from  $8.6 \times 10^6$  to  $8.6 \times 10^2$  infectious units/ml in the two former cases and from  $1.0 \times 10^6$  to  $1.0 \times 10^2$  infectious units/g of digestive tissues in the third type of sample. Each spiked sample was extracted twice, and each nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR. Although a certain level of variability was observed in all types of samples, this variability was more related to the nature of the particular samples rather than to the concentration of viruses added. In view of the low viral nucleic acid recovery efficiencies (Table 1), mostly in shellfish samples, concentrations of mengovirus of around  $10^5$  infectious units/ml were selected for clinical samples (serum and stool), while  $10^6$  infectious units/g were employed for shellfish samples. In an attempt to eliminate the possibility of different behaviors of mengovirus and HAV during the extraction procedures, a comparative experiment was performed in which the pHM175 43c strain of HAV was added at different concentrations to the different types of samples (Table 2). The extraction efficiency was similar for both viruses, thus validating the use of the mengovirus control.

Regarding the number of ssRNA molecules, it was decided to add a rather high concentration (around  $10^8$  molecules/ml) in order to minimize potential competition in case of an HAV-positive sample.

This complete approach was applied to the quantification of experimentally contaminated clinical and shellfish samples as well as to naturally contaminated clinical and shellfish samples.

**Quantification of HAV in clinical samples.** This complete approach was applied for the quantification of HAV in clinical samples from patients suffering from acute hepatitis and diagnosed positive for hepatitis A by means of immunoglobulin M positivity. Only samples belonging to genotypes IA (sporadic cases) and IB (shellfish-borne outbreak) were available. In the latter case, the quantitative results (Table 3) revealed a high and long lasting viremia, with the peak occurring at two weeks after

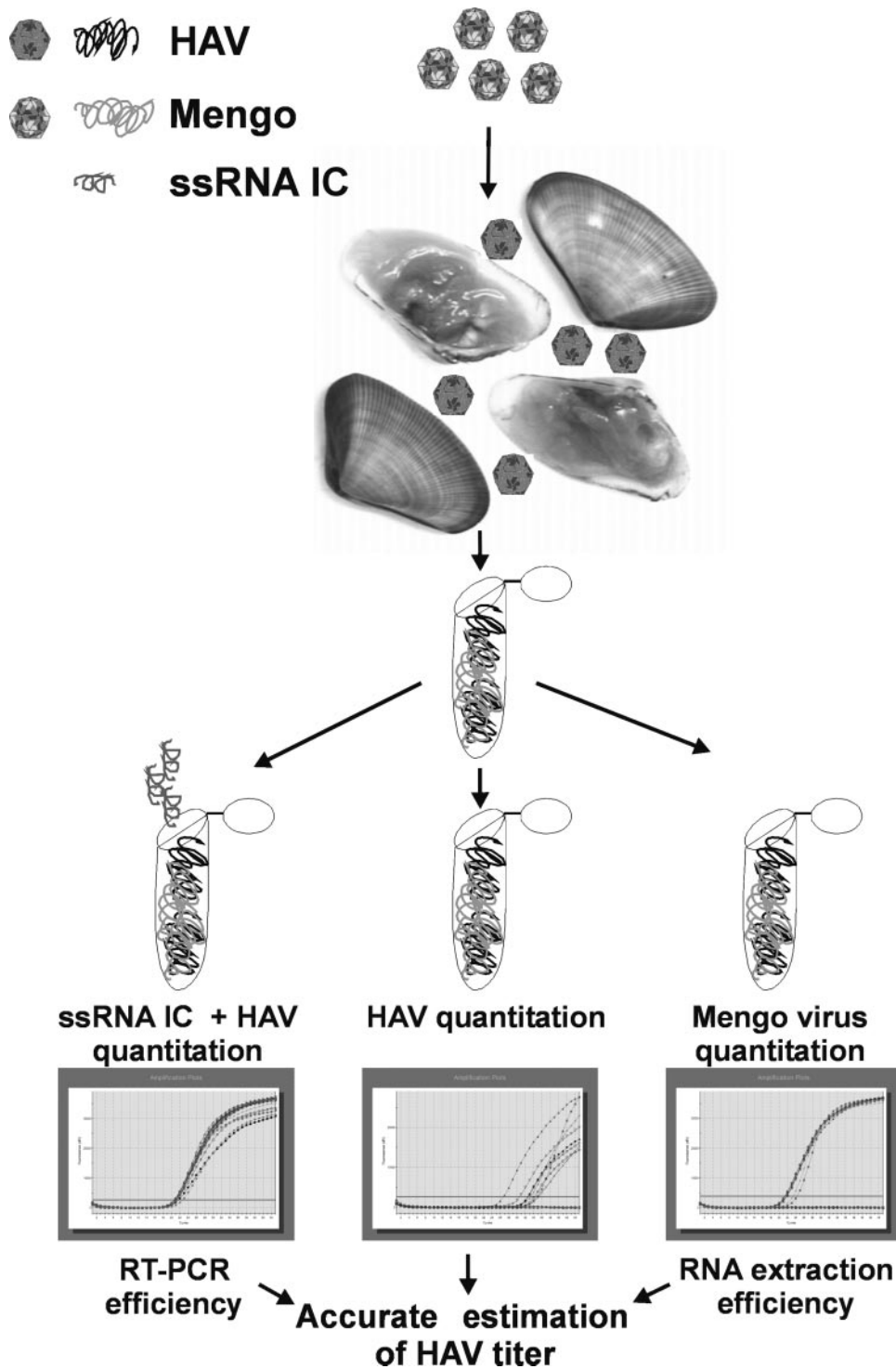


FIG. 3. Proposed standardized procedure for an accurate estimation of HAV genome copies in food or clinical samples. IC, internal control.

the onset of symptoms (Fig. 4). Although for genotype IA samples no information was available about the time that the sera was obtained, if it is assumed that the most probable time is around 1 to 2 weeks, then no significant differences in the number of genome copies per ml was observed with regard to genotype IB,

with the exception of sample 2. This sample showed a significantly higher number of HAV genomes, clearly exceeding even the average detected at 2 weeks postsymptoms. However, it should be mentioned that this sample was from a human immunodeficiency virus-positive patient.

TABLE 1. Validation of mengovirus and ssRNA internal control as standards for determination of nucleic acid extraction and RT-PCR efficiencies, respectively

Sample	Nucleic acid extraction			RT-PCR			
	Spiked mengovirus <sup>a</sup>	Recovered mengovirus <sup>b</sup> (mean ± SD)	Efficiency (%, mean ± SD)	Spiked ssRNA <sup>c</sup>	Recovered ssRNA <sup>d</sup> (mean ± SD)	Efficiency (%, mean ± SD)	
Serum	1	8.6 × 10 <sup>6</sup>	(1.1 ± 1.4) × 10 <sup>7</sup>	100.0 ± 0.0	1.2 × 10 <sup>8</sup>	(2.5 ± 1.0) × 10 <sup>8</sup>	100.0 ± 0.0
		8.6 × 10 <sup>4</sup>	(3.6 ± 1.0) × 10 <sup>5</sup>	100.0 ± 0.0	1.2 × 10 <sup>8</sup>	(2.0 ± 0.6) × 10 <sup>8</sup>	100.0 ± 0.0
	2	8.6 × 10 <sup>2</sup>	(3.6 ± 2.3) × 10 <sup>3</sup>	100.0 ± 0.0	1.2 × 10 <sup>8</sup>	(2.1 ± 1.3) × 10 <sup>8</sup>	100.0 ± 0.0
		8.6 × 10 <sup>6</sup>	(1.1 ± 3.7) × 10 <sup>6</sup>	12.3 ± 4.4	1.6 × 10 <sup>8</sup>	(1.9 ± 0.5) × 10 <sup>8</sup>	100.0 ± 0.0
		8.6 × 10 <sup>4</sup>	(2.5 ± 1.6) × 10 <sup>4</sup>	28.8 ± 19.0	1.6 × 10 <sup>8</sup>	(2.8 ± 0.4) × 10 <sup>8</sup>	100.0 ± 0.0
		8.6 × 10 <sup>2</sup>	(2.6 ± 1.9) × 10 <sup>2</sup>	30.7 ± 21.7	1.6 × 10 <sup>8</sup>	(1.6 ± 0.3) × 10 <sup>8</sup>	93.5 ± 9.2
Stool	1	8.6 × 10 <sup>6</sup>	(3.4 ± 0.4) × 10 <sup>6</sup>	39.5 ± 4.9	1.2 × 10 <sup>8</sup>	(2.2 ± 1.7) × 10 <sup>7</sup>	18.1 ± 14.3
		8.6 × 10 <sup>4</sup>	(5.1 ± 2.2) × 10 <sup>4</sup>	59.0 ± 25.4	1.2 × 10 <sup>8</sup>	(9.6 ± 0.2) × 10 <sup>6</sup>	8.3 ± 1.8
	2	8.6 × 10 <sup>2</sup>	(4.3 ± 2.3) × 10 <sup>2</sup>	49.3 ± 25.9	1.2 × 10 <sup>8</sup>	(1.5 ± 0.8) × 10 <sup>7</sup>	12.3 ± 6.6
		8.6 × 10 <sup>6</sup>	(3.0 ± 1.3) × 10 <sup>6</sup>	34.6 ± 15.3	1.6 × 10 <sup>8</sup>	(3.1 ± 0.3) × 10 <sup>8</sup>	100.0 ± 0.0
		8.6 × 10 <sup>4</sup>	(3.5 ± 6.6) × 10 <sup>3</sup>	40.0 ± 7.6	1.6 × 10 <sup>8</sup>	(3.4 ± 0.8) × 10 <sup>8</sup>	100.0 ± 0.0
		8.6 × 10 <sup>2</sup>	(9.3 ± 10.0) × 10 <sup>2</sup>	65.7 ± 48.4	1.6 × 10 <sup>8</sup>	(1.6 ± 0.6) × 10 <sup>8</sup>	100.0 ± 0.0
Shellfish	1.0 × 10 <sup>6</sup>	(9.1 ± 9.2) × 10 <sup>2</sup>	0.1 ± 0.1	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.3 ± 0.4 × 10 <sup>8</sup>	84.3 ± 21.4	
	1.0 × 10 <sup>4</sup>	(2.2 ± 0.7) × 10 <sup>1</sup>	0.2 ± 0.1	1.5 × 10 <sup>8</sup>	(1.2 ± 0.3) × 10 <sup>8</sup>	79.9 ± 17.5	
	1.0 × 10 <sup>2</sup>	ND <sup>e</sup>		1.5 × 10 <sup>8</sup>	(1.6 ± 0.4) × 10 <sup>8</sup>	93.2 ± 6.7	

<sup>a</sup> The inocula added are expressed as TCID<sub>50</sub>/ml for sera and stool suspensions and as TCID<sub>50</sub>/g of hepatopancreas for shellfish.

<sup>b</sup> Each spiked sample was extracted twice, and each nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR with a standard curve made by means of mengovirus infectious units.

<sup>c</sup> The inocula added are expressed as the number of molecules of the ssRNA internal control per ml of nucleic acid suspension.

<sup>d</sup> Each spiked nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR using a standard curve made by means of HAV-derived ssRNA molecules estimated from the OD<sub>260</sub> readings.

<sup>e</sup> ND, not detected.

Regarding the titers detected in feces, the results revealed numbers higher than expected (Table 4), with a peak again at around 2 weeks after the onset of symptoms (Fig. 4).

**Quantification of HAV in shellfish samples.** The same approach was applied for the quantification of the HAV present in the shellfish samples associated with the above-mentioned outbreak (Table 5). Three out of seven tested samples could be quantified, showing estimated titers ranging from 7.5 × 10<sup>3</sup> to 7.3 × 10<sup>5</sup> HAV genomes per gram of digestive tissues, or around 1 × 10<sup>3</sup> to 1 × 10<sup>5</sup> per g of clam. The rest of the samples were either negative for viruses or contained virus

levels below the detection limit, which strongly depends on the efficiency of the extraction procedure.

### DISCUSSION

In the present work a standardized methodology for an accurate quantification of HAV in clinical and food samples is presented. The general approach is based on the use of several controls to measure the efficiency of the critical steps for quantification: the nucleic acid extraction and the RT-PCRs. The first involves the use of a nonpathogenic virus with structural

TABLE 2. Comparison of infectious mengovirus and infectious HAV in nucleic acid extraction

Sample	Mengovirus			HAV		
	Spiked <sup>a</sup>	Recovered <sup>b</sup>	Nucleic acid extraction efficiency (%)	Spiked <sup>c</sup>	Recovered <sup>d</sup>	Nucleic acid extraction efficiency (%)
Serum	8.6 × 10 <sup>6</sup>	1.3 × 10 <sup>5</sup>	1.5	2.0 × 10 <sup>6</sup>	1.1 × 10 <sup>5</sup>	5.5
	8.6 × 10 <sup>4</sup>	1.0 × 10 <sup>4</sup>	11.6	2.0 × 10 <sup>4</sup>	6.7 × 10 <sup>2</sup>	3.3
Stool	8.6 × 10 <sup>6</sup>	2.1 × 10 <sup>6</sup>	23.8	2.0 × 10 <sup>6</sup>	2.8 × 10 <sup>5</sup>	14.0
	8.6 × 10 <sup>4</sup>	3.0 × 10 <sup>4</sup>	34.6	2.0 × 10 <sup>4</sup>	1.4 × 10 <sup>3</sup>	7.0
Shellfish	1.0 × 10 <sup>6</sup>	1.6 × 10 <sup>3</sup>	0.2	2.0 × 10 <sup>6</sup>	4.0 × 10 <sup>3</sup>	0.2
	1.0 × 10 <sup>4</sup>	2.7 × 10 <sup>1</sup>	0.3	2.0 × 10 <sup>4</sup>	3.3 × 10 <sup>1</sup>	0.2

<sup>a</sup> The inocula added are expressed as TCID<sub>50</sub>/ml for sera and stool suspensions and as TCID<sub>50</sub>/g of hepatopancreas for shellfish.

<sup>b</sup> Each spiked sample was extracted, and the nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR using a standard curve made by means of mengovirus infectious units.

<sup>c</sup> The pHM175 43c strain of HAV was added, and virus titers are expressed as TCID<sub>50</sub>/ml for sera and stool suspensions and as TCID<sub>50</sub>/g for shellfish.

<sup>d</sup> Each spiked sample was extracted, and the nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR using a standard curve made by means of HAV infectious units.

TABLE 3. Quantification of HAV in serum samples from patients infected with either genotype IA or IB

Genotype <sup>a</sup>	Sample (wk <sup>b</sup> )	Nucleic acid extraction			RT-PCR			HAV titer <sup>g</sup>	
		Spiked mengovirus <sup>c</sup>	Recovered mengovirus <sup>d</sup>	Efficiency (%)	Spiked ssRNA <sup>e</sup>	Recovered ssRNA <sup>f</sup>	Efficiency (%)	Crude sample	Final estimate
IA	1	$1.3 \times 10^5$	$3.2 \times 10^4$	24.7	$1.5 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$	100.0	$1.6 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$
	2	$1.3 \times 10^5$	$5.4 \times 10^4$	41.9	$1.5 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	94.1	$3.2 \times 10^8$	$7.6 \times 10^8$
	3	$1.3 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$	43.5	$1.5 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	98.2	$3.2 \times 10^7$	$7.3 \times 10^7$
IB	1 (1)	$1.3 \times 10^5$	$6.6 \times 10^4$	50.0	$1.5 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$	100.0	$4.8 \times 10^5$	$9.6 \times 10^5$
	2 (1)	$1.3 \times 10^5$	$1.7 \times 10^4$	13.0	$1.5 \times 10^8$	$2.6 \times 10^8$	100.0	$1.4 \times 10^5$	$1.1 \times 10^6$
	3 (2)	$1.3 \times 10^5$	$6.6 \times 10^3$	5.0	$1.5 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	100.0	$1.9 \times 10^6$	$3.8 \times 10^7$
	4 (2)	$1.3 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$	11.5	$1.5 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	78.4	$9.2 \times 10^5$	$8.0 \times 10^6$
	5 (3)	$1.3 \times 10^5$	$1.7 \times 10^4$	13.0	$1.5 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	94.1	$7.4 \times 10^4$	$5.6 \times 10^5$
	6 (3)	$1.3 \times 10^5$	$3.8 \times 10^4$	28.5	$1.5 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	100.0	$6.8 \times 10^4$	$2.4 \times 10^5$
	7 (6)	$1.3 \times 10^5$	$8.6 \times 10^3$	6.5	$1.5 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	94.1	$3.1 \times 10^3$	$4.8 \times 10^4$
	8 (6)	$1.3 \times 10^5$	$6.3 \times 10^4$	48.5	$1.5 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$	100.0	$2.6 \times 10^4$	$5.4 \times 10^4$

<sup>a</sup> IB samples are from different patients from an outbreak.

<sup>b</sup> Week after the onset of symptoms at which the samples were taken.

<sup>c</sup> The inocula added are expressed as TCID<sub>50</sub>/ml of serum.

<sup>d</sup> Each spiked sample was extracted, and the nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR using a standard curve made by means of mengovirus infectious units.

<sup>e</sup> The inocula added are expressed as the number of molecules of the ssRNA internal control per ml of nucleic acid suspension.

<sup>f</sup> Each spiked nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR using a standard curve made by means of HAV-derived ssRNA molecules estimated from the OD<sub>260</sub> readings.

<sup>g</sup> The titer is expressed as the number of genome copies per ml of serum.

characteristics similar to those of the target virus. Since HAV belongs to the *Picornaviridae* family, another member of the same family may be used to validate the behavior of HAV during the nucleic acid extraction procedures. Encephalomyocarditis virus has been proposed as a model for HAV in validation studies of HAV removal in blood product manufacturing by several agencies, such as the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/bwp/026995en.pdf>) and the U.S. Food and Drug Administration (<http://www.fda.gov/cber/sba/igivbax042705S.pdf>). However, the use of this virus as is hampered by its potential pathogenicity in several animals, including primates (4) and even humans (15). Mengovirus is serologically indistinguishable from encephalomyocarditis virus and is nonpathogenic for humans, although it may infect several animals. It has

been previously demonstrated that the removal of the poly(C) tract from the 5'NCR of the wild-type mengovirus gives rise to a mutant strain, i.e., mengovirus vMC<sub>0</sub>, with the same growth properties but with no pathogenic capacity (17). The use of mengovirus strain vMC<sub>0</sub> as a control for HAV is proposed, since it represents a phenotypic variant of mengovirus which is avirulent in all animal species (murine and nonmurine) so far tested and is used as a vaccine for a wide variety of hosts, including baboons, macaques, and domestic pigs (21). In addition to its nonpathogenic phenotype, another important issue for the choice of this virus is the structure of the 5'NCR of its genomic RNA. The real-time TaqMan RT-PCR developed in the present work for the quantification of HAV is based on the amplification of a fragment of the 5'NCR. This region is the most conserved of the HAV genome, and of any other picornavirus, and consequently is a good choice for the development of quantification techniques. The RNA sequences that constitute the 5'NCR fold into complex multidomain structures, which are involved in both translation (9) and replication (23). The high conservation of the 5'NCR in all picornaviruses thus relies on its structural function. In fact, phylogenetic analyses of the 5'NCR of picornavirus reveal extensive structure-conserving substitutions within predicted stems, a high degree of sequence conservation in predicted loops, and clustering of regions with sequence divergence in spacer regions between domains (24). In particular, the chosen target region for HAV spans stem-loop domains II and III of the 5'NCR and thus contains an upstream internal ribosome entry site (IRES) region and the 5' boundary of the IRES. Three different types of IRES have been defined among picornaviruses: type I in entero- and rhinoviruses; type II in cardio-, aphtho-, and paracheviruses; and type III in hepatoviruses (9). Mengovirus is a cardiovirus, and thus belongs to type II, which appears to be more closely related to type III IRES than type I is. In this context, and having in mind that the quantification of the

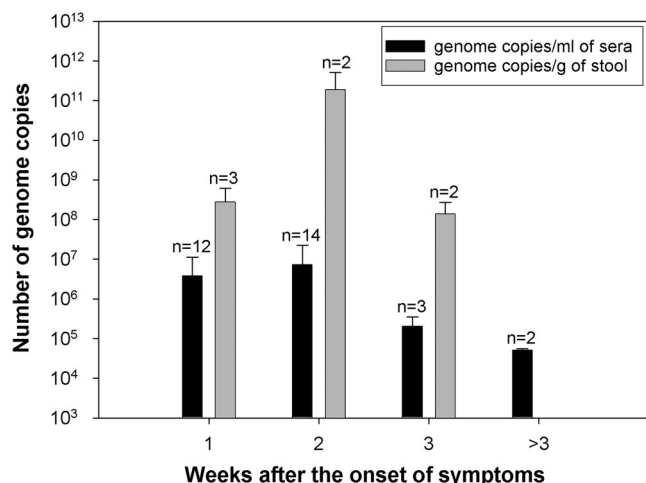


FIG. 4. Time course for HAV genome copies in sera and feces from patients of a shellfish-borne outbreak.

TABLE 4. Quantification of HAV in fecal samples from patients with acute hepatitis A from a genotype IB outbreak

Sample (wk <sup>a</sup> )	Nucleic acid extraction			RT-PCR			HAV titer <sup>f</sup>	
	Spiked mengovirus <sup>b</sup>	Recovered mengovirus <sup>c</sup>	Efficiency (%)	Spiked ssRNA <sup>d</sup>	Recovered ssRNA <sup>e</sup>	Efficiency (%)	Crude sample	Final estimate
1 (1)	1.3 × 10 <sup>5</sup>	2.8 × 10 <sup>4</sup>	21.0	1.5 × 10 <sup>8</sup>	9.6 × 10 <sup>7</sup>	64.9	1.1 × 10 <sup>7</sup>	5.1 × 10 <sup>8</sup>
2 (1)	1.3 × 10 <sup>5</sup>	2.7 × 10 <sup>3</sup>	2.1	1.5 × 10 <sup>8</sup>	5.2 × 10 <sup>7</sup>	35.1	9.2 × 10 <sup>5</sup>	4.4 × 10 <sup>7</sup>
3 (1)	1.3 × 10 <sup>5</sup>	3.5 × 10 <sup>4</sup>	26.5	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.3 × 10 <sup>7</sup>	8.6	3.6 × 10 <sup>5</sup>	4.2 × 10 <sup>6</sup>
4 (2)	1.3 × 10 <sup>5</sup>	8.0 × 10 <sup>3</sup>	6.0	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.0 × 10 <sup>6</sup>	1.0	2.2 × 10 <sup>8</sup>	2.2 × 10 <sup>10</sup>
5 (2)	1.3 × 10 <sup>5</sup>	1.3 × 10 <sup>3</sup>	1.0	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.1 × 10 <sup>8</sup>	70.3	5.6 × 10 <sup>9</sup>	5.6 × 10 <sup>11</sup>
6 (3)	1.3 × 10 <sup>5</sup>	2.8 × 10 <sup>3</sup>	2.1	1.5 × 10 <sup>8</sup>	3.0 × 10 <sup>7</sup>	21.6	5.6 × 10 <sup>6</sup>	2.7 × 10 <sup>8</sup>
7 (3)	1.3 × 10 <sup>5</sup>	5.1 × 10 <sup>4</sup>	38.0	1.5 × 10 <sup>8</sup>	9.6 × 10 <sup>6</sup>	6.5	4.6 × 10 <sup>5</sup>	7.1 × 10 <sup>6</sup>

<sup>a</sup> Week after the onset of symptoms at which the samples were taken.

<sup>b</sup> The inocula added are expressed as TCID<sub>50</sub>/ml of fecal suspension.

<sup>c</sup> Each spiked sample was extracted, and the nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR using a standard curve made by means of mengovirus infectious units.

<sup>d</sup> The inocula added are expressed as the number of molecules of the ssRNA internal control per ml of nucleic acid suspension.

<sup>e</sup> Each spiked nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR using a standard curve made by means of HAV-derived ssRNA molecules estimated from the OD<sub>260</sub> readings.

<sup>f</sup> The titer is expressed as the number of genome copies per g of feces.

control virus and HAV should be performed in the same plate and obviously under the same program conditions, it appears again reasonable to use mengovirus as a control. The target region selected for the quantification of mengovirus was related as much as possible to that of HAV in terms of structure, length, and base composition. However, since the IRES types are indeed different, the sensitivity achieved for the mengovirus quantification was significantly lower than that for HAV. The importance of this lower sensitivity is, however, negligible due to the fact that only a comparison between the number of viruses added and recovered is sought. To further confirm the validity of the mengovirus vMC<sub>0</sub> strain as a control, a comparison analysis with respect to the behavior of the pHM175 43c HAV strain was performed, and the results demonstrated similar patterns for the two viruses in serum, fecal, and shellfish samples.

A requirement for addition of some kind of internal controls for the follow-up of the molecular reactions has been suggested by many authors (12, 22). The control for an RT-PCR should rely on an ssRNA molecule that corresponds to the viral target and is thus amplifiable with the same pair of primers under exactly the same conditions and with the same effi-

ciency. Cloning the pHM175 43c amplicon under the control of a strong promoter, i.e., the SP6 promoter, allows the synthesis of huge amounts of RNA transcripts, which can be comparatively quantified before and after being added to the sample under analysis and thus can act as an internal control for the RT-PCR. Finally, a third step that should be carefully controlled is the choice of the best standard molecule for the generation of the standard curve for the target quantification. After testing of the above-mentioned ssRNA internal control molecule, a dsDNA molecule corresponding to the pHM175 43c amplicon, and the actual pHM175 43c RNA genome, the use of the dsDNA molecule is recommended. The alternative of using the actual virus may involve two inherent difficulties. On the one hand, due to the encapsidation of the viral genome, its quantification intrinsically comprises the extraction efficiency, and since it is an RNA molecule, it inherently takes into account both the RT and the PCR efficiencies. In the approach here presented, all these efficiencies are validated externally, and thus the use of the virus as a standard may lead to an overestimation. With the dsDNA molecules, only the efficiency of the PCR would be twice quantified; it is, however, well known that the most critical step in an RT-PCR is the RT

TABLE 5. Quantification of HAV in shellfish samples associated with a genotype IB outbreak

Sample	Nucleic acid extraction			RT-PCR			HAV titer <sup>e</sup>	
	Spiked mengovirus <sup>a</sup>	Recovered mengovirus <sup>b</sup>	Efficiency (%)	Spiked ssRNA <sup>c</sup>	Recovered ssRNA <sup>d</sup>	Efficiency (%)	Crude sample	Final estimate
1	8.6 × 10 <sup>5</sup>	8.6 × 10 <sup>2</sup>	0.10	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.4 × 10 <sup>8</sup>	91.9	ND <sup>f</sup>	
2	8.6 × 10 <sup>5</sup>	6.4 × 10 <sup>2</sup>	0.07	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.1 × 10 <sup>8</sup>	75.7	3.5 × 10 <sup>1</sup>	6.5 × 10 <sup>4</sup>
3	8.6 × 10 <sup>5</sup>	1.1 × 10 <sup>3</sup>	0.13	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.2 × 10 <sup>8</sup>	83.8	ND	
4	8.6 × 10 <sup>5</sup>	1.3 × 10 <sup>3</sup>	0.15	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.3 × 10 <sup>8</sup>	89.2	1.1 × 10 <sup>3</sup>	7.9 × 10 <sup>5</sup>
5	8.6 × 10 <sup>5</sup>	8.0 × 10 <sup>2</sup>	0.09	1.5 × 10 <sup>8</sup>	9.6 × 10 <sup>7</sup>	64.8	4.4 × 10 <sup>0</sup>	7.5 × 10 <sup>3</sup>
6	8.6 × 10 <sup>5</sup>	5.9 × 10 <sup>2</sup>	0.07	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.2 × 10 <sup>8</sup>	78.4	ND	
7	8.6 × 10 <sup>5</sup>	1.2 × 10 <sup>3</sup>	0.14	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1.0 × 10 <sup>8</sup>	70.3	ND	

<sup>a</sup> The inocula added are expressed as TCID<sub>50</sub>/g of hepatopancreas.

<sup>b</sup> Each spiked sample was extracted, and the nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR using a standard curve made by means of mengovirus infectious units.

<sup>c</sup> The inocula added are expressed as the number of molecules of the ssRNA internal control per ml of nucleic acid suspension.

<sup>d</sup> Each spiked nucleic acid suspension was titrated by real-time TaqMan RT-PCR using a standard curve made by means of HAV-derived ssRNA molecules estimated from the OD<sub>260</sub> readings.

<sup>e</sup> The titer is expressed as the number of genome copies per g of hepatopancreas.

<sup>f</sup> ND, not detected (<6.66 copies per g of hepatopancreas, assuming a 100% efficiency for both extraction and RT-PCR).



reaction rather than the PCR, and some kind of molecule must nevertheless be used. On the other hand, this choice avoids an extra manipulation of a human pathogen.

In summary, the whole test involves the generation of three different standard curves: one for the quantification of mengovirus (made with mengovirus titrated by infectivity), another for the quantification of the ssRNA molecule internal control (made with the ssRNA molecule titrated by means of the  $OD_{260}$ ), and a third for the quantification of HAV (made with the dsDNA molecule titrated again by means of the  $OD_{260}$ ). All these standard curves are obtained in a single plate, which additionally contains wells devoted to the calculation of extraction and enzyme efficiencies, as well as the samples to be tested, all under exactly the same conditions.

Another important issue for any diagnostic technique, and particularly when a real-time TaqMan RT-PCR is evaluated, is its specificity, breadth, and sensitivity. All these points are interconnected and depend mostly on the target sequences for primers and probe. The selected targets must guarantee an absolute specificity and must reach equilibrium between high sensitivity, broad reactivity, and reliability of quantification. The specificity of the proposed primer-probe sequences has been shown to be excellent against a broad panel of enteric viruses, including the other enteric hepatitis virus (i.e., hepatitis E virus), many gastroenteritis viruses, and many enteroviruses. Mentioning sensitivity and broad reactivity makes inevitable the comparison with other primer-probe sets. Several TaqMan assays based on the use of primer-probe sets of the 5'NCR (5, 14), which makes all of them potentially suitable for broad reactivity, have been previously described. Three genotypes (two of them subdivided into two subtypes) have been described for human HAV, based on a variable region of the genome around the VP1X2A junction. However, in spite of this variability, all genotypes are well conserved in the 5'NCR for the reasons discussed above. In one of these studies (14), a broad reactivity was demonstrated through the quantification of five different strains representing all the human types. This should be, however, the rule for all those techniques based on highly conserved sequences in the 5'NCR. In fact, it is quite surprising that in work of Jothikumar et al. (14) the efficiencies of amplification for genotypes IIA, IIB, and, to a lesser extent, III are lower than those for of genotypes IA and IB, since they have only one and two mismatches, respectively, in the probe sequence. In our case, the only available genotypes are IA and IB, since the others do not occur in our geographical area. However, through the alignment of the available GenBank sequences it can be concluded that all genotypes should be equally well quantified. Regarding the reverse primer (HAV240), only a point insertion is detected in genotype III; for the forward primer (HAV68), the homology of the available sequences is 100%; and finally, for the probe sequence (HAV150), only one point mutation is shown, affecting particularly genotype IB, which is the one corresponding to the pHM175 43c strain and which it is clearly well quantified. In addition, the demonstration of the detection of one particular strain of a given genotype does not guarantee the detection of all the strains belonging to this genotype due to the quasispecies dynamics of replication of RNA viruses and particularly of HAV (28). In this context, an alternative for the verification of the robustness of the target sequences of primers and probe

may be the analysis of the mutant spectra. In our case, this has shown that the chosen target regions are well preserved, presenting only very few mutations. Moreover, this type of analysis has confirmed the coincidence of the master or dominant sequence with the consensus or average sequence, an important requirement for a reliable, reproducible, and comparable quantification. In fact, this is again an expected result due to the above-mentioned function of the 5'NCR, and consequently, although not proven for the assay described by Jothikumar et al. (14), the same conclusions might be assumed for its primer-probe set. A different situation is that of the assay developed by Costa-Mattioli et al. (5), in which the reverse primer is located in a spacer region that accumulates many mutations. However, it should be pointed out that the objective of their work was not the development of a broadly reactive assay but to study the viremic phase of the HAV infection.

The most limiting step regarding the sensitivity of an RT-PCR is the RT rather than the PCR, and the secondary structure of RNA is accordingly critical. In this context, high ratios of G · C to A · U plus G · U pairs in the stem structures may imply very high temperatures for RNA secondary structure denaturation. Bearing this consideration in mind, it is clearly seen that the reverse primer target of the assay described by Costa-Mattioli et al. (5) is advantageous, since it is from an nonstructured spacer, while the target regions for the assays described by Jothikumar et al. (14) and the one presented here are more structured, with ratios of G · C to A · U plus G · U of 1.8 and 0.5, respectively. This difference could contribute to the slightly lower sensitivity showed by the first of these assays. Yet, in some circumstances, such as food samples harboring very low loads of viruses (see sample 5 of the shellfish involved in a hepatitis A outbreak shown in Table 5) or plasma pools, exquisite levels of sensitivity can make a difference.

The procedure developed here has been tested with different one-step RT-PCR kits from Applied Biosystems, Invitrogen, QIAGEN, and Stratagene. All these kits worked similarly well in terms of sensitivity, with the exception of that from Applied Biosystems, which offered a sensitivity two log units lower and which in some conditions, such as with plasma samples, did not enable virus detection, presumably due to the inhibition of the *Taq* Gold polymerase by anticoagulant factors (data not shown).

From the titers of HAV found in serum samples, it may be concluded that viremia is higher and longer than previously thought, as other authors have recently pointed out (5, 20). An increased and longer pattern of excretion in feces is also observed. These data not only change the whole picture of the infection cycle but also reinforce the need for the quantification of HAV in those samples that are susceptible to contamination, such as some types of food, water, and plasma. Additionally an association between low or very low levels of viremia with fulminant hepatitis has recently been described (26), which justifies the need for an extremely sensitive assay.

It was the purpose of this work not to validate nucleic acid extraction procedures but to provide tools for their validation. In this context, it is noteworthy that the extraction step has been shown to be the most critical point in viral quantification assays. Consequently, validation studies of existing or new methods, mostly for shellfish, are urgently required. Standard-

ized methodologies and standard reagents, such as those developed in this study, should be employed for this purpose.

Quality control and quality assurance procedures must be implemented through the use of automated standardized molecular procedures, such as the one described here, that may enable inclusion in regulatory standards for viruses in food or blood products.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ann C. Palmenberg, University of Wisconsin, for advice and useful discussion. We acknowledge the assistance of the Genomics Unit of the Serveis Científic-Tècnics of the University of Barcelona.

M. I. Costafreda is the recipient of a fellowship in the European Union project SEAFOODplus, Food-CT-2004-506359. This study was supported in part by grants Food-CT-2004-506359 and SP22-CT-2004-502571 from the European Union, BIO2002-02625 and BIO2005-05022 from the Spanish Ministry of Education and Science, and 2005SGR00966 from the Generalitat de Catalunya and by the Centre de Referència de Biotecnologia de Catalunya (CeRBA), Generalitat de Catalunya.

#### REFERENCES

- Atmar, R. L., F. H. Neill, J. L. Romalde, F. Le Guyader, C. M. Woodley, T. G. Metcalf, and M. K. Estes. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3014–3018.
- Bosch, A., J. F. Gonzalez-Dankaart, I. Haro, R. Gajardo, J. A. Pérez, and R. M. Pintó. 1998. A new continuous epitope of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* **54**:95–102.
- Bosch, A., F. Lucena, J. M. Díez, R. Gajardo, M. Blasi, and J. Jofre. 1991. Human enteric viruses and indicator microorganisms in a water supply associated with an outbreak of infectious hepatitis. *J. Am. Water Works Assoc.* **83**:80–83.
- Citino, S. B., B. L. Homer, J. H. Gaskin, and D. J. Wickham. 1988. Fatal encephalomyocarditis virus infection in a Sumatran orangutan (*Pongo pygmaeus abelii*). *J. Zool. Wildl. Med.* **19**:214–218.
- Costa-Mattioli, M., S. Monpoeho, E. Nicand, M. H. Aleman, S. Billaudel, and V. Ferre. 2002. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J. Viral Hep.* **9**:101–106.
- Costa-Mattioli, M., A. D. Napoli, V. Ferre, S. Billaudel, R. Perez-Bercoff, and J. Cristina. 2003. Genetic variability of hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.* **84**:3191–3201.
- Deng, M. Y., S. P. Day, and D. O. Cliver. 1994. Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1927–1933.
- Dentinger, C., W. Bower, O. Nainan, M. Cotter, G. Myers, L. Dubusky, S. Fowler, E. Salehi, and B. Bell. 2001. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *J. Infect. Dis.* **183**:1273–1276.
- Ehrenfeld, E., and N. L. Teterina. 2002. Initiation of translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosome entry site, p. 159–169. *In* B. L. W. E. Semler (ed.), *Molecular biology of picornaviruses*. ASM Press, Washington, D.C.
- Halliday, M. L., L.-Y. Kang, T.-Z. Zhou, M.-D. Hu, Q.-C. Pan, T.-Y. Fu, Y. S. Huang, and S.-L. Hu. 1991. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis.* **164**:852–859.
- Hollinger, F. B., and S. U. Emerson. 2001. Hepatitis A virus, p. 799–840. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Hoorfar, J., B. Malorny, A. Abdulmajjood, N. Cook, M. Wagner, and P. Fach. 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1863–1868.
- Jansen, R. W., J. E. Newbold, and S. M. Lemon. 1988. Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis A virus: comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology* **163**:299–307.
- Jothikumar, N., T. L. Cromeans, M. D. Sobsey, and B. H. Robertson. 2005. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3359–3363.
- Kirkland, P. D., R. A. Hawkes, H. M. Naim, and C. R. Boughton. 1989. Human infection with encephalomyocarditis virus in New South Wales. *Med. J. Aust.* **151**:176.
- Lemon, S. M., and L. N. Binn. 1983. Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross neutralization. *Infect. Immun.* **42**:418–420.
- Martin, L. R., G. M. Duke, J. E. Osorio, D. J. Hall, and A. C. Palmenberg. 1996. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.* **70**:2027–2031.
- Mast, E. E., and M. J. Alter. 1993. Epidemiology of viral hepatitis: an overview. *Semin. Virol.* **4**:273–283.
- Noble, R. C., E. M. Kane, S. A. Reeves, and I. Roedle. 1984. Posttransfusal hepatitis A in a neonatal intensive care unit. *JAMA* **252**:2711–2715.
- Normann, A., C. Jung, A. Vallbracht, and B. Flehmig. 2004. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J. Med. Virol.* **72**:10–16.
- Osorio, J. E., G. B. Hubbard, K. F. Soike, M. Girard, S. van der Werf, J. C. Moulin, and A. C. Palmenberg. 1996. Protection of non-murine mammals against encephalomyocarditis virus using a genetically engineered Mengo virus. *Vaccine* **14**:155–161.
- Parshionikar, S. U., J. Cashdollar, and G. Shay Fout. 2004. Development of homologous viral internal controls for use in RT-PCR assays of waterborne enteric viruses. *J. Virol. Methods* **121**:39–48.
- Paul, A. V. 2002. Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication, p. 227–246. *In* B. L. W. E. Semler (ed.), *Molecular biology of picornaviruses*. ASM Press, Washington, D.C.
- Poyry, T., L. Kinnunen, and T. Hovi. 1992. Genetic variation in vivo and proposed functional domains of the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *J. Virol.* **66**:5313–5319.
- Reid, T. M. S., and H. G. Robinson. 1987. Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiol. Infect.* **98**:109–112.
- Rezende, G., A. M. Roque-Afonso, D. Samuel, M. Gigou, E. Nicand, V. Ferre, E. Dussaix, H. Bismuth, and C. Féray. 2003. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A virus. *Hepatology* **38**:613–618.
- Robertson, B. H., R. W. Jansen, B. Khanna, A. Totsuka, O. V. Nainan, G. Siegl, A. Widell, H. S. Margolis, S. Isomura, K. Ito, T. Ishizu, Y. Moritsugu, and S. M. Lemon. 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.* **73**:1365–1377.
- Sanchez, G., A. Bosch, G. Gomez-Mariano, E. Domingo, and R. M. Pinto. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* **315**:34–42.
- Sanchez, G., R. M. Pinto, H. Vanaclocha, and A. Bosch. 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4148–4155.
- Sheretz, R. J., B. A. Russell, and P. D. Reunman. 2005. Transmission of hepatitis A by transfusion of blood products. *Arch. Intern. Med.* **1441**:1579–1580.

\*Pérez-Sautu, U., \*Costafreda, M.I., Caylà, J., Tortajada, C., Lite, J., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2011. Hepatitis A virus vaccine escape mutants and potencial new serotip emergence. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 734-737.





# Hepatitis A Virus Vaccine Escape Variants and Potential New Serotype Emergence

Unai Pérez-Sautu,<sup>1</sup> M. Isabel Costafreda,<sup>1</sup>  
Joan Caylà, Cecilia Tortajada, Josep Lite,  
Albert Bosch, and Rosa M. Pintó

Six hepatitis A virus antigenic variants that likely escaped the protective effect of available vaccines were isolated, mostly from men who have sex with men. The need to complete the proper vaccination schedules is critical, particularly in the immunocompromised population, to prevent the emergence of vaccine-escaping variants.

In areas where hepatitis A has low to moderate endemicity, introduction of the virus occurs through consumption of imported foods, traveling, or through immigration flows (1–3). Men who have sex with men (MSM) comprise a high-risk group for hepatitis A, and several outbreaks affecting this group have been reported across Europe (4). To prevent the spread of infection, since 1999, vaccination programs have been implemented among preadolescents in the Catalonia Autonomous Community of Spain.

Despite some degree of nucleotide heterogeneity at the capsid region of hepatitis A virus (HAV) (5,6), there is not an equivalent degree of amino acid variation (7). HAV replicates as complex dynamic mutant distributions or quasispecies (8) and thus the high degree of conservation of the capsid amino acid sequences among independent strains must be the result of negative selection on newly arising mutants. So far, a single serotype of human HAV has been recognized, which suggests that severe structural constraints occur in the capsid that prevent the more extensive substitutions necessary for the emergence of a new serotype. Indeed, negative selection of replacements affecting residues encoded by rare codons of the capsid surface has been documented, indicating a critical role played by such rare codons (9). Since these residues are

located quite near or even at the epitope regions, the need to maintain such rare codons might prevent the emergence of new serotypes (9). We have recently noted that fine-tuning translation kinetics selection, or the right combination of preferred and rare codons in the capsid coding region, is necessary to get regulated ribosome traffic to guarantee the proper capsid folding (10). In this context, it seems quite unlikely that a new serotype will emerge, although the emergence of new variants is not impossible if the virus population is forced through bottleneck conditions such as immune selective pressures. We investigated the presence of antigenic variants among sporadic and outbreak cases of hepatitis A.

## The Study

We molecularly characterized 128 HAV strains isolated during 2005–2009 in Catalonia from patients with both sporadic ( $n = 37$ ) and outbreak ( $n = 91$ ) cases (online Technical Appendix Figure 1, [www.cdc.gov/EID/content/17/4/734-Techapp.pdf](http://www.cdc.gov/EID/content/17/4/734-Techapp.pdf)) based on their viral protein 1 (VP1) region (7). Deduced amino acid sequences were compared with those of HM-175 and GBM strains (GenBank accession nos. M14707 and X75215, respectively) and constituents of 2 of the commercial HAV vaccines, HAVRIX (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) and Avaxim (Sanofi-Pasteur, Paris, France), respectively. Six amino acid replacements, which have not been previously described, were detected (Table 1). Two were semiconservative replacements, V1171A and A1280V, and the other 4 were nonconservative, V1166G, Y1181S, R1189T, and A1280E. The replaced amino acids were located in a refined 3-dimensional computer model of the HAV protomer (11), and their relative distances to residues 1102, 1171 and 1176, constituents of the immunodominant site (12), and to residue 1221, constituent of the glycoporphin A binding site epitope (13), were used as markers of the potential antibody-escaping phenotype. All replaced positions were located at (1171) or around (1166, 1181, 1189, 1280) the viral immunodominant site near the 5-fold axis (Figure 1), and thus strains bearing these replacements might be considered antigenic variants. In a previous study, several escape mutants to K34C8 monoclonal antibody (MAb), which recognizes the immunodominant site, were isolated (9). Among these mutants, 2 were defined by replacements W1170C (C6) and A1187P (P29), which were located very close to the mutated residues detected in this study (Figure 1). Residue 1170 is located contiguous to residue 1171 and close to residues 1280 and 1181. Additionally, residue 1187 is in close contact with residue 1189. Since HAV natural isolates cannot be grown in vitro, C6 and P29 monoclonal

Author affiliations: University of Barcelona, Barcelona, Spain (U. Pérez-Sautu, M.I. Costafreda, A. Bosch, R.M. Pintó); Public Health Agency of Barcelona, Barcelona (J. Caylà, C. Tortajada); and CatLab, Viladecavalls, Spain (J. Lite)

DOI: 10.3201/eid1704.10.1169

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this article.

Table 1. Amino acid substitutions in the VP1 protein observed in different strains isolated during the present study\*

Strain	Replacement	Position*
MSM08-09-219	V → G	1166
MSM08-09-186	V → G	1166
	V → A	1171
BCN60	Y → S	1181
MSM08-09-ClusterE	R → T	1189
MSM08-09-144	A → V	1280
BCN31	A → E	1280

\*Position strain HM175 (GenBank accession no. M14707). The first digit refers to the viral protein, i.e., 1 for VP1, and the following 3 digits refer to the amino acid position in the protein.

antibody-resistant (MAR) mutants were used to mimic the behavior of the naturally isolated variants in neutralization assays with antivaccine serum specimens. Results proved that mutant C6 is resistant to both antivaccine serum, as well to convalescent-phase serum, whereas mutant P29 is partially resistant to serum generated with Avaxim vaccine (Table 2).

Of the 6 antigenic variants isolated (Table 1), 4 were obtained during an outbreak among MSM in 2008–2009. Although the number of reported cases of this outbreak was of 186, the number of molecularly analyzed samples, i.e., 66, was similar to that of the rest of analyzed samples, i.e., 62 (including other small outbreaks as well as sporadic cases). Phylogenetic analysis of antigenic variants in the MSM group suggested that they originated from a single patient (online Technical Appendix Figures 1, 2), and thus 4 variants (6% of all isolated strains) represent quite an important number for such an antigenically stable virus. In contrast, the multiple origins of the strains of the general group (42 phylogenetically distinguishable strains; online

Technical Appendix Figure 1) did not correlate with higher numbers of antigenic variants: only 2 were detected (3% of all isolated strains). An intriguing issue is why so many variants of the immunodominant 5-fold site arose during the MSM 2008–2009 outbreak, considering the low fitness shown by MAR mutants with replacements around this site. In particular, C6 and P29 mutants were rapidly outcompeted by a wild-type strain in the absence of antibodies, and although they were able to overcome the wild-type virus in the presence of the K34C8 MAb, it was only after a slow process (Figure 2), indeed indicating a very low fitness. This kind of mutant can only be selected throughout bottleneck events, such as the ingestion of minute amounts of viruses able to float some variants, unlikely in high-risk practices of HIV-positive patients whose viral load in stool may be as high as  $10^{11}$  genome copies/g, or the ingestion of a considerable amount of viruses by patients with low IgG levels, who are unable to completely neutralize the infecting virus, thus allowing the viral population to replicate in the presence of antibodies. In fact, 4% (8/186 case-patients) of the MSM 2008–2009 outbreak patients had been vaccinated. However, in only 1 case was the vaccine administered during childhood following the complete dose schedule. In 5 cases, the patients had received only 1 dose of the vaccine during the 6-month period before any symptoms of infection, and the remaining 2 had received only 1 dose of the vaccine long before the infection. Five of these 8 patients were HIV positive. An incomplete vaccination schedule in an immunocompromised host could lead to a situation of only partial protection, providing suitable conditions for the emergence of an antigenic variant. Unfortunately, samples

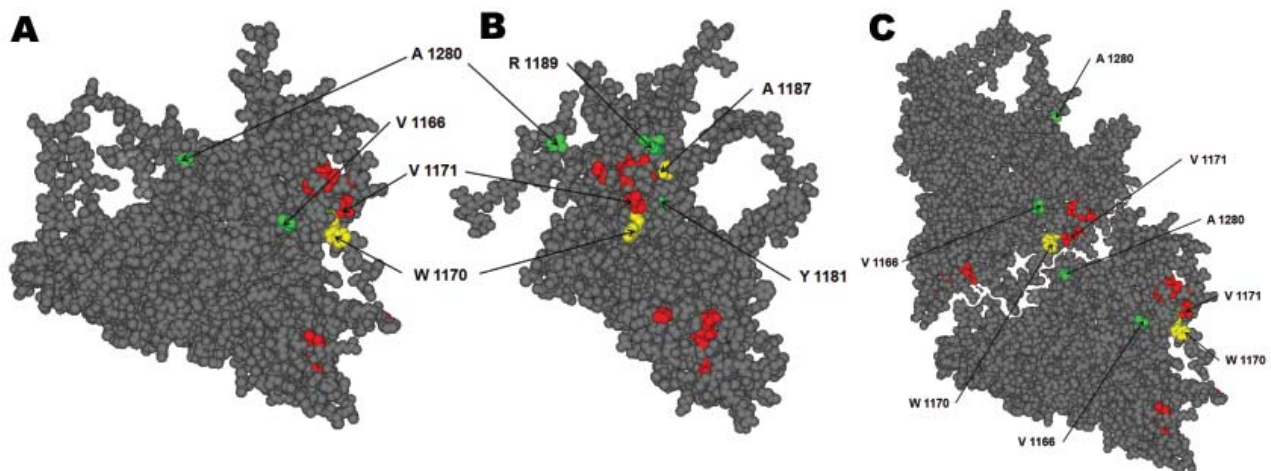


Figure 1. Hepatitis A virus protomer model (11; refined by Ming Luo, University of Alabama, Birmingham, AL, USA), which includes the locations of all of the substituted residues in viral protein 1 detected in the isolated variants during 2005–2009. A) Front view of the external surface. B) Lateral view. C) View of 2 adjacent protomers, showing the close contact of residues 1171 and 1280. Red, residues forming the immunodominant site; yellow, residues substituted in monoclonal antibody-resistant mutants C6 (W1170C) and P29 (A1187P); green, residues substituted in the identified natural variants. The amino acid substitution V1171A detected in 1 variant is shown in red because this residue belongs to the immunodominant site.

Table 2. Neutralization assays of K34C8 MAb-escape variants that showed replacements at the same or very close positions as the mutated positions in the naturally-selected field variants isolated during 2005–2009\*†

Mutant (position replaced)	log $N_t/N_0$ vaccine serum (HAVRIX)	log $N_t/N_0$ vaccine serum (Avaxim)	log $N_t/N_0$ convalescent-phase serum (HCS2)	log $N_t/N_0$ MAb K34C8
C6 (1170)	$-0.08 \pm 0.14$	$-0.08 \pm 0.14$	$-0.02 \pm 0.04$	$-0.08 \pm 0.14$
P29 (1187)	$-0.70 \pm 0.09$	$-0.30 \pm 0.19$	$-0.70 \pm 0.07$	$-0.37 \pm 0.19$
D23 (1217)	$-0.88 \pm 0.02$	$-0.54 \pm 0.01$	$-0.61 \pm 0.07$	$-0.58 \pm 0.12$
HM175/43c	$-0.69 \pm 0.09$	$-0.60 \pm 0.05$	$-0.65 \pm 0.05$	$-0.61 \pm 0.10$

\*Assays were performed by using vaccine and convalescent-phase serum samples as well as K34C8 MAb. MAb, monoclonal antibody; HAVRIX, HAVRIX vaccine (GlaxoSmithKline, Rixenart, Belgium); Avaxim, Avaxim vaccine (Sanofi-Pasteur, Paris, France).

†Following the model of the hepatitis A virus protomer of Ming Luo (Figure 1). Three neutralization assays were performed with each antivaccine serum sample, the convalescent-phase serum sample, and the MAb K34C8. As controls, neutralization of the D23 H7C27 MAb escape variant (9) as well as that of the HM175/43c wild-type strain, was also measured. The highest dilution showing a log  $N_t/N_0 = -0.60$  (75% neutralization) of the wild-type strain was used to test the variants;  $N_t$ , the viral titer after neutralization;  $N_0$ , the initial titer. Neutralization limits were the following: log  $N_t/N_0 > -0.26$  (<45%) for resistant variants,  $-0.26 > \log N_t/N_0 > -0.60$  (45%–75%) for partially resistant variants, and log  $N_t/N_0 < -0.60$  (>75%) for sensitive variants (9).

from these vaccinated patients were not available; however, it is obvious that the vaccinees likely contributed to the selection of such antigenic variants at a population scale. Because in situations of no competition with the wild-type

virus, the MAR mutants replicate perfectly well, it may be inferred that the natural variants, once they are selected in an improperly vaccinated HIV-positive person, may spread to other, properly vaccinated persons.

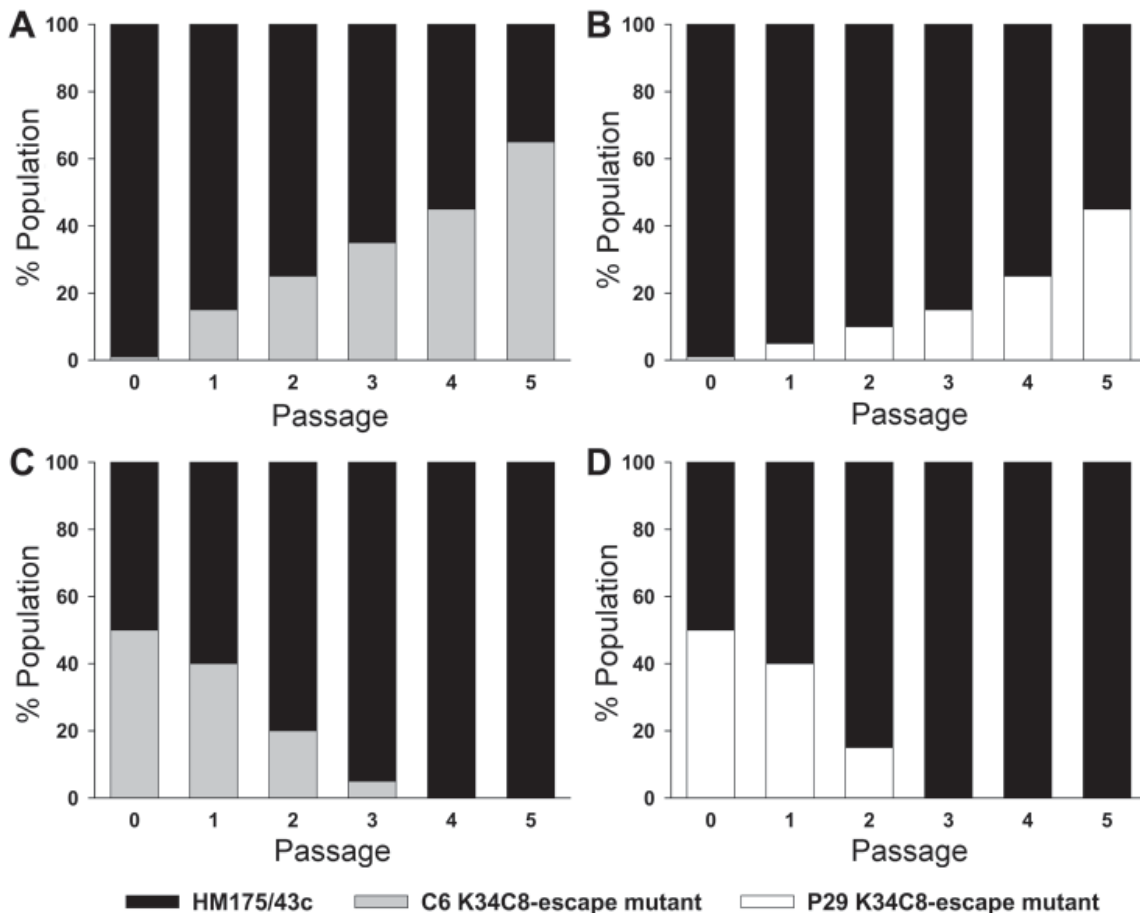


Figure 2. Growth competition experiments. Monoclonal antibody-resistant (MAR) mutants C6 (W1170C) and P29 (A1187P) were grown in competition with the HM175/43c (wild-type virus) in the presence (A,B) or in the absence (C,D) of the monoclonal antibody (MAb) K34C8. The MAR/wild-type ratios were 1:100 ( $10^4$  50% tissue culture infective dose [TCID<sub>50</sub>] units of MAR mutants mixed with  $10^6$  TCID<sub>50</sub> units of the wild-type virus in the presence of the K34C8 MAb) and 1:1 ( $10^6$  TCID<sub>50</sub> units of MAR mutants mixed with  $10^6$  TCID<sub>50</sub> units of the wild-type virus in the absence of antibodies). In the competition experiments performed in the presence of antibodies, the initial viral mixtures as well as the viral progenies were neutralized with the MAb prior each infection passage. The proportion of mutant and wild-type phenotypes at each passage was inferred from the chromatogram of the consensus sequences and using as marker mutations W1170C and A1187P in C6 and P29 MARs, respectively (9).

## Conclusions

Isolation of so many variants in a single outbreak among the MSM population, in a virus presenting such severe genomic and structural constraints, emphasizes the need to target this community with more effective information on risky sexual practices and vaccination programs. Additionally, and particularly among HIV-positive MSM, efforts should be made to completely accomplish the vaccination schedule, due to their lower level of immune response (14,15). An additional concern is that this impaired response may contribute not only to a lower protection of the vaccinee but also to the emergence of antigenic variants. In the analyzed MSM 2008–2009 outbreak, 4 variants were isolated that were located at or very close to the immunodominant site as well as to residues substituted in 2 MAR mutants showing a phenotype of resistance to the protection offered by commercial vaccines. Thus, a similar behavior of the natural variants can be postulated, and if this is the case, a new serotype could emerge.

## Acknowledgments

We are indebted to Josep Costa and Bertram Flehmig for providing serum specimens from patients who had seroconverted to HAVRIX and Avaxim vaccines, respectively.

This work was supported in part by grant BIO2008-01312 from CICYT (Ministry of Education and Science, Spain; <http://web.micinn.es>), 2009 SGR 24 and the network of the Xarxa de Referència de Biotecnologia de Catalunya (Generalitat de Catalunya; [www.gencat.cat/agaur](http://www.gencat.cat/agaur)).

Dr Pérez-Sautu is a fellow in the Postgraduate Training for Environmental Microbiology and Biotechnology at the Department of Microbiology of the University of Barcelona. His research interests include molecular diagnostics and epidemiology of enteric viruses in clinical and environmental samples.

## References

- Pintó RM, Costafreda MI, Bosch A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:7350–5. DOI: 10.1128/AEM.01177-09
- Wheeler C, Vogt TM, Armstrong GL, Vaughan G, Weltman A, Nainan OV, et al. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *N Engl J Med*. 2005;353:890–7. DOI: 10.1056/NEJMoa050855
- Faber MS, Stark K, Behnke SC, Schreier E, Frank C. Epidemiology of hepatitis A virus infections, Germany, 2007–2008. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1760–8.
- Stene-Johansen K, Tjon G, Schreier E, Bremer V, Bruisten S, Ngui SL, et al. Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *J Med Virol*. 2007;79:356–65. DOI: 10.1002/jmv.20781
- Costa-Mattioli M, Napoli AD, Ferre V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol*. 2003;84:3191–201. DOI: 10.1099/vir.0.19532-0
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol*. 1992;73:1365–77. DOI: 10.1099/0022-1317-73-6-1365
- Sánchez G, Bosch A, Pintó RM. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J Virol*. 2003;77:452–9. DOI: 10.1128/JVI.77.1.452-459.2003
- Sánchez G, Bosch A, Gomez-Mariano G, Domingo E, Pintó RM. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology*. 2003;315:34–42. DOI: 10.1016/S0042-6822(03)00483-5
- Aragonès L, Bosch A, Pintó RM. Hepatitis A. Virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J Virol*. 2008;82:1688–700. DOI: 10.1128/JVI.01842-07
- Aragonès L, Guix S, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000797. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000797
- Luo M, Rossmann MG, Palmenberg AC. Prediction of three-dimensional models for foot-and-mouth disease virus and hepatitis A virus. *Virology*. 1988;166:503–14. DOI: 10.1016/0042-6822(88)90521-1
- Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol*. 1992;66:2208–16.
- Sánchez G, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycoprotein A of the erythrocyte membrane. *J Virol*. 2004;78:9807–13. DOI: 10.1128/JVI.78.18.9807-9813.2004
- Weissman S, Feucht C, Moore BA. Response to hepatitis A vaccine in HIV-positive patients. *J Viral Hepat*. 2006;13:81–6. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2005.00658.x
- Neilsen GA, Bodsworth NJ, Watts N. Response to hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected homosexual men. *J Infect Dis*. 1997;176:1064–7. DOI: 10.1086/516512

Address for correspondence: Rosa M. Pintó, Department of Microbiology, School of Biology, Diagonal 645, 08028, Barcelona, Spain; email: [rpinto@ub.edu](mailto:rpinto@ub.edu)

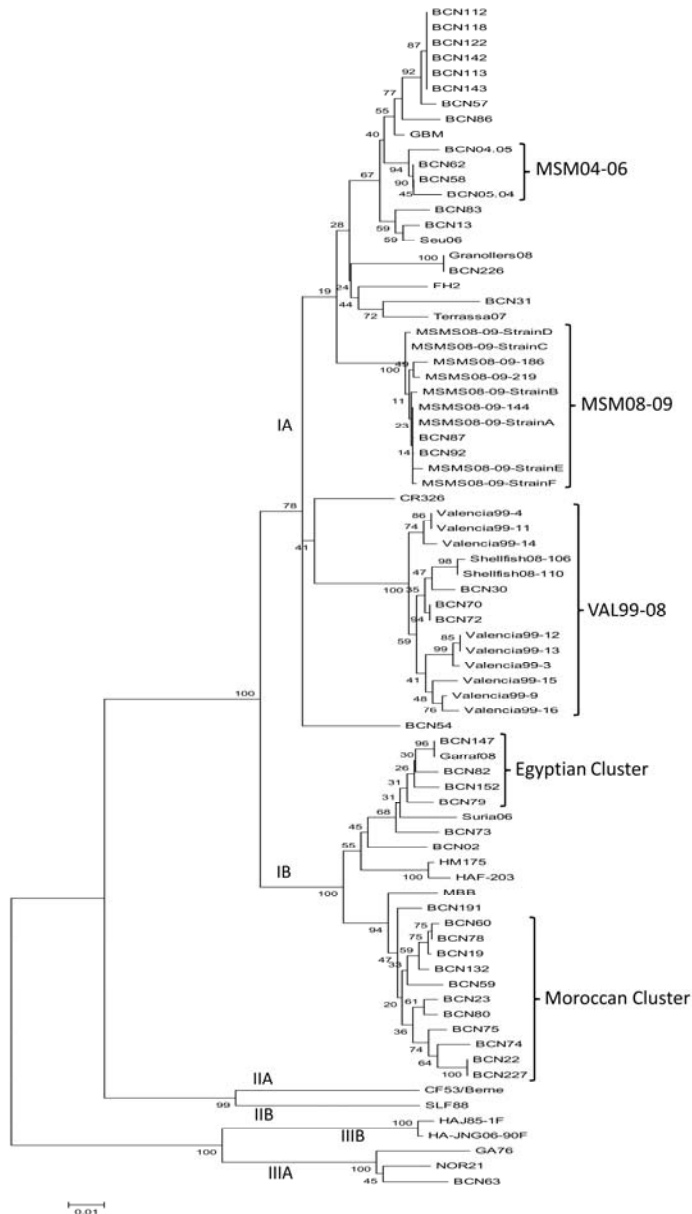


Sign up for Twitter and find the latest information from Emerging Infectious Diseases

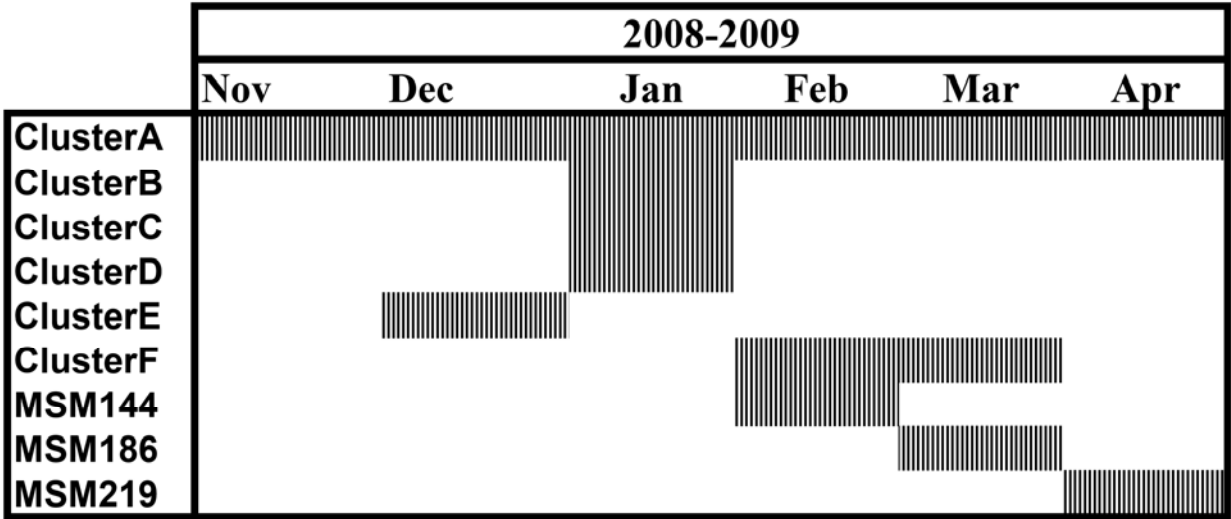


# Hepatitis A Virus Vaccine Escape Variants and Potential New Serotype Emergence

## Technical Appendix



Technical Appendix Figure 1. Phylogenetic tree based on the C-terminal fragment of viral protein 1. Neighbor-joining, Kimura 2-parameter, bootstrap 1,000 replicates (GenBank accession nos: HQ401214–HQ401267). 187 × 252 mm.



Technical Appendix Figure 2. Temporal distribution of strain isolation during the 2008–2009 hepatitis outbreak among men who have sex with men (MSM). Nine distinguishable strains were isolated. Cluster E and strains MSM08-09-144, MSM08-09-186, and MSM08-09-219 are antigenic variants that evolved from the original and most abundant cluster A. 189 ×81 mm.

Costafreda, M.I., Ribes, E., Franch, A., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2012. A single mutation in the glycoprotein A binding site of hepatitis A virus enhances virus clearance from the blood and results in a lower fitness variant. *Journal of Virology*, 86: 7887-7895.





# A Single Mutation in the Glycophorin A Binding Site of Hepatitis A Virus Enhances Virus Clearance from the Blood and Results in a Lower Fitness Variant

M. Isabel Costafreda,<sup>a,b,c</sup> Enric Ribes,<sup>a,d</sup> Àngels Franch,<sup>b,e</sup> Albert Bosch,<sup>a,b,c</sup> and Rosa M. Pintó<sup>a,b,c</sup>

Enteric Virus Laboratory,<sup>a</sup> Institute of Nutrition and Food Safety,<sup>b</sup> Department of Microbiology, School of Biology,<sup>c</sup> Department of Cellular Biology, School of Biology,<sup>d</sup> and Department of Physiology, School of Pharmacy,<sup>e</sup> University of Barcelona, Barcelona, Spain

Hepatitis A virus (HAV) has previously been reported to bind to human red blood cells through interaction with glycophorin A. Residue K221 of VP1 and the surrounding VP3 residues are involved in such an interaction. This capsid region is specifically recognized by the monoclonal antibody H7C27. A monoclonal antibody-resistant mutant with the mutation G1217D has been isolated. In the present study, the G1217D mutant was characterized physically and biologically in comparison with the parental HM175 43c strain. The G1217D mutant is more sensitive to acid pH and binds more efficiently to human and rat erythrocytes than the parental 43c strain. In a rat model, it is eliminated from serum more rapidly and consequently reaches the liver with a certain delay compared to the parental 43c strain. In competition experiments performed *in vivo* in the rat model, the G1217D mutant was efficiently outcompeted by the parental 43c strain. Only in the presence of antibodies reacting specifically with the parental 43c strain could the G1217D mutant outcompete the parental 43c strain in serum, although the latter still showed a remarkable ability to reach the liver. Altogether, these results indicate that the G1217D mutation induces a low fitness phenotype which could explain the lack of natural antigenic variants of the glycophorin A binding site.

Hepatitis A virus (HAV), classified as the type species of the genus *Hepatovirus* within the *Picornaviridae* family (16), is a medically important hepatotropic virus (14). The virion capsid is composed of the structural proteins VP1, VP2, VP3, and possibly VP4, encoded in the P1 region of the genome (14).

HAV has a limited number of antigenic sites. The immunodominant site, composed of closely clustered epitopes, is defined by two major groups of escape mutants that include mutations in residues 70, 71, and 74 of VP3 and residues 102, 171, and 176 of VP1 (25, 29). There is another apparently distinct antigenic site, represented by mutations around residue 221 of VP1, and an additional and still undefined third antigenic site for which no escape mutant has so far been isolated. A single serotype has been recognized up to now, and even descriptions of natural variants at these specific sites are scarce (8, 11, 27, 36), in spite of the quasi-species nature of HAV (34).

Recently, we described a molecular mechanism, i.e., codon usage constraints, that could contribute in part to this low antigenic variability (1). HAV presents a highly deoptimized codon usage with strategic locations of residues encoded by rare codons at or very close to the capsid epitopes. These residues encoded by rare codons are highly conserved among the different HAV strains (35), and their replacement is negatively selected even under specific immune pressure (1). The need to keep these residues encoded by rare codons probably relies on their role in controlling translation speed to guarantee proper capsid folding, i.e., fine-tuning translation kinetics or using the right combination of preferred and rare codons, through the induction of transient ribosome stalling due to the longer times required to obtain the proper tRNAs. In fact, under conditions of artificially induced cellular shutoff, with the consequent increase of tRNA pools, HAV changes its capsid codon usage, increasing the use of less abundant instead of the most abundant tRNAs, probably in an attempt to

avoid the rapid translation associated with a higher tRNA availability (2).

Other mechanisms to explain the low antigenic variability of HAV may also rely on *in vivo* cycle constraints. Monoclonal antibody (MAb) escape mutants representing the above-mentioned epitopes show a completely different fitness pattern (1). While escape mutants of the H7C27 MAb, defined by mutations in the region around residue 221 of VP1, have a similar *in vitro* fitness to that of the parental virus, those of the K34C8 MAb, defined by mutations in residues 171 to 176 of the VP1 immunodominant site, have a significant lower *in vitro* fitness than the parental virus and are able to outcompete it only in the presence of antibodies to which they are resistant. In contrast, among the few antigenic variants isolated from patients, only representatives with variations of the immunodominant site are available (8, 11, 27, 36). This discrepancy may be explained by taking into consideration the biological constraints imposed by the virus enterohepatic cycle in the host. For the development of an infection cycle, HAV must overcome the challenges posed by the acid pH of the stomach and the action of intestinal proteases and detergents (particularly biliary salts) during the entry phase, the presence of decoy factors during the viremic phase, and again the action of proteases and detergents during the exit phase. The selective pressure of pH, proteases, and biliary salts calls for the need to shape a highly cohesive and stable capsid. However, the contribution of blood decoy factors to delineate such a capsid may seem less obvious.

Received 22 March 2012 Accepted 9 May 2012

Published ahead of print 16 May 2012

Address correspondence to Rosa M. Pintó, rpinto@ub.edu.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.00707-12

HAV replicates in hepatocytes and uses different membranes to enter and exit the polarized cell. As a consequence, the enterohepatic cycle is critical for the infection of new hepatocytes (23). In such a context, HAV needs to persist during the viremic phase. Erythrocyte glycoproteins may function as decoy receptors, attracting pathogens to the erythrocyte and keeping them away from target tissues (12). HAV interacts with glycophorin A of human erythrocytes, and the capsid region involved in this interaction is located around the putative pit area and coincides with the H7C27 MAb binding site (33). However, this interaction is optimal under acidic conditions and impaired at neutral physiological pH, suggesting that the actual HAV capsid conformation would allow escape from erythrocyte attachment. Avoiding blood clearance, i.e., the removal of viruses from the fluid compartment of blood, may constitute an advantage for a viremic infectious agent whose target organ is the liver, contributing to the final fitness outcome *in vivo*.

In the present work, the roles of all these physical and cycle constraints in the high level of antigenic stability of the glycophorin A binding site and their role in viral fitness are evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

**Viruses and cells.** The cytopathogenic HM175 43c strain of HAV is a mutant (D3070A; replacement of D at position 70 of VP3 by A) resistant to a large number of MAbs against the immunodominant site (29) which was generated spontaneously during cell culture passage of the HM175 wild-type virus. The 43c strain is still sensitive to several MAbs against the immunodominant and glycophorin A binding sites (1, 29). The G1217D strain is a mutant (replacement of G at position 217 of VP1 by D) derived from the HM175 43c strain which was selected in the presence of the H7C27 MAb (1). The phenotype of resistance to the H7C27 MAb came from the G217D substitution in the VP1 protein. Residue 217 is very close to residue 221, which defines the H7C27 MAb (or glycophorin A) binding site (1). Both virus strains (43c parental strain and G1217D mutant) were used throughout this study. The 50% tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>) was obtained for both viruses on FRhK-4 cell monolayers.

**Quantification of resistance to acid pH, trypsin, and biliary salts.** Resistance treatment at acid pH consisted of virus incubations at pH 1, 2, and 3.5 for 1 and 3 h at 37°C. Resistance to 1% biliary salts and 0.25% trypsin was also tested for 4 and 8 h at 37°C. To quantify virus inactivation, a control test of nontreated viruses kept for the same length of time at 37°C was run in parallel. The  $\log(N_t/N_0)$  value, where  $N_t$  is the infectious viral titer after treatment and  $N_0$  is the infectious viral titer of the parallel nontreated virus control, was figured.

**Purification of infectious (150S) particles.** Concentrated viral stocks were obtained as previously described (4). Briefly, at 5 to 6 days postinfection, cells from a T-175 flask were harvested by trypsin treatment, collected by centrifugation, resuspended in 500  $\mu$ l of NT buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1% NP-40, pH 7.4), and incubated for 30 min at room temperature. These lysed cell suspensions were centrifuged at 1,700  $\times$  g for 5 min and the supernatants again centrifuged at 13,000  $\times$  g for 5 min. Viruses recovered in the supernatants were subjected to three sonication cycles of 30 s at 60 W in the presence of 0.4% SDS. Five hundred microliters of each concentrated viral stock was layered onto a 5 to 45% sucrose gradient in TNMg buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, and 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.7) and spun at 205,000  $\times$  g for 165 min (31). Fractions containing infectious virus (150S) were identified by both determination of the refraction index and a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) consisting of HAV capture by a convalescent-phase serum followed by detection with MAb K2-4F2 (30). Positive fractions from six gradients were collected and dialyzed against water to remove sucrose. Finally, pooled samples were concentrated by ultracentrifugation at 229,600  $\times$  g for 4 h, and the pellet was recovered in a final volume of 500  $\mu$ l.

Viral titers were quantified by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) (7) and the TCID<sub>50</sub>.

**Erythrocyte purification.** Human type O erythrocytes (provided by the blood bank of the Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain) and erythrocytes from adult female Wistar rats were purified on preformed self-generated gradients of Percoll (Pharmacia Biotech) following the manufacturer's specifications, as previously described (33). Briefly, a gradient was formed by spinning 10 ml of a 70% solution of Percoll in 150 mM NaCl at 2,000  $\times$  g for 15 min. Two milliliters of gradient material was removed from the bottom of the tube, and 2 ml of 50% heparinized blood in 150 mM NaCl was layered on top of the gradient. The sample was centrifuged for 5 min at 400  $\times$  g, the platelets on the top of the gradient were removed and replaced by saline, and the gradient was centrifuged again at 800  $\times$  g for 15 min. Cells from the erythrocyte-containing fraction were washed three times in Alserver's solution (2.05% [wt/vol] glucose, 0.8% sodium citrate, 0.055% citric acid, and 0.42% NaCl, pH 6.7), collected by centrifugation at 500  $\times$  g for 5 min, and resuspended in the same solution. Before hemagglutination assays, erythrocytes were again washed three times in PBS (0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) at pH 5.5 or 7.2.

**Hemagglutination assays.** Hemagglutination assays were performed in 96-well U-bottom plates as previously described (33). Briefly, serial 2-fold dilutions of 150S particles were made in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 5.5 or 7.2. Twenty microliters of diluted particles was dispensed in each well, and 20  $\mu$ l of a suspension containing 10<sup>6</sup> erythrocytes at pH 5.5 or 7.2 was added, mixed, and incubated for 1 h at room temperature. Negative controls were also assayed by incubating 20  $\mu$ l of PBS with the same volume of the erythrocyte suspension under the same conditions. The hemagglutination titer was expressed as the reciprocal of the greatest dilution of HAV that caused complete agglutination of the erythrocytes (endpoint dilution) in comparison with negative controls. The hemagglutination unit was defined as the number of particles present at the hemagglutination endpoint dilution able to hemagglutinate 10<sup>6</sup> erythrocytes.

***In vivo* injection of HAV strains into rats.** In order to test blood clearance of the 43c strain and the G1217D mutant, two groups of seven adult female Wistar rats (175 to 200 g) were inoculated with 1 ml of virus at 10<sup>8</sup> genome copies/ml via the tail vein. Blood (200 to 300  $\mu$ l) was obtained through the saphenous vein at 1, 5, 15, 30, and 60 min postinoculation (p.i.) and 3, 6, 12, 24, and 48 h p.i. from rats under isoflurane inhalation anesthesia, and the titers of virus genome copies in both blood compartments (serum and blood cells) were determined. At 48 h p.i., animals were sacrificed by lethal injection, and the liver and spleen were removed for quantitative PCR (qPCR) determination of HAV genome copy numbers (7).

To test the influence of blood clearance on the biodistribution of both strains, two groups of nine rats were inoculated with 1 ml of virus at 10<sup>8</sup> genome copies/ml. On days 7, 14, and 21, three rats of each group were sacrificed and the virus in sera, livers, and spleens quantified. Fecal samples were obtained on days 3, 5, 7, 10, 12, 14, and 21 from available animals to monitor viral excretion. For the liver and spleen, both positive- and negative-strand RNA copy numbers were determined, while for serum and feces only the positive-strand RNA was titrated. A supplementary experiment was performed similarly, but using four groups of animals, two of which received the untreated parental and mutant strains as described above and two of which received the same strains inactivated through a UV-light (254 nm) irradiation treatment for 3 h. In this experiment, all samples were equally obtained and processed, with the exception of fecal samples, which were collected daily during the interval between days 14 and 21.

Additionally, clearance competition experiments were performed by inoculating four groups of seven rats with mixtures of both strains at a 1:1 (43c:G1217D mutant) ratio, as well as a 1:9 ratio, in the absence and presence of the H7C27 MAb at a concentration inducing 90% neutralization of strain 43c. The 1-ml inoculum that each rat received contained 10<sup>8</sup>

genome copies/ml; in the 1:1 mixtures, there were  $5 \times 10^7$  genome copies of each virus strain, and in the 1:9 mixtures, there were  $1 \times 10^7$  genome copies of the 43c strain plus  $9 \times 10^7$  genome copies of the G1217D mutant strain. Blood samples were taken following the same schedule as that described above. However, animals were sacrificed not at 48 h but at 21 days. After sacrifice, samples of the liver and spleen were also taken.

Experiments were conducted according to European Union regulations for animal experiments (Directive 86/609 CEE) under the supervision of the Ethical Committee for Animal Procedures (CEEA) of the University of Barcelona. Procedure 3656 (clearance kinetics of hepatitis A virus [HAV] in adult Wistar rats) was previously approved by the Environment Department of the Generalitat de Catalunya.

**Determination of virus clearance from blood.** The number of positive-strand RNA genome copies per ml of serum at each sampling time was determined by qPCR, using a previously described standardized procedure which includes both RNA extraction and RT-PCR inhibition controls (7, 32). Blood samples were centrifuged at  $3,000 \times g$  for 10 min and RNA extracted from 150  $\mu$ l of the serum supernatant and 150  $\mu$ l of the PBS-resuspended cell pellet by use of a NucleoSpin RNA virus kit (Macherey-Nagel). Five microliters of each RNA suspension was used for one-step real-time RT-PCR.

At 2 weeks p.i., sequencing of a fragment of the VP3 coding region corresponding to amino acids 1 to 123 and a fragment of the VP1 coding region corresponding to amino acids 176 to 245 was performed as previously described (1) to monitor the evolution of the inoculated virus population.

In the clearance competition experiments, the follow-up of the proportion of each viral strain was done by using the mutation at position 217 of VP1, present only in the G1217D mutant strain (G  $\rightarrow$  A mutation at nucleotide [nt] 2857 in HM175; GenBank accession number M14707), as a genetic marker allowing semiquantitative monitoring of the strains through determination of the proportional heights of the two peaks inferred from the chromatogram of the consensus sequence. The absolute number of genome copies per ml of serum was determined at 60 min p.i., and the relative titer of each strain was estimated through the percentage of each strain in the sequencing chromatogram.

**Determination of genome copy numbers in liver and spleen.** The titer of positive-strand RNA genome copies per mg of tissue was determined by qPCR essentially as described above. Additionally, the number of negative-strand (antigenomic) RNA copies was also obtained, by a two-step real-time RT-PCR derived from the above-mentioned method for genome quantification, but using a primer annealing with the negative strand as the reverse primer for RT. Five hundred milligrams of minced tissue was digested in 500  $\mu$ l of a solution containing 100  $\mu$ g/ml of proteinase K for 2 h at 37°C with constant agitation. Tissue debris was removed by centrifugation at  $3,000 \times g$  for 5 min, and the supernatant was used for virus quantification. RNA was extracted from 150  $\mu$ l of this supernatant by use of the kit described above, and 5  $\mu$ l of this RNA suspension was used in the real-time RT-PCR assays.

In the clearance competition experiments, the follow-up of the proportion of each viral strain was done using the same genetic marker as that stated in the previous section. The absolute titer of genome copies per mg of liver was determined at 21 days p.i., and the relative titer of each strain was estimated through the percentage of each strain in the sequencing chromatogram.

**Determination of genome copy numbers in feces.** Genome copy numbers per g of feces were determined by qPCR essentially as described above. A 10% suspension of feces in PBS was prepared, vigorously agitated, and centrifuged at  $2,000 \times g$  for 5 min. RNA was extracted from 150  $\mu$ l of the supernatant obtained after centrifugation as described above, and 5  $\mu$ l of this RNA suspension was used for one-step real-time RT-PCR.

**Statistical analyses.** Statistical differences between parental 43c and G1217D mutant behaviors were assessed by using the Student *t* test. Additionally, statistical differences in percentages and RNA copy numbers of

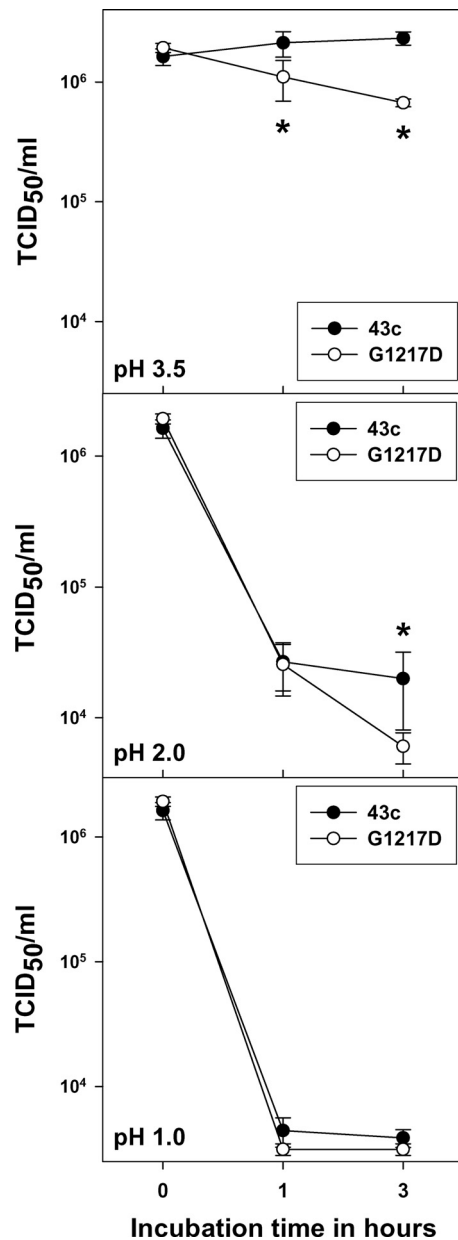


FIG 1 Comparative stability of HAV parental 43c and G1217D mutant strains under different acid conditions. Statistical analyses to compare the behaviors of both strains were performed for each pH condition and at each sampling time. Asterisks indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between the 43c and G1217D mutant strains at a given sampling time.

a given strain along time were also ascertained. RNA copy numbers are expressed as means  $\pm$  standard errors.

## RESULTS

**Comparative stability of 43c and G1217D mutant strains of HAV to acid pH, biliary salts, and trypsin.** A comparative analysis of the stability of the parental 43c and G1217D mutant strains in the presence of acid pH, trypsin, and biliary salts was performed. Both strains were highly resistant to acid pH, although the G1217D mutant was somewhat more sensitive ( $P < 0.05$ ) than the parental 43c strain (Fig. 1). After 3 h at pH 3.5, the G1217D mu-



TABLE 1 Hemagglutination of parental 43c strain and H7C27 escape mutant (G1217D) viruses

Strain	No. of viruses able to hemagglutinate $10^6$ erythrocytes (hemagglutination unit) <sup>a</sup>		
	Human O erythrocytes		Wistar rat erythrocytes at pH 7.2
	pH 5.5	pH 7.2	
43c	$2.5 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^{6a}$	$4.7 \times 10^6 \pm 3.0 \times 10^{6a}$	$3.6 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^{6a}$
G1217D mutant	$1.1 \times 10^5 \pm 0.8 \times 10^{5b}$	$1.3 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^{5b}$	$4.4 \times 10^5 \pm 3.4 \times 10^{5b}$

<sup>a</sup> Different superscript letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between the 43c parental strain and the G1217D mutant.

tant showed a reduction of  $0.43 \pm 0.07 \log_{10}$ , while the 43c strain was not affected. After 3 h at pH 2, the 43c strain showed a reduction of  $1.94 \pm 0.34 \log_{10}$  and the G1217D mutant showed a reduction of  $2.50 \pm 0.22 \log_{10}$ , and after 3 h at pH 1, reductions of  $2.40 \pm 0.10$  and  $2.73 \pm 0.12 \log_{10}$ , respectively, were observed. Resistance to both 1% biliary salts and 0.25% trypsin was also evaluated, and in both cases, reductions of  $<1 \log_{10}$  were detected, with no statistical differences between strains.

**Differential hemagglutination pattern between 43c and G1217D mutant strains of HAV.** The hemagglutination capacities of the 43c and G1217D mutant strains are shown in Table 1. The hemagglutination unit of human erythrocytes was significantly higher ( $P < 0.05$ ) for the 43c parental strain than for the G1217D mutant strain at both acid and neutral pHs, with an average difference of  $1 \log_{10}$ . To ascertain whether this higher erythrocyte binding capacity of the G1217D mutant strain, which is associated with the G217D substitution of the VP1 protein, could be related to an increased clearance from blood, the Wistar rat was used as an *in vivo* model. Previously, the capacity of both viral strains to hemagglutinate rat erythrocytes was tested at physiological pH. In this scenario, the hemagglutination unit of the 43c strain was also significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of the G1217D mutant, again with an average difference of  $1 \log_{10}$ . These differences in hemagglutination capacity were not due to differences in the total virus/infectious virus ratios of both strains, whose values are not statistically significantly different ( $P < 0.05$ ) ( $76 \pm 59$  and  $49 \pm 34$  for the parental and mutant strains, respectively).

**Differential blood clearance pattern and biodistribution of 43c and G1217D mutant strains of HAV.** The differential blood clearance of the 43c parental and G1217D mutant strains was ascertained by quantifying the viral genome half-life in serum after virus inoculation into Wistar female adult rats. After an initial abrupt drop in genome copies observed with both strains at 5 min p.i., due to virus distribution in the whole blood volume as well as nonspecific trapping in blood cells, subsequent virus decay in serum was more rapid for the G1217D mutant than for the 43c parental strain, with a significantly ( $P < 0.05$ ) more pronounced slope of the curve during the first 30 min p.i. (Fig. 2A). Accordingly, virus particles of the G1217D mutant moved specifically from the serum compartment to the erythrocyte compartment, showing an increase of cell-bound viruses of  $0.56 \pm 0.22 \log_{10}$  from 15 to 30 min p.i. (Fig. 2B). In contrast, those particles of the 43c parental strain that were nonspecifically trapped in the blood cells at 15 min p.i. were further released, with a decrease of bound viruses of  $-0.88 \pm 0.41 \log_{10}$  (Fig. 2B) from 15 to 30 min p.i. This difference, i.e., an increase and a decrease of the bound viruses of the G1217D mutant and 43c parental strains, respectively, was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Overall, the estimated half-lives of the G1217D mutant and 43c parental strains in serum were 8 and 17 min, respectively.

To address whether blood clearance efficiency plays any role in pathogenesis, the tissue distribution of the 43c and G1217D mutant strains was studied (Fig. 3). At 48 h p.i., both strains were present in the liver, but at significantly ( $P < 0.05$ ) different levels,

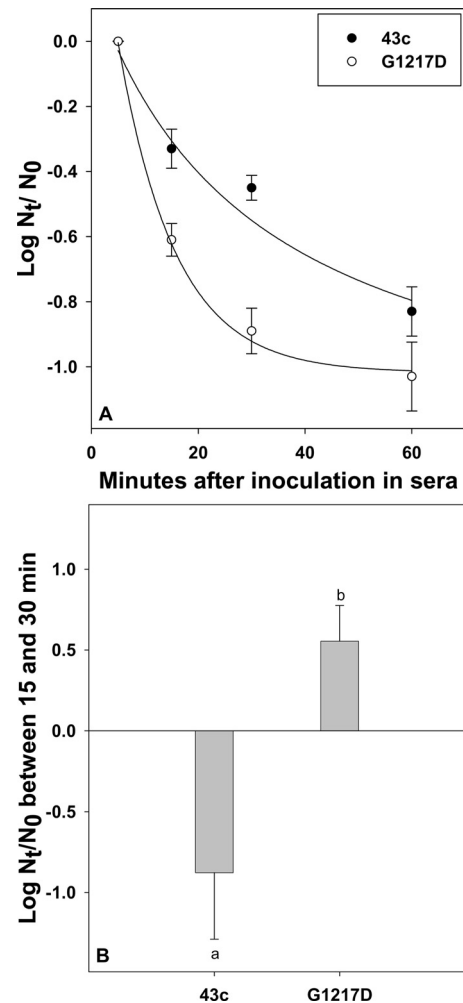


FIG 2 Comparative kinetics of clearance from blood of HAV parental and G1217D mutant strains. Rats were injected intravenously with 1 ml of virus at  $10^8$  genome copies/ml via the tail vein. Blood (200 to 300  $\mu$ l) was obtained through the saphenous vein at 1, 5, 15, 30, and 60 min p.i., and virus genome copy numbers in both blood compartments (serum and blood cells) were determined. (A) Genome copy number decay in serum, expressed as the  $\log_{10}(N_t/N_0)$  value, where  $N_t$  is the genome copy number at 15, 30, or 60 min p.i. and  $N_0$  is the genome copy number at 5 min p.i. Curves were fitted by nonlinear regression with SigmaPlot (SPSS, Chicago, IL). (B) Genome copy number variation in blood cells between 15 and 30 min p.i., expressed as the  $\log_{10}(N_t/N_0)$ , where  $N_t$  is the genome copy number at 30 min p.i. and  $N_0$  is the genome copy number at 15 min p.i. Different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

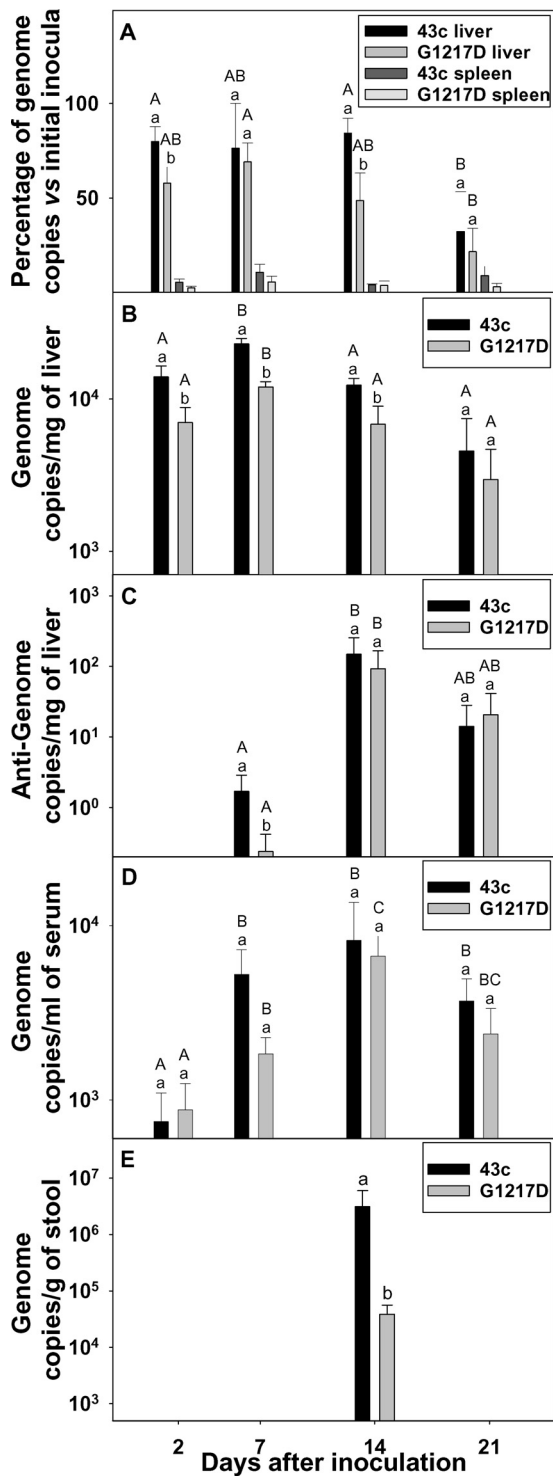


FIG 3 Comparative biodistribution, replication, and elimination of HAV parental and G1217D mutant strains. (A) Percentages of initial virus inocula in the liver and spleen at different times p.i., measured via genome copies (positive-strand RNA). (B) Genome copy numbers (positive-strand RNA) in the liver at different times p.i. (C) Antigenome copy numbers (negative-strand RNA) in the liver at different times p.i. (D) Genome copy numbers (positive-strand RNA) in serum at different times p.i. (E) Genome copy numbers (positive-strand RNA) in stool at different times p.i. Different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). Lowercase letters indicate comparison between both strains at a given sampling time. Capital letters indicate comparison at different sampling times for a given strain.

with averages of around 77% and 59% of the total inoculated genomes for the 43c and G1217D mutant strains, respectively (Fig. 3A). Only around 5% of the inoculated viruses were detected in the spleen (Fig. 3A) throughout the study period, with no differences between strains. After 1 week p.i., the percentage of inoculated 43c in the liver remained unchanged, while that of the G1217D mutant increased to 69%. At 14 days p.i., these percentages were again significantly different: 84% and 49% for the 43c and G1217D mutant strains, respectively. Thereafter, the decline was clear for both strains, with only 32% and 22% of the initial inocula at 21 days p.i. for the 43c and G1217D mutant strains, respectively.

HAV may reach the liver in at least two different compartments: (i) erythrocyte bound and able to be phagocytosed by Kupffer cells of the reticuloendothelial system in the liver and (ii) free and able to infect both Kupffer cells and hepatocytes. Thus, the total number of genomes in the liver must be the result of the number of viruses reaching the organ (by means of any of the aforementioned ways), their increase due to replication (mainly after a period of weeks), and their elimination. The obtained data indicated a delay of the G1217D mutant strain in reaching the liver as well as a more rapid elimination from it than that of the 43c parental strain, which could be related to its higher level of erythrocyte binding. To confirm this hypothesis, replication of both strains in the liver was also studied through the increase of the positive-strand and, particularly, negative-strand RNA titers. At 1 week p.i., titers of positive-strand RNA were significantly ( $P < 0.05$ ) different:  $23,000 \pm 2,000$  copies/mg of liver and  $12,000 \pm 1,000$  copies/mg of liver for the 43c and G1217D mutant strains, respectively. Titers of negative-strand RNA were also significantly ( $P < 0.05$ ) different:  $1.70 \pm 1.20$  copies/mg of liver and  $0.24 \pm 0.18$  copy/mg of liver for the 43c and G1217D mutant strains, respectively (Fig. 3B and C). A similar trend was observed at 2 weeks p.i., with significantly ( $P < 0.05$ ) higher titers of positive-strand RNA for 43c ( $12,333 \pm 1,333$  copies/mg of liver and  $6,833 \pm 2,123$  copies/mg of liver for the 43c and G1217D mutant strains, respectively), while only slightly different levels of the negative-strand RNA ( $150 \pm 106$  copies/mg of liver and  $93 \pm 74$  copies/mg of liver for the 43c and G1217D mutant strains, respectively) were observed. The increase in negative-strand RNA copy numbers between days 7 and 14 p.i. clearly indicated replication. However, the replication level was low, and consequently, the expected increase in viremia as well as fecal excretion, although present, was also moderate. Regarding excretion in stools, HAV genomes were detected in only 30% of the inoculated rats and only at 2 weeks p.i., with titers of  $3.1 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^6$  genome copies/g and  $3.9 \times 10^4 \pm 1.8 \times 10^4$  genome copies/g for the 43c and G1217D mutant strains, respectively. This significant ( $P < 0.05$ ), 2-log difference in numbers of genome copies in stool reflects a more effective outcome of the 43c parental strain, likely due to a more effective way of reaching the target organ rather than more effective replication. A second experiment was performed in which fecal samples were collected daily during the interval between days 14 and 21 p.i. (Table 2 and Fig. 4). The total titers of genomic and antigenomic RNAs in the liver for the parental strain at 7 days p.i. were significantly higher than those for the G1217D mutant (Table 2). Virus excretion was detected in 60% and 33% of rats receiving the 43c parental and G1217D mutant strains, respectively. Viruses were detected from day 14 through day 17, with the highest titers at day 16, and the total number of genome copies

**TABLE 2** Total log<sub>10</sub> copy numbers of the 43c parental and G1217D mutant strains, inoculated untreated or after UV treatment

Strain, treatment	Total log <sub>10</sub> copy number <sup>a</sup>		
	Genomic RNA in liver at 7 days p.i.	Antigenomic RNA in liver at 7 days p.i.	Genomic RNA in feces at 14 to 17 days p.i.
43c, untreated	7.79 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.03 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.78 ± 0.51 <sup>a</sup>
43c, UV treated <sup>b</sup>	Undetectable	Undetectable	Undetectable
G1217D mutant, untreated	6.31 ± 0.63 <sup>b</sup>	2.36 ± 0.09 <sup>b</sup>	4.56 ± 0.38 <sup>b</sup>
G1217D mutant, UV treated <sup>b</sup>	Undetectable	Undetectable	Undetectable

<sup>a</sup> Superscript letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Detection at all sampling times, not simply at 7 days p.i. (data shown), gave negative results.

in feces during this window was significantly higher for animals receiving the parental strain than for those receiving the G1217D mutant strain (Table 2 and Fig. 4).

Inoculation of 10<sup>8</sup> genome copies of UV-inactivated strains never resulted in virus detection in the serum, liver, or feces at any sampling time, thus confirming that HAV RNA detection in the different body compartments and feces after inoculation of live strains indeed reflected virus replication, rather than turnover, in the Wistar rat model. However, the replication capacity was limited and very low. A further confirmation of replication was the generation during the course of infection in rats of mutations not present in the consensus sequence of the original population used for inoculation. Eighty percent of viruses isolated at 2 weeks p.i. from sera of rats inoculated with both the 43c parental and G1217D mutant strains showed replacements at position 12 of VP3. The replacement detected in the parental strain-derived isolates was A3012G. Among the G1217D mutant-derived isolates, two replacements were detected, namely, A3012G in one isolate and A3102V in two other isolates.

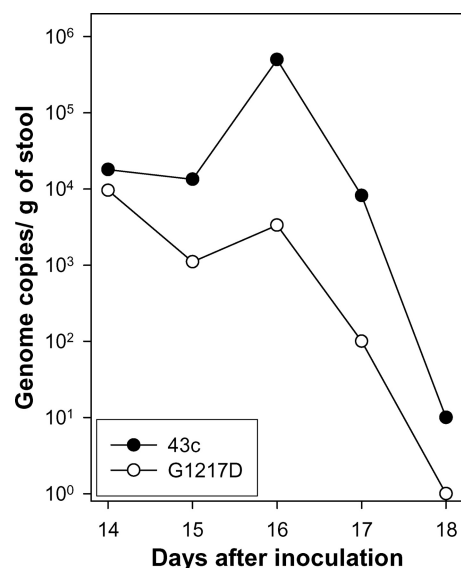
**In vivo competitive biodistribution of 43c and G1217D mutant strains of HAV.** To confirm the differential efficiency of both strains in reaching the liver, competitive biodistribution experiments were performed. The parental 43c strain clearly outcompeted the G1217D mutant strain in serum in the absence of specific antibodies (Fig. 5A and C). When both strains were inoculated at equal proportions (1:1), only 5 min was necessary to detect a significant ( $P < 0.05$ ) increase, from 50% ± 0% to 74% ± 10%, for the 43c strain and a decrease, from 50% ± 0% to 26% ± 10%, for the G1217D mutant strain (Fig. 5A). The larger proportion of the 43c strain in serum correlated with an almost complete dominance (94% ± 8%) of the same strain in the liver at 21 days p.i. (Fig. 5A). When the 43c and G1217D mutant strains were inoculated at a 1:9 proportion (Fig. 5C), the 43c strain again increased, from 10% ± 0% to 70% ± 10%, and the G1217D mutant decreased, from 90% ± 0% to 30% ± 9%, although 15 min was necessary to detect such changes in sera (Fig. 5C). Accordingly, in the liver, a proportion of 58% ± 25% strain 43c was observed at 21 days p.i. (Fig. 5C), in spite of its very low inoculated proportion (10% ± 0%). Only when specific antibodies against the glycoprotein A binding site were present (Fig. 5B and D) did the G1217D mutant strain (resistant to these antibodies) outcompete the 43c parental strain (sensitive to these antibodies) in serum, with an increase from 50% ± 0% to 70% ± 5% at 5 min when the starting ratio was 1:1 (43c:G1217D mutant) (Fig. 5B) and an in-

crease from 90% ± 0% to 95% ± 2% (Fig. 5D) when the starting ratio was 1:9 (43c:G1217D mutant). However, even under these conditions of immune clearance of the 43c parental strain, the clear dominance of the latter strain in reaching the liver was evident, since in the first case its proportion was 55% ± 20% (Fig. 5B) and in the second case it was 30% ± 7% (Fig. 5D).

The absolute genome copy numbers per ml of serum and per mg of liver were determined at 60 min and 21 days p.i., respectively, for all rats in each experiment, and the relative numbers of copies of each strain were inferred through the percentages of each strain. The data presented in Table 3 show again that despite the same number of genomes inoculated in each experiment, when most of them were of the mutant type (43c/G1217D mutant ratio of 1:9) the total number of genome copies/ml of serum at 60 min p.i. was statistically lower ( $P < 0.05$ ) than when equal proportions of the parental and mutant types (1:1) were inoculated. Additionally, only in the latter case did the H7C27 MAb have a statistically significant ( $P < 0.05$ ) effect on the total number of viruses in serum at 60 min p.i., due to its specific neutralization of the parental strain. However, this different effect of the H7C27 MAb depending on the initial ratio of both strains was not observed in the liver, likely due to the fact that the phenotype of resistance to this MAb shown by the G1217D mutant strain is masked by its higher rate of clearance from blood.

## DISCUSSION

From the antigenicity point of view, HAV is a highly stable virus. In fact, only one serotype has been described so far. However, this antigenic stability is not the result of low mutation frequencies in the capsid region, whose values ( $1 \times 10^{-3}$  to  $1 \times 10^{-4}$  substitution per nucleotide) are in the range of those for other picornaviruses (34), but of important structural and biological constraints (1, 2). Regarding the latter point, it is intriguing that some mutants with variations in the immunodominant site and very low *in vitro* fit-



**FIG 4** Kinetics of virus excretion in feces. Rats were inoculated with 10<sup>8</sup> genome copies of either the 43c parental HAV strain or the G1217D mutant, and feces was collected daily in the window period from day 14 to day 21. The excretion pattern of a single animal per group, which represents the average observed pattern, is shown.

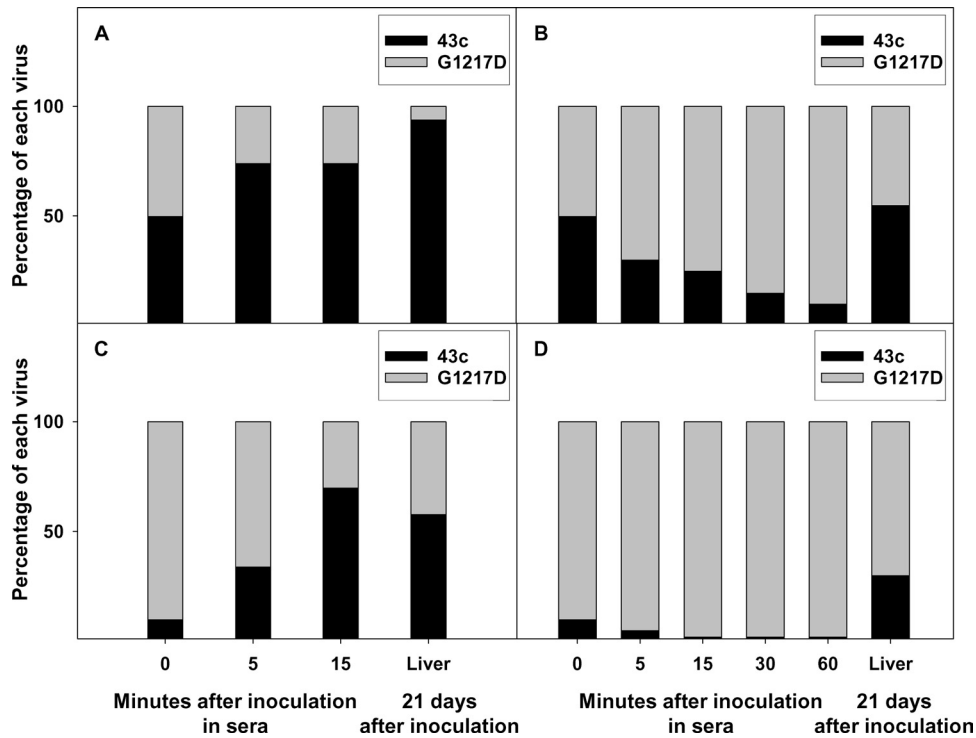


FIG 5 Growth competition experiments. The parental 43c strain of HAV and the G1217D mutant were inoculated into rats in the absence (A and C) or presence (B and D) of the H7C27 MAb, to which the G1217D mutant is resistant. The 43c/G1217D mutant ratios tested were 1:1 (A and B) and 1:9 (C and D). The mean proportion of each virus in serum was determined at different times p.i. (at 21 days p.i. for the liver).

ness compared to the parental virus have been isolated naturally from patients, while natural mutants with variations in the glycoprotein A binding site and similar *in vitro* fitness to that of the parental strain have never been described. This is probably related to the incomplete picture offered by *in vitro* assays to evaluate the actual *in vivo* fitness of a virus in its host, as reported very recently (39). Additionally, it has been documented that viral pathogenesis is determined in part by the spread of the virus in the organism to reach the target tissues (28, 38). In this sense, stability at acid pH, stability in the presence of biliary salts and trypsin, and blood clearance may be used as additional measures to predict the *in vivo* fitness outcomes of different HAV strains. While the first two factors may be tested easily in cell culture, determination of blood clearance kinetics requires an animal model. In the present study, Wistar rats were used as a suitable model, since our purpose was to

study not virus replication but virus biodistribution. Nevertheless, we indeed detected virus replication, although at an extremely low level and not associated with clinical manifestations as previously described for guinea pigs (15). Indications of HAV replication in rats were, on the one hand, the detection of the negative-strand RNA in the liver and, on the other hand, the generation of a mutation at residue 12 of VP3 (A3012G; A3012V) during the infection cycle in most of the animals. However, the definite confirmation of replication came from the fact that UV-light treatment of the same virus inocula (parental and mutant strains) rendered neither genomic RNA in the serum, liver, and feces nor antigenomic RNA in the liver. This replication potential, although limited, opened the possibility of comparing the *in vivo* fitness of both viral strains in the rat model, which, although not perfect, enabled us to gather information that provides a better overview of actual fit-

TABLE 3 Log<sub>10</sub> genome copy numbers per ml of sera at 60 min and per g of liver at 21 days after inoculation of different mixtures of the parental 43c and G1217D mutant strains<sup>a</sup>

Ratio of strain 43c to G1217D mutant	Serum data <sup>b</sup>			Liver data <sup>b</sup>		
	Absolute titer	Relative titer of 43c	Relative titer of G1217D mutant	Absolute titer	Relative titer of 43c	Relative titer of G1217D mutant
1:1	5.40 ± 0.10 <sup>a</sup>	5.30 ± 0.10	4.60 ± 0.10	3.20 ± 0.50 <sup>a</sup>	3.10 ± 0.50	2.7 ± 0.10
1:1 (with H7C27 MAb)	4.50 ± 0.10 <sup>b</sup>	3.50 ± 0.10	4.50 ± 0.10	2.10 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.90 ± 0.20	1.70 ± 0.30
1:9	4.80 ± 0.20 <sup>b</sup>	4.70 ± 0.20	4.10 ± 0.20	3.10 ± 0.30 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.40	2.60 ± 0.30
1:9 (with H7C27 MAb)	4.40 ± 0.10 <sup>b</sup>	3.30 ± 0.10	4.40 ± 0.10	2.30 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.70 ± 0.20	2.10 ± 0.20

<sup>a</sup> The different mixtures were inoculated into rats in the absence or presence of the H7C27 MAb, to which the G1217D mutant strain is resistant. Each rat received a 1-ml inoculum containing 8 log<sub>10</sub> genome copies/ml; in the 1:1 mixtures, there were 7.70 log<sub>10</sub> genome copies of each virus, and in the 1:9 mixtures, there were 7 log<sub>10</sub> genome copies of the 43c strain plus 7.95 log<sub>10</sub> genome copies of the G1217D mutant strain.

<sup>b</sup> Data are expressed as means ± standard errors. Different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).



ness. Overall, the results presented here show that the 43c parental strain has a higher fitness than the G1217D mutant in the rat model and that a small difference in the initial infectious virus input in the liver has a large effect on the final outcome. Only one mutation (G217D mutation in the VP1 protein) differentiates both viruses, with this mutation altering the hemagglutination capacity and leading to increased red blood cell binding of the G1217D mutant, thus indicating that the lower fitness could be due to a higher rate of clearance from serum. In fact, the G1217D mutant showed faster elimination from serum and a slower transit to the liver, while the parental 43c strain had the completely opposite behavior: slower removal from serum and faster transit to the liver. All of these observations indicate a relationship between the amount of “free” viruses and their biodistribution in the liver. This phenomenon may be explained by the greater accumulation of the G1217D mutant in erythrocytes, which later is phagocytosed by Kupffer cells during the elimination of senescent and/or altered erythrocytes (18). The seminal role of delayed blood clearance in the ability to reach the target organs has also been documented for some other viruses, such as mengovirus, Sindbis virus, and adeno-associated parvovirus, among others (6, 5, 19). For both mengovirus and Sindbis virus, highly virulent strains were associated with delayed blood clearances, with half-lives of around 30 min. In contrast, attenuated strains showed shorter half-lives of around 5 min. A similar pattern occurs in HAV, with half-lives of 17 and 8 min for the parental and G1217D mutant strains, respectively.

These results were further confirmed in competition experiments between both HAV strains, which proved the outcompetition capacity of the parental strain over the G1217D mutant in serum and its higher level of delivery to the liver. Even in the presence of antibodies able to specifically neutralize 90% of the inoculated parental virus, its proportion in the infected liver was highly remarkable. Since no differences in replication capacity between both strains have ever been observed either *in vitro* (data not shown) or in the *in vivo* model used, with negative-strand RNA copy numbers equivalent in both strains at 14 days p.i., the higher infectivity potential of the parental virus must rely, at least in part, on its smaller erythrocyte-bound fraction and hence its larger “free” virus fraction. Nevertheless, HAV replication in Wistar rats is extremely low compared to replication in chimpanzees (21). The kinetics of HAV replication in both models are quite similar, but the magnitude of replication is much lower in rats, mainly bearing in mind the ratio between the inoculated dose ( $10^8$  and  $10^7$  genomes in rats and chimpanzees, respectively) and animal weight. Genome copy numbers in the liver peaked during the first and the first and third weeks after inoculation in rats and chimpanzees, respectively, while in stool the peak was between the second and third weeks in both models. However, the genome copy numbers in the liver were 3 log lower, on average, in rats than in chimpanzees, and those in feces were between 2 and 3 log lower. This low replication capacity is likely due to an inefficient use of the putative receptor(s) present in rat hepatocytes. Since the inoculated viruses were produced in cell culture, viral particles were not IgA bound, and thus the use of the proposed asialoglycoprotein receptor (ASGPR) (10), which binds and internalizes IgA molecules, must be precluded. On the other hand, the occurrence of an ortholog of the hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1/TIM1) (17) in rats has been proven (24), and provided that it is expressed in hepatocytes, it could be used by HAV to infect liver cells. However, since it is not exactly the

same receptor molecule, the binding efficiency is predicted to be low. Due to the extremely low rate of replication, the rat model is not recommended for studies focused on virus-cell interactions, to avoid misleading conclusions. A reliable small-animal model would require adaptation of HAV to grow in such a model or the use of transgenic animals with a humanized liver.

RNA viruses are highly error prone and can use their replication infidelity to adapt to complex environments within an infected host (38). However, viral populations may experience bottlenecks, such as natural host barriers, which limit their diversity (20). Given that the initiation of a HAV infection of the liver must overcome so many bottlenecks, the final outcome is predicted to be highly dependent on the initial dose reaching the organ. HAV has consequently evolved by building a highly stable capsid in and out of the host body that escapes at least one main mechanism of blood clearance. Any mutant failing in one or several of these features will show a decrease in fitness and will be negatively selected in nature. Consequently, these bottlenecks may contribute to the low antigenic diversity of HAV. In this sense, it was also suggested in an earlier study that the immunodominant site of the HAV capsid is involved in receptor interactions and that replacements around this site are prevented due to the lack of fitness of the resulting mutants (22). However, while the specific mutation in the immunodominant site inducing the loss of fitness in chimpanzees reported in the mentioned study was D3070H, some simian isolates able to produce hepatitis A in macaques and African green monkeys bear a D3070A mutation (26, 37). The strains used in the present study (parental and mutant) also bear the D3070A mutation. However, after sequencing of the corresponding genomic region of all viruses isolated from sera of all available rats inoculated with both the 43c parental and G1217D mutant strains at 2 weeks p.i., the reversion of this mutation was not detected (data not shown). The role of the mutation at residue 12 of VP3 detected in most viruses isolated at 2 weeks p.i. from rats inoculated with either the 43c parental strain or the G1217D mutant is unknown, although this position is highly variable as concluded from *in vitro* quasispecies analyses (1). Altogether, these data indicate how critical the balance between antigenic variation, selective constraints, and virus fitness is.

Although it is tempting to speculate that the G1217D mutant may have an attenuated phenotype, the lack of clinical signs of disease in the rat model and the fact that there is not always a correlation between fitness and virulence (13) prevent us from drawing this conclusion.

Overall, this example reflects how a mutation may be far from neutral even when the virus does not present any disadvantage in terms of replication, due to the complex network of the biological cycle. Other examples probably exist regarding the loss of fitness due to less stable capsids in scenarios of different biological bottlenecks and prove once more that RNA viruses live on the edge of error catastrophe (3, 9).

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the Ministry of Economy (projects BIO2008-01312 and BIO2011-23461, respectively), by Generalitat de Catalunya project 2005SGR00966, and by the Biotechnology Reference Network (XRB).

## REFERENCES

- Aragonès L, Bosch A, Pintó RM. 2008. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J. Virol.* 82:1688–1700.
- Aragonès L, Guix S, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. 2010. Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. *PLoS Pathog.* 6:e1000797. doi:10.1371/journal.ppat.1000797.
- Biebricher CK, Eigen M. 2005. The error threshold. *Virus Res.* 107:117–127.
- Bishop NE, Hugo DL, Borovec SV, Anderson DA. 1994. Rapid and efficient purification of hepatitis-A virus from cell-culture. *J. Virol. Methods* 47:203–216.
- Byrnes AP, Griffin DE. 2000. Large-plaque mutants of Sindbis virus show reduced binding to heparan sulfate, heightened viremia, and slower clearance from the circulation. *J. Virol.* 74:644–651.
- Campbell JB, Buera JG, Tobias FM. 1970. Influence of blood clearance rates on interferon production and virulence of Mengo virus plaque mutants in mice. *Can. J. Microbiol.* 16:821–826.
- Costafreda MI, Bosch A, Pinto RM. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3846–3855.
- Costa-Mattioli M, et al. 2002. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol.* 76:9516–9525.
- Domingo E, Holland JJ. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:151–178.
- Dotzauer A, et al. 2000. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J. Virol.* 74:10950–10957.
- Gabrieli R, et al. 2004. Hepatitis in Albanian children: molecular analysis of hepatitis A virus isolates. *J. Med. Virol.* 72:533–537.
- Gagneux P, Varki A. 1999. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 9:747–755.
- Herrera M, Grande-Perez A, Perales C, Domingo E. 2008. Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J. Gen. Virol.* 89:232–244.
- Hollinger FB, Emerson SU. 2007. Hepatitis A virus, p 911–947. *In* Knipe DM, et al (ed), *Fields virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Hornei B, et al. 2001. Experimental hepatitis A virus infection in guinea pigs. *J. Med. Virol.* 64:402–409.
- International Committee on Taxonomy of Viruses, Van Regenmortel MHV, International Union of Microbiological Societies Virology Division. 2000. Family: Picornaviridae, p 657–678. *In* *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA.
- Kaplan G, et al. 1996. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 15:4282–4296.
- Khansari N, Fudenberg HH. 1983. Immune elimination of autologous senescent erythrocytes by Kupffer cells in vivo. *Cell. Immunol.* 80:426–430.
- Kotchey NM, et al. 2011. A potential role of distinctively delayed blood clearance of recombinant adeno-associated virus serotype 9 in robust cardiac transduction. *Mol. Ther.* 19:1079–1089.
- Kuss SK, Etheredge CA, Pfeiffer JK. 2008. Multiple host barriers restrict poliovirus trafficking in mice. *PLoS Pathog.* 4:e1000082. doi:10.1371/journal.ppat.1000082.
- Lanford RE, et al. 2011. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:11223–11228.
- Lemon SM, et al. 1990. In vivo replication and reversion to wild type of a neutralization-resistant antigenic variant of hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.* 161:7–13.
- Martin A, Lemon SM. 2006. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* 43:S164–S172.
- McIntire JJ, et al. 2001. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat. Immunol.* 2:1109–1116.
- Nainan OV, Brinton MA, Margolis HS. 1992. Identification of amino-acids located in the antibody-binding sites of human hepatitis A virus. *Virology* 191:984–987.
- Nainan OV, Margolis HS, Robertson BH, Balayan M, Brinton MA. 1991. Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* 72:1685–1689.
- Perez-Sautu U, et al. 2011. Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 17:734–738.
- Pfeiffer JK, Kirkegaard K. 2006. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:5520–5525.
- Ping LH, Lemon SM. 1992. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J. Virol.* 66:2208–2216.
- Pinto RM, et al. 1998. Enhancement of the immunogenicity of a synthetic peptide bearing a VP3 epitope of hepatitis A virus. *FEBS Lett.* 438:106–110.
- Pinto RM, et al. 2002. Hepatitis A virus polyprotein processing by *Escherichia coli* proteases. *J. Gen. Virol.* 83:359–368.
- Pinto RM, Costafreda MI, Bosch A. 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7350–7355.
- Sanchez G, et al. 2004. Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycoprotein A of the erythrocyte membrane. *J. Virol.* 78:9807–9813.
- Sanchez G, Bosch A, Gomez-Mariano G, Domingo E, Pinto RM. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315:34–42.
- Sanchez G, Bosch A, Pinto RM. 2003. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J. Virol.* 77:452–459.
- Sanchez G, Pinto RM, Vanaclocha H, Bosch A. 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 40:4148–4155.
- Tsarev SA, Emerson SU, Balayan MS, Ticehurst J, Purcell RH. 1991. Simian hepatitis A virus (HAV) strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *J. Gen. Virol.* 72:1677–1683.
- Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439:344–348.
- Wargo AR, Kurath G. 2011. In vivo fitness associated with high virulence in a vertebrate virus is a complex trait regulated by host entry, replication, and shedding. *J. Virol.* 85:3959–3967.



## 5.2. ARTICLES RELACIONATS AMB EL TREBALL DE TESI

Sánchez, G., Aragonès, L., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R.R. 2004. Capsid region involved in the hepatitis A virus binding to the glycoporphin A of the erythrocyte membrane. *Journal of Virology*, 78: 9807-9813.

Pintó, R.M., Alegre, D., Dominguez, A., El-Senousy, W-M., Sánchez, G., Villena, C., Costafreda, M.I., Aragonès, L., Bosch, A. 2007. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiology and Infection*, 135: 270-273.

Pintó, R.M., Aragonés, L., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A. 2007. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Research*, 127: 158-163.

Pintó, R.M., Costafreda, M.I. & Bosch, A. 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of Hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7350-7355.

Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Pérez-Rodríguez, F.J., D'Andrea, L. & Bosch, A. 2010. Hepatitis A virus: state of the art. *Food and Environmental Virology*.

Pérez-Sautu, U., Costafreda, M.I., Lite, J., Sala, R., Barrabeig, I., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2011. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005–2009: Circulation of newly emerging strains. *Journal of Clinical Virology*, 52: 98-102.

Pintó, R.M., D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, F.J., Costafreda, M.I., Ribes, E., Guix, S. & Bosch, A. 2012. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiology*, 7: 1-15.



Sánchez, G., Aragonès, L., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A. & Pintó, R.R. 2004. Capsid region involved in the hepatitis A virus binding to the glycoporphin A of the erythrocyte membrane. *Journal of Virology*, 78: 9807-9813.



## Capsid Region Involved in Hepatitis A Virus Binding to Glycophorin A of the Erythrocyte Membrane

Glòria Sánchez,<sup>1</sup> Lluís Aragonès,<sup>1</sup> M. Isabel Costafreda,<sup>1</sup> Enric Ribes,<sup>2</sup>  
Albert Bosch,<sup>1\*</sup> and Rosa M. Pintó<sup>1</sup>

*Virus Entèrics, Department of Microbiology,<sup>1</sup> and Department of Cell Biology,<sup>2</sup>  
University of Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 22 January 2004/Accepted 16 May 2004

**Hepatitis A virus (HAV) has previously been reported to agglutinate human red blood cells at acidic pHs. Treatment of erythrocytes with different enzymes and chemical reagents indicated that HAV attachment is mediated through an interaction with sialylglycoproteins. HAV hemagglutination could be blocked by incubating the virus with glycophorin A, indicating that this sialylglycoprotein is the erythrocyte receptor. The number of receptors used was estimated to be around 500 per cell. At the same time, HAV-induced hemagglutination could also be blocked by either monoclonal antibody H7C27 or an anti-VP3(102-121) ascitic fluid, indicating that lysine 221 of VP1 and the surrounding VP3 residues lining the capsid pit are involved in HAV binding to erythrocytes.**

Hepatitis A virus (HAV) is a nonenveloped, positive-strand RNA virus classified as the type species of the genus *Hepatitisvirus* within the family *Picornaviridae* (45). Three types of intact antigenic HAV particles have been described: (i) RNA-containing capsids composed of proteins VP1, VP2, VP3, and possibly VP4 (virions); (ii) RNA-containing capsids composed of proteins VP1, VP0, and VP3 (provirions); and (iii) empty capsids with the same capsid composition as provirions but lacking RNA (procapsids) (8).

HAV has a limited number of antigenic sites. The immunodominant site, composed of closely clustered epitopes, is defined by two major groups of escape mutants that include residues 70, 71, and 74 of VP3 and residues 102, 171, and 176 of VP1 (29, 30). There is another, apparently distinct antigenic site represented by mutants at residue 221 of VP1, and an additional and still undefined third antigenic site to which no escape mutant has so far been isolated (29, 30). Several monoclonal antibodies (MAbs), such as K34C8, K24F2, and B5B3, are directed toward the immunodominant site, while MAbs H7C27 and MAK-4E7 are directed against the other two antigenic sites, respectively. Some of the epitopes contained in the immunodominant site, such as those defined by MAb K24F2, are detected in the first stages of capsid formation on the pentameric subunits, while others, such as those defined by MAb K34C8, are formed by structural changes during the assembly of pentamers into intact particles (40).

A class I integral membrane glycoprotein of unknown natural function has been independently isolated by two groups from AGMK cells (22) and from a hybrid marmoset-Vero cell line (2) and has been characterized as a receptor for HAV (havcr-1). Additionally, a human homologue of this HAV receptor (huhavcr-1) has been isolated from human liver and kidney cells (15), and although nothing is known about its

natural biological function, it has been reported to play a major role in T-cell helper differentiation and as an asthma determinant gene (27, 28). On the other hand, like other picornaviruses, HAV binds to the surfaces of human erythrocytes, causing hemagglutination (13, 14). This hemagglutination is optimally observed at pH 5.5.

In the present work, we describe the nature of the receptor and the virus residues involved in the attachment of HAV to the erythrocyte surface.

### MATERIALS AND METHODS

**Virus and cells.** The cytopathogenic HM-175 strain of HAV (courtesy of T. Cromeans, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga.) (11) was propagated in FRhK-4 cell monolayers. Concentrated viral stocks were obtained as previously described (9). Briefly, at 5 to 6 days postinfection, cells from a T-175 cm<sup>2</sup> flask were harvested by trypsin treatment, collected by centrifugation, resuspended in 500  $\mu$ l of NT buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1% NP-40 [pH 7.4]), and incubated for 30 min at room temperature. These lysed cell suspensions were centrifuged at 1,700  $\times$  g for 5 min, and the supernatants were again centrifuged at 13,000  $\times$  g for 5 min. Viruses recovered in the supernatants were submitted to three sonication cycles of 30 s at 60 W in the presence of 0.4% sodium dodecyl sulfate. Five hundred microliters of these concentrated viral stocks was layered onto a 5 to 45% sucrose gradient in TNMg buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> [pH 6.7]) and spun at 205,000  $\times$  g for 165 min. Fractions containing infectious virus (150S) and empty particles (70S) were identified both by determination of the refractive index and by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (33) consisting of HAV capture by a convalescent-phase serum (HCS-2) followed by detection with MAb K24F2 (for information concerning antibodies, see below). Positive fractions from six gradients were pooled (150S and 70S particles were pooled separately) and dialyzed against water to remove sucrose. Finally, both pooled samples were concentrated by ultracentrifugation at 229,600  $\times$  g for 4 h and resuspension in a final volume of 500  $\mu$ l.

Infectious fractions (150S) were quantified by determining the most probable number of cytopathogenic units per milliliter by infecting cell monolayers grown in 96-well microtiter plates (31).

**Antibodies.** Several HAV-specific MAbs were used: K34C8 and K24F2 (Commonwealth Serum Laboratories, Victoria, Australia); B5B3, generously provided by B. Ferns (University College London Medical School, London, United Kingdom); H7C27, generously provided by R. Decker (Abbot Laboratories, North Chicago, Ill.); and MAK-4E7, generously provided by B. Flehmig (University of Tübingen, Tübingen, Germany). A convalescent-phase serum, HCS-2, generously provided by R. Lluna (Hospital Militar, Barcelona, Spain) and the poly-

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Phone: (34) 934034620. Fax: (34) 934034629. E-mail: abosch@ub.edu.



clonal ascitic antibody anti-VP3(102-121), raised against the synthetic peptide comprising residues 102 to 121 of VP3 (32), were also used.

**Erythrocyte purification.** Human type-O erythrocytes (provided by the blood bank of the Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain) were purified on preformed self-generated gradients of Percoll (Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's specifications. The gradient was formed by spinning 10 ml of a 70% solution of Percoll in 150 mM NaCl at  $2,000 \times g$  for 15 min. Two milliliters of gradient material was removed from the bottom of the tube, and 2 ml of 50% heparinized blood in 150 mM NaCl was layered on top of the gradient. The sample was centrifuged for 5 min at  $400 \times g$ , the platelets on the top of the gradient were removed and replaced by saline, and the gradient was centrifuged again at  $800 \times g$  for 15 min. After separation of the erythrocyte-containing fraction, the cells were washed three times in Alsever's solution (2.05% [wt/vol] glucose, 0.8% sodium citrate, 0.055% citric acid, 0.42% NaCl [pH 6.7]), collected by centrifugation at  $500 \times g$  for 5 min, and resuspended in the same solution. Before the hemagglutination assays, erythrocytes were again washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) (0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) at pH 5.5 or 7.2.

**Number of HAV receptors on erythrocytes.** The number of HAV receptors on the erythrocyte membrane was estimated by flow cytometry. Briefly,  $10^5$  erythrocytes were incubated with different amounts of 150S particles for 2 h at  $4^\circ\text{C}$  in PBS (pH 5.5). Unbound viruses were removed by three washes with PBS (pH 7.2) containing 5% skim milk, and bound viruses were detected by incubation with two anti-HAV MAbs (K34C8 and K24F2, diluted 1:50,000 and 1:5,000, respectively, in PBS [pH 7.2]) for 2 h at  $4^\circ\text{C}$ . After three washes with PBS-5% skim milk, the erythrocytes were incubated with a fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse immunoglobulin G for 45 min at  $4^\circ\text{C}$ . Finally, PBS-washed cells were analyzed in a flow cytometer (Beckman Coulter XL). The forward-angle light scatter was used to select cell size, and the side-angle light scatter was used to selected shape and structure; consequently, only the subpopulation of intact erythrocytes was used for the fluorescence measurements. Cursor M, including the labeled erythrocytes, was defined. For the establishment of this cursor, erythrocytes incubated with the antibodies but without viruses were used as negative controls.

The multiplicity of adsorbed virus per erythrocyte (MOA) was calculated as the ratio between the number of infectious viruses (150S) added and the number of total erythrocytes. The assayed MOA values were 10, 40, and 200. The estimated number of HAV receptors per erythrocyte was calculated by dividing the number of erythrocytes included in cursor M by the number of infectious viruses added.

Statistical differences in the mean number of receptors and the mean percentage of positive erythrocytes obtained after incubation with different virus inocula were determined by analysis of variance.

**Hemagglutination assay.** Hemagglutination assays were performed in 96-well U-bottom plates. Serial twofold dilutions of 150S or 70S particles were made in PBS at pH 5.5 or 7.2. Twenty microliters of diluted particles was dispensed to each well, and 20  $\mu\text{l}$  of a 1% erythrocyte suspension at pH 5.5 or 7.2 was added, mixed, and incubated for 1 h at room temperature. Negative controls were also assayed by incubating 20  $\mu\text{l}$  of PBS with the same volume of the erythrocyte suspension under the same conditions. The hemagglutination titer was expressed as the reciprocal of the greatest dilution of HAV that caused complete agglutination of the erythrocytes (end-point dilution) in comparison with the negative controls. A hemagglutination unit was defined as the amount of particles present at the hemagglutination end-point dilution.

**Enzymatic treatments of erythrocytes.** One percent erythrocyte suspensions in PBS, at pH 7.2, were treated with agitation for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  with different concentrations of the following enzymes: 0.05 g of trypsin (1:250, from porcine pancreas; Difco)/ml, 0.1 mg of chymotrypsin (type I-S from bovine pancreas; Sigma)/ml, and 0.1 and 0.05 U of neuraminidase (type V from *Clostridium perfringens*; Sigma)/ml. Additionally, enzymatic treatments with 1.5, 0.5, and 0.05 mU of phospholipase C (type I from *C. perfringens*; Sigma)/ml and with 0.625 and 0.125 U of phosphatidylinositol-specific phospholipase C (from *Bacillus cereus*; Sigma)/ml were performed with agitation for 15 min at  $37^\circ\text{C}$ . After incubation, erythrocytes were washed three times in PBS at pH 5.5 and were used in hemagglutination assays as described above.

All hemagglutination titers were obtained in comparison to PBS-treated erythrocytes.

**Periodate treatment of erythrocytes.** Sodium periodate at final concentrations of 0.05 and 0.025 mM was added to 1% erythrocyte suspensions at pH 7.2 and incubated with agitation for 15 min at  $37^\circ\text{C}$ . An equal volume of 1% (vol/vol) glycerol was added at the end of the treatments to neutralize periodate, followed by three washes of the erythrocytes with PBS at pH 5.5. These treated erythro-

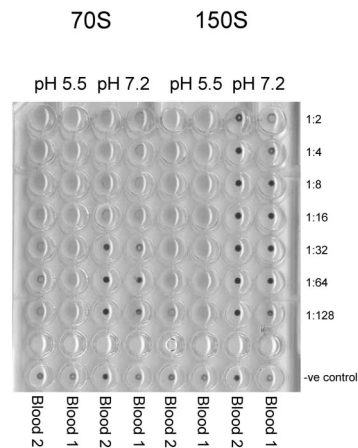


FIG. 1. Effect of pH on HAV hemagglutination. Two different human type-O erythrocytes were assayed with twofold dilutions of 150S or 70S HAV particles at pH 7.2 and 5.5.

cytes were used in hemagglutination assays in comparison with PBS-treated erythrocytes supplemented with glycerol.

**Incubation of HAV particles with heparan sulfate, chondroitin sulfate, and glycoporphin A.** Four and 8 hemagglutination units of HAV 150S and 70S particles were incubated with the glycosaminoglycans heparan sulfate and chondroitin sulfate, at concentrations of 0.2 and 0.02 mg/ml. Additionally, the same amounts of HAV particles were incubated with 250 and 25  $\mu\text{g}$  of the glycoprotein glycoporphin A (type MN; Sigma)/ml. All incubations were performed with agitation for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  at pH 5.5 and 7.2, and hemagglutination assays were performed at pH 5.5, with PBS-treated HAV particles as controls.

**Incubation of HAV particles with different antibodies.** HAV particles were incubated with several MAbs (K34C8, K24F2, B5B3, H7C27, and MAK-4E7) and with the anti-VP3(102-121) ascitic antibody. All incubations were performed with agitation at  $37^\circ\text{C}$  for 2 h, at pH 7.2, by using either 4 or 8 hemagglutination units, and subsequently, the antibody-blocked particles were used in hemagglutination assays at pH 5.5.

All antibodies were used at the highest dilution yielding maximum HAV recognition. Nonimmune ascitic fluids and the convalescent-phase HCS-2 serum were used as negative and positive controls, respectively.

In addition, in some experiments, the virus was incubated with 100  $\mu\text{g}$  of glycoporphin A/ml prior to antibody recognition.

**ELISAs.** A sandwich ELISA for recognition of 150S HAV particles was performed (10). Particles were captured by the HCS-2 convalescent-phase serum and detected with either MAb H7C27 or MAb K34C8. Mock-infected FRhK-4 cell extracts were used as negative controls.

Alternatively, a competitive ELISA in which the anti-VP3(102-121) antibody was preincubated with the virus for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  prior to being added to a microplate coated with the synthetic peptide VP3(102-121) was used to evaluate viral recognition by this antibody. A significant decrease in peptide recognition was indicative of viral recognition (10). Viruses were incubated with glycoporphin A prior to being recognized by anti-VP3(102-121) antibody. Under these conditions, a decrease in peptide recognition was indicative of a nonblocking effect of glycoporphin A, while a lack of decrease in peptide recognition was indicative of a blockage of antibody binding by glycoporphin A.

## RESULTS

**Hemagglutination of human erythrocytes by different HAV antigenic particles.** To study the hemagglutination capacities of the different antigenic HAV particles, sucrose-purified HAV fractions corresponding to infectious virus (150S virions and provirions), and empty particles (70S procapsids) were tested in hemagglutination assays at either a neutral (7.2) or an acidic (5.5) pH (Fig. 1). While 150S particles exhibited hemagglutination only at pH 5.5, 70S particles induced hemagglutination

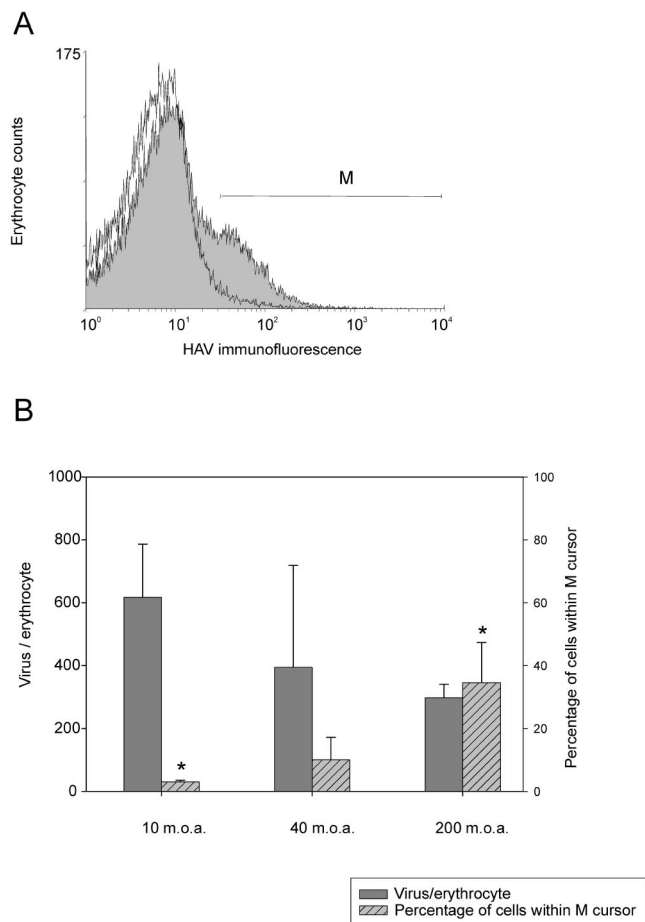


FIG. 2. Immunoflow cytometry detection of adsorbed HAV 150S particles on human erythrocytes. (A) Typical immunodetection experiment. Two curves are superimposed. The open curve on the left corresponds to erythrocytes in the absence of viruses but immunoassayed for HAV; the shaded curve on the right corresponds to erythrocytes with adsorbed viruses that were immunoassayed for HAV. Cursor M includes the subpopulation of erythrocytes with the highest fluorescence labeling. (B) The number of HAV receptors on the erythrocyte membrane and the percentage of erythrocytes with adsorbed HAV particles are plotted versus the viral inoculum added, or MOA. Asterisks indicate mean values that are significantly different ( $P < 0.05$ ).

at both neutral and acidic pHs, although more efficiently in the latter case.

**Number of HAV receptors on the erythrocyte surface.** In order to estimate the number of HAV receptors per erythrocyte, a fixed number of erythrocytes was incubated with different amounts of purified infectious virus particles (150S) and detected by an indirect immunofluorescence assay with MAbs K34C8 and K24F2, combined with cytometric quantitation. The immunolabeled cell population contained in cursor M (Fig. 2A) was used to determine the number of viral receptors per erythrocyte, which was around 500 ( $430 \pm 241$ ).

Analysis of several experiments using different theoretical inocula, i.e., MOA values of 10, 40, and 200, did not reveal significant differences in the number of adsorbed viruses per erythrocyte (Fig. 2B). However, statistically significant ( $P < 0.05$ ) differences were detected in the percentage of cells in the

M region, with a direct positive relation between the virus inoculum and the proportion of labeled cells.

**Effects of different erythrocyte treatments on HAV hemagglutination.** To characterize the nature of the receptor(s) to which HAV particles attach, erythrocytes were subjected to different chemical treatments such as trypsin digestion (which cleaves proteins at the carboxy peptide bonds of arginine and lysine residues),  $\alpha$ -chymotrypsin digestion (which cleaves proteins at the carboxy peptide bonds of aromatic residues), phospholipase C digestion (which hydrolyzes the phosphate bond on phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, and other glycerophospholipids), sodium periodate oxidation (which strongly oxidates carbohydrates), and neuraminidase digestion (which liberates *N*-acetylneuraminic acid). Treated erythrocytes were then tested in hemagglutination assays in comparison to nontreated cells.

Treatment of erythrocytes with either 50 mg of trypsin/ml or 1 mg of  $\alpha$ -chymotrypsin/ml led to different levels of hemagglutination inhibition, ranging from 0 to 100%, with regard to nontreated erythrocytes; this high degree of variability was associated with the blood batch tested. Thus, after trypsin treatment, the hemagglutination induced by 150S or 70S particles was not inhibited in 33 or 25% of the blood samples assayed, respectively, while the rest of the blood batches tested showed a mean inhibition of 79 or 73%, respectively. Regarding the treatment with  $\alpha$ -chymotrypsin, inhibition of the hemagglutination induced by both types of particles was observed, with means of 75 and 50%, respectively.

HAV-induced hemagglutination was dramatically inhibited (more than 90% reduction [Fig. 3]) after treatment of erythrocytes with sodium periodate, indicating a carbohydrate nature of the receptor(s). Three cell surface carbohydrates to which viruses commonly bind are sialic acid, heparan sulfate, and chondroitin sulfate. To assay whether the carbohydrate-dependent HAV hemagglutination required sialic acid, erythrocytes were treated with neuraminidase, which removes  $\alpha$ -2,3- and  $\alpha$ -2,6-linked sialic acid residues on the cell surface. Again, hemagglutination was severely decreased (Fig. 3). Interestingly, although procapsid-induced hemagglutination was very sensitive to the neuraminidase digestion of erythrocytes, it was remarkably more resistant than virion-induced hemagglutination. From these results it may be concluded that a sialylglycoprotein is involved in HAV hemagglutination.

Treatment of erythrocytes with the general phospholipase C (active against all glycerophospholipids) (Fig. 3) had no inhibitory effects on virion-induced hemagglutination, but in contrast, surprisingly, an increase in procapsid-induced hemagglutination was observed. Similarly, the phosphatidylinositol-specific phospholipase C showed no inhibitory effect (Fig. 3). These results exclude involvement in HAV hemagglutination of the decay-accelerating factor (DAF/CD55) or any other sialylglycoproteins anchored to the cell membrane through a glycosylphosphatidylinositol.

**Effects of different virus preincubations on HAV hemagglutination.** One of the sialylglycoproteins most frequently used by different viruses as an erythrocyte receptor is glycophorin A. To ascertain this possibility in the case of HAV, 4 or 8 hemagglutinating units of either virions or procapsids was preincubated with two different concentrations of glycophorin A, at either pH 5.5 or pH 7.2, just prior to the agglutination assay.

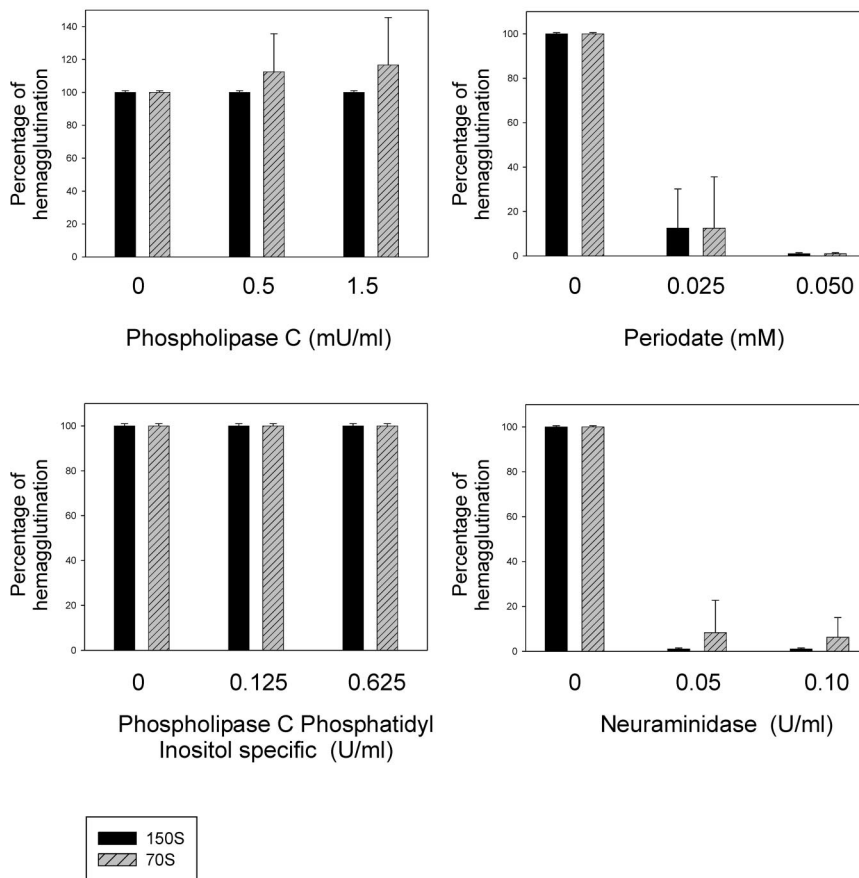


FIG. 3. Effects of several enzymatic and oxidation treatments of human erythrocytes on HAV-induced hemagglutination.

Treatment with the highest concentration (250  $\mu\text{g/ml}$ ) abolished the hemagglutination capacities of both viruses and procapsids (Fig. 4), independently of the concentration of virus particles used and the pH tested. At the lower concentration of glycophorin A (25  $\mu\text{g/ml}$ ), hemagglutination was also severely decreased in all cases, although residual activity was detected (Fig. 4). These results indicate that glycophorin A may act as an erythrocyte receptor for HAV.

In order to exclude any role of heparan sulfate and chondroitin sulfate as HAV receptors on the erythrocyte membrane, again 4 or 8 hemagglutinating units of either virions or procapsids was preincubated, at both pH 5.5 and pH 7.2, with each of these two glycosaminoglycans just before the agglutination assay. None of these pretreatments inhibited HAV hemagglutination.

**Mapping of the erythrocyte-interacting HAV residues.** A panel of different MABs was tested in order to elucidate the HAV residues involved in the erythrocyte-HAV interaction(s). Some MABs directed against the HAV immunodominant site, such as K24F2 (defined by Asp 70 and Ser 71 of VP3 [29, 30]), K34C8 (defined by Val 72 of VP3 [37]), and B5B3 (defined by Asp 70 of VP3 and Ser 102 of VP1 [30]), did not reduce the hemagglutination titer (Fig. 5). MAB MAK-4E7, whose defining residues are unknown (29, 30), also failed to affect HAV hemagglutination. In contrast, significant inhibition of hemagglutination was observed with MAB H7C27, which is defined by residue Lys 221 of VP1 (29, 30); the level of inhibition at this

antibody dilution was proportional to the number of virus particles (Fig. 5). Additionally, a similar degree of inhibition was observed after the virus was blocked with a convalescent-phase antiserum. The same results were obtained with the virion and procapsid HAV fractions (Fig. 5).

Since MAB H7C27 significantly inhibits (100%) HAV recognition by an antipeptide antibody against a linear B-T epitope defined by amino acids 102 to 121 of VP3 (10, 36), a new set of hemagglutination inhibition experiments was performed using an anti-VP3(102-121) antibody (32). Interestingly, this

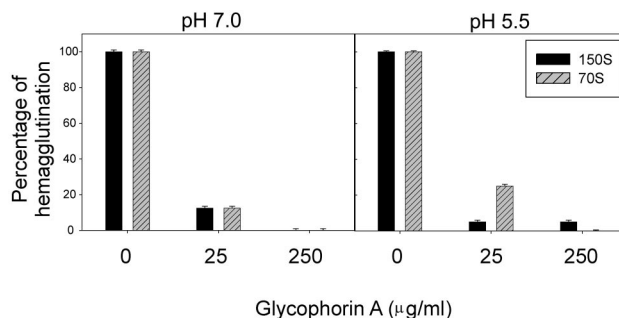


FIG. 4. Effect of glycophorin A virus-blocking treatments on HAV-induced hemagglutination (and hemagglutination units).

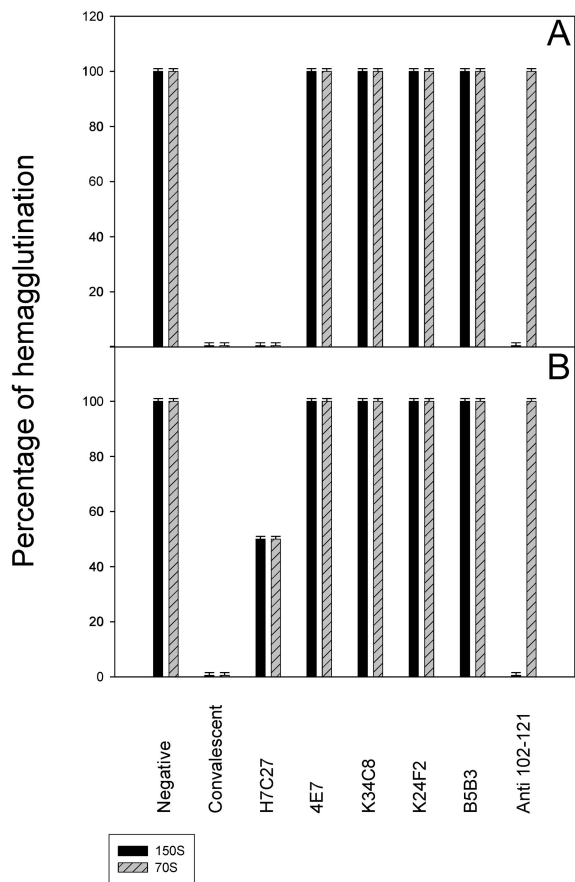


FIG. 5. Effects of several antibody blocking treatments on HAV-induced hemagglutination. Experiments used 4 (A) or 8 (B) hemagglutination units.

antibody could inhibit only virion-induced, not procapsid-induced, hemagglutination (Fig. 5), again suggesting the existence of differences in surface conformation between virions and procapsids.

To ascertain whether the HAV residues identified were actually interacting with glycoprotein A, 4 hemagglutination units of 150S HAV particles were preincubated with soluble glycoprotein A at 100 µg/ml and subsequently tested for their recognition by MAbs H7C27 and K34C8 or the anti-VP3(102-121) antibody. A reduction in the recognition of HAV by the MAbs in glycoprotein A-incubated particles relative to that in PBS-incubated particles was indicative of a close location of the residues involved in glycoprotein A binding and MAb binding. A significant reduction in recognition by MAb H7C27 (around 84%) was observed after incubation with glycoprotein A (Fig. 6). Preincubation of the virus with glycoprotein A caused a ~77% inhibition of anti-VP3(102-121) binding to virus (Fig. 6).

**DISCUSSION**

HAV can bind and agglutinate human type-O and -A erythrocytes (13, 14, 41); however, its erythrocyte receptor remains to be elucidated. HAV binding capacity was totally lost after treatment of erythrocytes with periodate. In some

blood batches, digestion with trypsin or chymotrypsin completely prevented hemagglutination, too, although in other blood batches, hemagglutination was still present. This striking behavior is likely to be due, on the one hand, to the different levels of glycosylation or the type of glucid added, which could alter protease accessibility, and, on the other, to the use of different sialic acid molecules, located before or after protease cleavage sites (1, 18). Nevertheless, overall, our data indicate that the HAV binding erythrocyte receptor is a glycoprotein.

Many viruses that bind to carbohydrates interact with sialic acid, heparan sulfate, or chondroitin sulfate. Among picornaviruses, enterovirus 70 (44), encephalomyocarditis virus (42), mengovirus (26), rhinovirus 87 (43), and persistent Theiler's virus (21, 46) use sialylglycoproteins as erythrocyte receptors, and foot-and-mouth disease virus (FMDV) (20) and neurovirulent Theiler's virus (35) use heparan sulfate as a receptor in several cells. In the case of HAV, since hemagglutination was mostly inhibited by neuraminidase treatment of erythrocytes and was not affected by incubation of viruses with either heparan sulfate or chondroitin sulfate, it could be concluded that the receptor is a sialylglycoprotein. Sialic acid residues are required in cellular receptors by many different viruses and may play either a direct role, as an integral part of the virus binding site on the receptor, or an indirect role, interacting with positively charged amino acid residues and holding the receptor in the required configuration for virus recognition.

Since HAV-induced hemagglutination was not inhibited by treatment of erythrocytes with phosphatidylinositol-specific phospholipase C, sialylglycoproteins anchored to the cell membrane through a glycosylphosphatidylinositol may be ruled out, and hence the involvement of DAF, one of the most frequently used sialylglycoprotein receptors in picornavirus infection and hemagglutination (5), was excluded. Another sialylglycoprotein frequently employed by hemagglutinating viruses is glycoprotein A (26, 42). The hemagglutination inhibition induced by preincubations of HAV particles with soluble glycoprotein A confirmed that HAV also uses this sialylglycoprotein as a receptor on human erythrocytes.

Since the number of adsorbed viruses per cell was not significantly enhanced by increasing the multiplicity of added viruses, it may be assumed that the number of receptors used

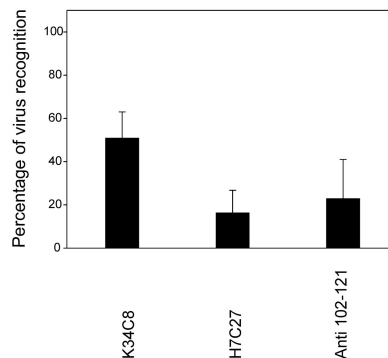


FIG. 6. Reduction of antibody virus recognition by glycoprotein A. Four hemagglutination units of 150S HAV particles was preincubated with soluble glycoprotein A at 100 µg/ml and subsequently tested for recognition by MAbs H7C27 and K34C8 or the anti-VP3(102-121) antibody.



per cell is rather low. This figure was estimated to be around 500. This value is quite similar to that reported for mengovirus (368) and fivefold lower than that calculated for enterovirus 70 (2,688), with glycophorin A used as an erythrocyte receptor by both picornaviruses (44).

Although HAV interacted with soluble glycophorin A at both neutral and acidic pHs, the results described here revealed a critical role of pH in the HAV-erythrocyte interaction. As a matter of fact, several HAV capsid modifications associated with low pH have been observed, such as the conversion of immature to mature virions, exposure of hydrophobic domains on the capsid surface, and cleavage of VP0 to VP2 (6, 7). Interestingly, virion-induced hemagglutination was more pH dependent than procapsid-induced hemagglutination, suggesting the occurrence of conformational differences between 150S and 70S particles in the capsid region involved in erythrocyte attachment. No actual crystallographic data exist on the structure of HAV, and only deduced models are available (25; M. Luo, personal communication). However, X-ray crystallography studies of several picornaviruses, such as poliovirus (3) and FMDV (12), revealed that the structural differences between empty capsids and mature viruses are mostly confined to the interior of the capsid. In poliovirus, the only significant differences described for the outer surface occur at positions 171, 233, and 244 of VP1 and at the carboxy terminus of VP3, where three amino acid residues are lost in the mature capsids (3). Additionally, it has been reported that lowering the pH to 4.6 causes substantial conformational changes to the pit area of mengovirus virions (23), including movements of the GH loop in VP1, the GH loop in VP3, and the carboxy-terminal region of VP2.

In order to map the capsid region involved in attachment to erythrocytes, several MAbs and a polyclonal anti-VP3(102-121) antibody were assayed for their abilities to inhibit HAV hemagglutination. MAb H7C27 could significantly inhibit the hemagglutination induced by both virions and procapsids. This MAb is directed against a region in the vicinity of residue Lys 221 of VP1, which is presumably located at the VP1 GH loop. Remarkably, this VP1 GH loop in poliovirus contains Ser 233, which aligns with Thr 222 of HAV, located contiguously to Lys 221 of HAV, and whose  $\alpha$ -carbon position is deviant in procapsid particles relative to the mature virion (3). As mentioned above, this loop undergoes a conformational change under acidic conditions in mengovirus. Assuming a similar phenomenon in HAV, it may be suggested that the acidic conformation is optimal for the virus-erythrocyte interaction, although the previously mentioned potential deviation of Thr 222 in empty capsids could enable its interaction with the receptor, even at a neutral pH. In the case of FMDV, this VP1 GH loop contains the RGD sequence, which is responsible for cellular attachment through an integrin interaction (16), and in poliovirus this loop contains residues 213 to 214 and 222 to 236, which interact with the poliovirus receptor (4). It is also noteworthy that only virion-induced hemagglutination was inhibited by the anti-VP3(102-121) antibody. Several residues of the amino-terminal and central regions of the sequence comprising amino acids 102 to 121 of VP3 are located close to both Thr 222 of VP1 and the carboxy terminus of VP3, whose conformation is likely to differ in procapsids and virions. Encephalomyocarditis virus and mengovirus bind to the sialic acid anchored to the

glycophorin A of erythrocytes (26, 42) through the HI loop of VP1, which is located at the icosahedral fivefold axis. In the case of HAV, the region involved in erythrocyte attachment seems to be located at or near the predicted pit (25).

One important unsolved question is the biological rationale of HAV attachment to human erythrocytes. Hemagglutination has been helpful in identifying cell-binding receptors for many viruses (19, 24, 34), and in the present case, glycophorin A has been identified as a binding receptor for HAV. However, glycophorin A seems to be found exclusively on the erythrocyte membrane, and thus its actual role on HAV pathogenesis is unclear, since the low pH of blood should be fatal under physiological conditions. Nevertheless, since HAV binds to soluble glycophorin A at both neutral and acidic pHs, a suboptimal attachment of HAV to erythrocytes may be expected to take place at a neutral pH, too. Additionally, capsid conformation "breathing" required for HAV attachment to erythrocytes may result from other conditions besides acidic pHs.

It has been suggested that erythrocyte glycoproteins may function as decoy receptors, attracting pathogens to the erythrocyte and keeping them away from target tissues (17). In this context, escaping from erythrocyte attachment may constitute an advantage for a viremic infectious agent whose target organ is the liver.

The receptors described for HAV (15, 22) are class I integral membrane glycoproteins comprising an extracellular domain, containing an N-terminal immunoglobulin-like cysteine-rich region (Cys-rich), followed by a threonine-, serine-, and proline-rich region (TSP-rich) (22). The Cys-rich region displays homology to members of the immunoglobulin superfamily, and the TSP-rich region has the characteristics of mucin-like glycoproteins (15). Although the Cys-rich region is necessary and sufficient for HAV binding (38), the TSP-rich region seems to have a major function in the virus-receptor interaction, leading to uncoating of the viral genome. It has been suggested that this mucin-like region may serve as a scaffolding for the Cys-rich region presentation or may interact directly with the viral particles (39). Assuming the latter situation and keeping in mind that glycophorin A is also a mucin-like glycoprotein, a similar interaction through sialic acid molecules could be postulated for the HAV-TSP-rich region interaction.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical expertise of the Serveis Científic-Tècnics of the University of Barcelona and the generosity of J. M. Hernandez of the Blood Bank of the Hospital Vall d'Hebron for providing us with blood samples.

This study was supported in part by grant BIO99-0455 from the CICYT, Madrid, Spain, grant 2001/SGR/00098 from the Generalitat de Catalunya, and the Centre de Biotecnologia de Catalunya (CeRBa) of the Generalitat de Catalunya.

#### REFERENCES

- Allaway, G. P., and A. T. H. Burness. 1986. Site of attachment of encephalomyocarditis virus on human erythrocytes. *J. Virol.* **59**:768-770.
- Ashida, M., and C. Hamada. 1997. Molecular cloning of the hepatitis A virus receptor from a simian cell line. *J. Gen. Virol.* **78**:1565-1569.
- Basavappa, R., R. Syed, O. Flore, J. P. Icenogle, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1994. Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* **3**:1651-1669.
- Belnap, D. M., B. M. McDermott, D. J. Filman, N. Cheng, B. L. Trus, H. J. Zuccola, V. R. Racaniello, J. M. Hogle, and A. C. Steven. 2000. Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:73-78.

5. Bergelson, J. M., M. Chan, K. R. Salomon, N. F. St. John, H. Lin, and R. W. Finberg. 1994. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6245-6249.
6. Bishop, N. E. 1999. Conformational changes in the hepatitis A virus capsid in response to acidic conditions. *J. Med. Microbiol.* **48**:443-450.
7. Bishop, N. E. 1999. Effect of low pH on the hepatitis A virus maturation cleavage. *Acta Virol.* **43**:291-296.
8. Bishop, N. E., and D. A. Anderson. 2000. Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. *J. Virol.* **74**:3423-3426.
9. Bishop, N. E., D. L. Hugo, S. V. Borovec, and D. A. Anderson. 1994. Rapid and efficient purification of hepatitis A virus from cell culture. *J. Virol. Methods* **47**:203-216.
10. Bosch, A., J. F. González-Dankaart, I. Haro, R. Gajardo, J. A. Pérez, and R. M. Pintó. 1998. A new continuous epitope of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* **54**:95-102.
11. Cromeans, T., M. D. Sobsey, and H. A. Fields. 1987. Development of a plaque assay for a cytopathogenic, rapidly replicating isolate of a hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* **22**:45-56.
12. Curry, S., E. Fry, W. Blakemore, R. Abu-Ghazaleh, T. Jackson, A., King, S. Lea, J. Newman, and D. Stuart. 1997. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **71**:9743-9752.
13. Dubois, D. R., L. N. Binn, P. L. Summers, R. L. Timchak, D. A. Barvir, R. H. Marchwicki, and K. H. Eckels. 1990. Preparation of non-infectious hepatitis A virus hemagglutinin for detecting hemagglutination inhibition antibodies. *J. Virol. Methods* **28**:299-304.
14. Eckels, K. H., P. L. Summers, and D. R. Dubois. 1989. Hepatitis A virus hemagglutination and a test for hemagglutination inhibition antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1375-1376.
15. Feigelstock, D., P. Thompson, P. Mattoo, Y. Zhang, and G. G. Kaplan. 1998. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J. Virol.* **72**:6621-6628.
16. Fox, G., N. R. Parry, P. V. Barnett, B. McGinn, D. J. Rowlands, and F. Brown. 1989. The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J. Gen. Virol.* **70**:625-637.
17. Gagneux, P., and A. Varki. 1999. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* **9**:747-755.
18. Gardner, B., S. F. Parsons, A. H. Merry, and D. J. Anstee. 1989. Epitopes on sialoglycoprotein alpha: evidence for heterogeneity in the molecule. *Immunology* **68**:283-289.
19. Hutson, A. M., R. L. Atmar, D. M. Marcus, and M. K. Estes. 2003. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to H histo-blood group antigens. *J. Virol.* **77**:405-415.
20. Jackson, T., F. M. Ellard, R. A. Ghazaleh, S. M. Brookes, W. E. Blakemore, A. H. Corsteyn, D. I. Stuart, J. W. I. Newman, and A. M. Q. King. 1996. Efficient infection of cells in culture by type-O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **70**:5282-5287.
21. Jnaoui, K., M. Minet, and T. Michiels. 2002. Mutations that affect the tropism of DA and GDVII strains of Theiler's virus in vitro influence sialic acid binding and pathogenicity. *J. Virol.* **76**:8138-8147.
22. Kaplan, G., A. Totsuka, P. Thompson, T. Akatsuka, Y. Moritsugu, and S. M. Feinstone. 1996. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* **15**:4282-4296.
23. Kim, S., U. Boege, S. Krishnaswamy, I. Minor, T. J. Smith, M. Luo, D. G. Scraba, and M. G. Rossmann. 1990. Conformational variability of a picornavirus capsid: pH-dependent structural changes of Mengo virus related to its host receptor attachment site and disassembly. *Virology* **175**:176-190.
24. Krempl, C., M.-L. Ballesteros, G. Zimmer, L. Enjuanes, H.-D. Klenk, and G. Herrier. 2000. Characterization of the sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus by analysis of haemagglutination-deficient mutants. *J. Gen. Virol.* **81**:489-496.
25. Luo, M., M. G. Rossmann, and A. C. Palmenberg. 1988. Prediction of three-dimensional models for foot-and-mouth disease virus and hepatitis A virus. *Virology* **166**:503-514.
26. Mann, L. M., K. Anderson, M. Luo, and C. W. Bond. 1992. Molecular and structural basis of hemagglutination in mengovirus. *Virology* **190**:337-345.
27. McIntire, J., D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff. 2004. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Semin. Immunopathol.* **25**:335-348.
28. McIntire, J., S. E. Umetsu, A. Omid, M. Potter, V. K. Kuchroo, G. S. Barsh, G. J. Freeman, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff. 2001. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat. Immunol.* **2**:1109-1116.
29. Nainan, O. V., M. A. Brinton, and H. S. Margolis. 1992. Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus. *Virology* **191**:984-987.
30. Ping, L. H., and S. M. Lemon. 1992. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J. Virol.* **66**:2208-2216.
31. Pintó, R. M., J. M. Diez, and A. Bosch. 1994. Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses. *J. Med. Virol.* **44**:310-315.
32. Pintó, R. M., J. F. Gonzalez-Dankaart, G. Sánchez, S. Guix, M. J. Gómara, M. García, I. Haro, and A. Bosch. 1998. Enhancement of the immunogenicity of a synthetic peptide bearing a VP3 epitope of hepatitis A virus. *FEBS Lett.* **438**:106-110.
33. Pintó, R. M., S. Guix, J. F. González-Dankaart, S. Caballero, G. Sánchez, K. J. Guo, E. Ribes, and A. Bosch. 2002. Hepatitis A virus glycoprotein processing by *Escherichia coli* proteases. *J. Gen. Virol.* **83**:359-368.
34. Powell, R. M., T. Ward, I. Goodfellow, J. W. Almond, and D. J. Evans. Mapping the binding domains on decay accelerating factor (DAF) for haemagglutinating enterovirus: implications for the evolution of a DAF-binding phenotype. *J. Gen. Virol.* **80**:3145-3152.
35. Reddi, H. V., and H. L. Lipton. 2002. Heparan sulfate mediates infection of high-neurovirulence Theiler's viruses. *J. Virol.* **76**:8400-8407.
36. Sánchez, G., R. M. Pintó, and A. Bosch. 2004. A novel CD4<sup>+</sup> T-helper lymphocyte epitope in the VP3 protein of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* **72**:525-532.
37. Sánchez, G., R. M. Pintó, H. Vanaclocha, and A. Bosch. 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4148-4155.
38. Silberstein, E., G. Dveksler, and G. G. Kaplan. 2001. Neutralization of hepatitis A virus (HAV) by an immunoadhesin containing the cysteine-rich region of HAV cellular receptor-1. *J. Virol.* **75**:717-725.
39. Silberstein, E., L. Xing, W. van de Beek, J. Lu, H. Cheng, and G. G. Kaplan. 2003. Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin- and mucin-like regions. *J. Virol.* **77**:8765-8774.
40. Stapleton, J. T., V. Raina, P. L. Winokur, K. Walters, D. Klinzman, E. Rosen, and J. H. McLinden. 1993. Antigenic and immunogenic properties of recombinant hepatitis A virus 14S and 70S subviral particles. *J. Virol.* **67**:1080-1085.
41. Summers, P. L., D. R. Dubois, W. Houston Cohen, P. O. Macarthy, L. N. Binn, M. H. Sjogren, R. Snitbhan, B. L. Innis, and K. H. Eckels. 1993. Solid-phase antibody capture hemadsorption assay for detection of hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1299-1302.
42. Tavakkol, A., and A. T. H. Burness. 1990. Evidence for a direct role for sialic acid in the attachment of encephalomyocarditis virus to human erythrocytes. *Biochemistry* **29**:10684-10690.
43. Uncapher, C. R., C. M. DeWitt, and R. J. Colonno. 1991. The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology* **180**:814-817.
44. Utagawa, E. T., K. Miyamura, A. Mukoyama, and R. Kono. 1982. Neuraminidase-sensitive erythrocyte receptor for enterovirus type 70. *J. Gen. Virol.* **63**:141-148.
45. van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. 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 (ed.). 2000. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, Calif.
46. Zhou, L., Y. Luo, Y. Wu, and M. Luo. 2000. Sialylation of the host receptor may modulate entry of demyelinating persistent Theiler's virus. *J. Virol.* **74**:1477-1485.



Pintó, R.M., Alegre, D., Dominguez, A., El-Senousy, W-M., Sánchez, G., Villena, C., Costafreda, M.I., Aragonès, L., Bosch, A. 2007. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiology and Infection*, 135: 270-273.





## SHORT REPORT

# Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries

R. M. PINTÓ<sup>1</sup>, D. ALEGRE<sup>2</sup>, A. DOMÍNGUEZ<sup>3</sup>, W. M. EL-SENOUSY<sup>1</sup>,  
G. SÁNCHEZ<sup>1</sup>, C. VILLENÁ<sup>1</sup>, M. I. COSTAFREDA<sup>1</sup>, L. ARAGONÈS<sup>1</sup>  
AND A. BOSCH<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain*

<sup>2</sup> *Enteric Virus Laboratory, Serology Laboratory, Terrassa Health Consortium, Terrassa, Spain*

<sup>3</sup> *Department of Health and Social Security, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain*

(Accepted 13 April 2006; first published online 3 July 2006)

## SUMMARY

Molecular methods for the detection and typing of hepatitis A virus (HAV) strains in sewage were applied to determine its distribution in Cairo and Barcelona. The study revealed the occurrence of different patterns of hepatitis A endemicity in each city. The circulating strains characterized, whether in Cairo or Barcelona, were genotype IB. The effects of a child vaccination programme and the increase in the immigrant population on the overall hepatitis A occurrence in Barcelona were evaluated. While vaccination contributed to a significant decrease in the number of clinical cases, the huge recent immigration flow has probably been responsible for the re-emergence of the disease in the last year of study, in the form of small outbreaks among the non-vaccinated population.

The distribution patterns of hepatitis A in different geographical areas of the world are closely related to their socioeconomic development [1, 2]. The endemicity is low in developed regions and high in underdeveloped countries. An epidemiological shift, from high to low prevalence, has been noticed in recent decades in the countries of Southern Europe, including Spain, Italy and Greece [3–5]. Consequently, the Mediterranean basin as a whole should no longer be considered as an endemic area. Most northern shore countries are at present of low endemicity [3–5], although some of them, such as Albania, are still areas of high endemicity [6], while most southern/eastern shore countries are highly endemic, with exceptions such as Israel, where a clear epidemiological shifting is presently occurring [7]. However, due to the

great immigration flows from North Africa to Spain, Italy and France a new epidemiological pattern may emerge in the near future.

The epidemiological pattern has important implications on the average age of exposure and hence on the severity of the clinical disease. Since hepatitis A infection induces a life-long immunity [2], severe infections among adults are rare in highly endemic regions where most children are infected early in life, usually without clinical symptoms. In contrast, in low endemic areas the disease occurs mostly in adulthood, mainly as a consequence of travelling to endemic regions or as food- or water-borne outbreaks, and hence the likelihood of developing severe symptomatic illness is high.

Molecular epidemiology studies of hepatitis A virus (HAV) strains isolated from different countries, including low, intermediate and high endemic areas, reveal the circulation of dominant or even unique strains in highly endemic areas, in contrast with the

\* Author for correspondence: Dr A. Bosch, Department of Microbiology, University of Barcelona, Avda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.  
(Email: abosch@ub.edu)

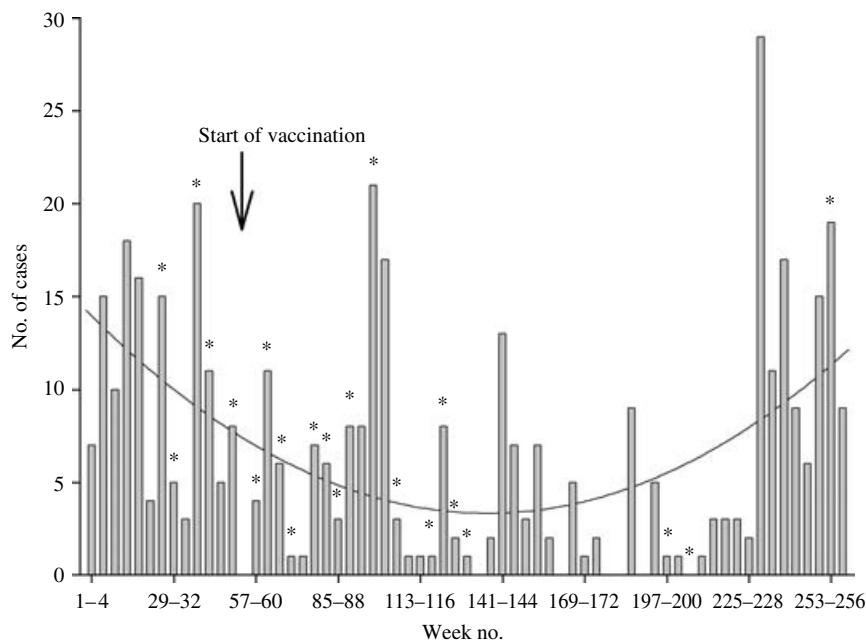
occurrence of mixed imported strains in conjunction with endemic strains in certain high-risk or ethnic groups in low endemic areas [2, 6, 8–12]. Optimal clinical specimens for the isolation and characterization of HAV strains include stool samples taken at the onset of jaundice [2] and serum samples obtained up to several weeks after the onset of symptoms [8, 11, 13, 14]. Since these types of samples are quite difficult to collect in high endemic areas, where most infections develop asymptotically, an attractive alternative that will detect the most abundant viral strains circulating in a given population is the analysis of raw sewage samples [15].

Raw sewage samples from three sewage treatment plants from Cairo (Balaks, Zenin and El Berka), were collected monthly from November 1998 to October 1999 ( $n=35$ ). Raw sewage from Sant Adrià del Besòs sewage treatment plant in Barcelona, was sampled twice a month during a period of ~4 years, from June 1998 to December 2002 ( $n=249$ ) with a gap between July and October 2000. Sewage samples were concentrated following previously described methods [15, 16], and RNA was purified from 50  $\mu$ l of the concentrated samples by guanidine thiocyanate extraction [17]. Generic HAV detection was performed as described elsewhere [14], based on the amplification by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) of a 172-nt fragment of 5′-NCR. Primers HAV240 (5′-GGAGAGCCCTGGAAGAA-AGA-3′, reverse primer) and HAV68 (5′-TCACCGC-CGTTTGCCTAG-3′, forward primer) were employed. PCR amplification products were confirmed by Southern blot hybridization with an internal digoxigenin-labelled probe (5′-TTAATTCCTGCA-GGTTTCAGG-3′). All positive samples were further characterized in order to establish their genotype. The previously published primers [10], –3285 (5′-AGTCACACCTCTCCAGGAAACTT-3′, reverse primer) and +2949 (5′-TATTTGTCTGTCACAGA-ACAATCAG-3′, forward primer) were used for the amplification of a fragment of the VP1X2A region containing an internal sequence (positions 3024–3191) of 168 bp that has been extensively used for genotyping [9, 10, 12, 14]. Sequencing of RT–PCR products was performed and multiple sequence alignments were carried out with the ClustalW program (European Bioinformatics Institute).

HAV was detected in 25 out of 35 sewage samples from Cairo (71%). A total lack of seasonal distribution was observed. Twenty-one out of 25 positive samples (84%) could be genotyped. All the strains

characterized were identical in the genotyping region and belonged to genotype IB (Genbank accession no. AY867867). However, if a longer positions 2984–3284) sequence is employed in the comparative analysis a certain degree of nucleotide variability up to 1.7% is observed. In Barcelona only 28 out of 249 sewage samples (11%) were HAV positive and only three out of these 28 could be genotyped and were of genotype IB. Two of these strains, isolated within a month's interval (Genbank accession no. AY867862), were identical while the third strain (Genbank accession no. AY867864), isolated 1½ years later, was 98% homologous with the former two. The homology between the isolated Cairo and Barcelona IB strains in the genotyping region was 97%. It is of note that genotype I was divided in subgenotypes IA and IB differing from each other at this particular region at ~7.5% [10]. The percentage of positive HAV detection in sewage samples from Cairo (71%) and Barcelona (11%) reflects the different infection patterns occurring in both cities. The actual situation in Cairo is the occurrence of high levels of asymptomatic excretors leading to the discharge of high numbers of viruses.

In contrast, the picture observed in Barcelona is the occurrence of low numbers of asymptomatic infections in conjunction with few acute cases and consequently a low level of virus spread. When sewage contamination is low, the detection of positive samples is a difficult task, because of technical limitations. For this reason, samples, positive only after Southern blot hybridization, are even more arduous to genotype. Positive sewage samples from Barcelona were more frequently of this type. In fact, the HAV genotyping threshold has been estimated to be  $10^5$  genomes/ml, a level quite difficult to achieve from raw sewage from a low endemic area, even after sewage concentration. Although the study in Barcelona exceeded 4 years, the positive sewage samples were not uniformly distributed during the overall period. The percentage of positivity was of 14.7, 11.7, 15.4, 5.9 and 6.7 for years 1998, 1999, 2000, 2001 and 2002 respectively. A significant decrease in sewage detection was observed after November 2000, which correlated with a progressive decline of the number of hepatitis A cases observed in Barcelona since the introduction of a vaccination programme [18] in October 1998 (Fig.). This campaign, which is still currently being implemented, is dedicated to the pre-adolescent population through the administration of vaccine to all children aged 12 years. A total of 137



**Fig.** Hepatitis A cases for the period 1998–2002 in Barcelona. Hepatitis A is a notifiable disease. Weeks 1–52 (1998); weeks 53–104 (1999); weeks 105–156 (2000); weeks 157–208 (2001); weeks 209–260 (2002). Raw sewage sampling started at week 25 with a gap between weeks 133–152. Asterisks denote positive detection of HAV in raw sewage.

cases were reported in 1998, 93 in 1999, 49 in 2000 and only 26 in 2001, representing attack rates per 100 000 inhabitants of 9.1, 6.2, 3.3 and 1.7 respectively. However, in spite of the continued vaccination programme, an abrupt increase was again detected in 2002 with a total of 127 cases (attack rate of 8.0), most of them in the form of small outbreaks among the non-vaccinated population, and mainly affecting school children aged <12 years and men having sex with men (MSM). The decline in the percentage of positive sewage samples appears to be delayed with respect to the decay of clinical cases, being only significant after 2 years of the vaccination programme. An explanation could be the fact that only children aged 12 years were vaccinated, resulting in children <12 years old being susceptible to asymptomatic infections and thus excreting the virus. In contrast, the increase in clinical cases observed throughout 2002 (Fig.) did not correlate with an increase in the percentage of HAV detection in sewage, probably due to the occurrence of several outbreaks, each caused by few cases, without an increase in asymptomatic infections. The unexpected increase in clinical cases after 2002 in Barcelona could be explained, in part, by the high immigration rates. These immigrants, reaching nearly 10% of the total population, and mainly from North Africa, represent a reservoir for the introduction of viruses with the immigrant

children aged <12 years as potential carriers of the infection. Many of the observed outbreaks are school related, and mostly coincide with the virus incubation period elapsed after the return from the school holiday, and after the immigrant population have returned from visits to their countries of origin.

Data from the occurrence of viruses in raw sewage may provide an overview of the epidemiology of virus infections circulating in the community, and at the same time, reveal the occurrence of asymptomatic infections. However, due to the kind of sample analysed, only those viruses that are more prevalent in the population, and thus excreted in higher numbers, are likely to be detected. This may be the case of the high endemicity of HAV strains in Cairo, with a single strain detected during the entire studied period. Although HAV, as an RNA virus, replicates in quasi-species dynamics [19], it must be pointed out that it presents a clear dominant master sequence, which coincides with the consensus sequence, together with minor sequences. Only the master sequences are likely to be recovered from sewage, which explains the low variability observed. Yet it is remarkable to point out that isolates from a recent outbreak (summer 2004) of hepatitis A involving European citizens returning from vacation at Hurghada in the Egyptian Red Sea, presented VP1X2A regions identical to the ones from

the Cairo strains isolated in the present study (data not shown).

Vaccination against hepatitis A in high-risk groups, including travellers to high endemic areas and MSM, as well as the inclusion of hepatitis A vaccines in mass vaccination programmes in those countries receiving high numbers of immigrants from endemic countries is recommended. However, bearing in mind the quasi-species replication pattern of HAV [19], another source of concern arises from the possibility of the selection of new antigenic variants escaping immune protection induced by vaccination.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the technical expertise of the Serveis Científic-Tècnics of the University of Barcelona. This study was supported in part by grants BIO2002-02625 from the Ministry of Education and Sciences, SP22-CT-2004-502571 and DG-Sanco 2003213 from the European Union, and 2001/SGR/00098 and the Centre de Biotecnologia de Catalunya (CeRBA) from the Generalitat de Catalunya.

#### DECLARATION OF INTEREST

None.

#### REFERENCES

1. **Gust ID.** Epidemiological patterns of hepatitis A in different parts of the world *Vaccine* 1992; **10** (Suppl. 1): S56–S58.
2. **Hollinger FB, Emerson SU.** Hepatitis A virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 4th edn. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001, pp. 799–840.
3. **Bonanni P.** Mass hepatitis A vaccination considered for Puglia, Italy. *Viral Hepatitis* 1999; **8**: 7.
4. **Salleras LI.** Catalonia, Spain introduces mass hepatitis A vaccination programme. *Viral Hepatitis* 1999; **8**: 3–4.
5. **Van Damme P, et al.** Current recommendations on HAV control in selected countries in Europe. *Viral Hepatitis* 1999; **8**: 12–13.
6. **Gabrieli R, et al.** Hepatitis in Albanian children: molecular analysis of hepatitis A virus isolates. *Journal of Medical Virology* 2004; **72**: 533–537.
7. **Shouval D.** Israel implements universal hepatitis A immunization. *Viral Hepatitis* 1999; **8**: 2.
8. **Arauz-Ruiz P, et al.** Presumed common source outbreaks of hepatitis A in an endemic area confirmed by limited sequencing within the VP1 region. *Journal of Medical Virology* 2001; **65**: 449–456.
9. **Costa-Mattioli M, et al.** Genetic variability of hepatitis A virus. *Journal of General Virology* 2003; **84**: 3191–3201.
10. **Robertson BH, et al.** Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology* 1992; **73**: 1365–1377.
11. **Tallo T, et al.** Sequential changes in hepatitis A virus genotype distribution in Estonia during 1994 to 2001. *Journal of Medical Virology* 2003; **70**: 187–193.
12. **Taylor MB.** Molecular epidemiology of South African strains of hepatitis A virus: 1982–1996. *Journal of Medical Virology* 1997; **51**: 273–279.
13. **Bowe WA, et al.** Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *Journal of Infectious Diseases* 2000; **182**: 12–17.
14. **Sánchez G, et al.** Molecular characterisation of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; **40**: 4148–4155.
15. **Villena C, et al.** Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; **69**: 3919–3923.
16. **Katzenelson E, Fattal B, Hostovesky T.** Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Applied and Environmental Microbiology* 1976; **32**: 838–839.
17. **Boom R, et al.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; **28**: 495–503.
18. **Dominguez A, et al.** Effectiveness of a mass hepatitis A vaccination program in preadolescents. *Vaccine* 2003; **21**: 698–701.
19. **Sánchez G, et al.** Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 2003; **315**: 34–42.

Pintó, R.M., Aragonés, L., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A. 2007. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Research*, 127: 158-163.



# Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus

Rosa M. Pintó<sup>a,\*</sup>, Lluís Aragonès<sup>a</sup>, M. Isabel Costafreda<sup>a</sup>,  
Enric Ribes<sup>b</sup>, Albert Bosch<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Virus Entèrics, Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Virus Entèrics, Department of Cell Biology, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain*

Received 10 January 2007; received in revised form 1 March 2007; accepted 7 April 2007

Available online 23 May 2007

## Abstract

Hepatitis A virus (HAV), the prototype of genus *Hepatovirus*, has many biological characteristics that distinguish it from other members of the *Picornaviridae* family. Among these it is worth of note the need for an intact eIF4G factor for the initiation of translation and thus the inability to shut down host protein synthesis by a similar mechanism as in other picornaviruses. Consequently, HAV must inefficiently compete for the cellular translational machinery and this may explain its poor growth in cell culture. In this context of virus/cell competition HAV has strategically adopted a naturally highly deoptimized codon usage. Accordingly, a low protein synthesis may be expected with those proteins involved in RNA replication existing at limiting concentrations. Thus, a very low translation rate and a very low RNA replication rate may play a role in escaping to host cell defenses, allowing the virus to grow in a quiescent way. This could explain the high specific infectivity of HAV in spite of its naturally deoptimized codon usage, which would indicate non-abortive infections due to the antiviral cell response. Additionally, the deoptimized codon usage conveys in the use of abundant and rare codons. Many clusters of such rare codons are present in the capsid surface playing a seminal role in the highly cohesive stability of the HAV virion. Thus, the slow translation rate, resulting from the accumulation of rare codons, is likely to contribute to the highly stable viral capsid necessary for a prolonged survival outside the host body.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Hepatitis A virus; Quasispecies; Translation; Codon usage

## 1. General features of hepatitis A virus

The hepatitis A virus (HAV), which belongs to genus *Hepatovirus* within family *Picornaviridae*, is a non-enveloped icosahedral virus of around 30 nm in diameter containing a positive ssRNA genomic molecule of 7.5 kb (Fauquet et al., 2005). The genome consists of an open reading frame (ORF) encoding a polyprotein of around 2225 amino acids preceded by a 5' non-coding-region (5'NCR) that makes around 10% of the total genome, and followed by a much shorter 3'NCR that contains a poly(A) tract (Baroudy et al., 1985; Cohen et al., 1987). This genome is uncapped but covalently linked to a small viral protein (VPg) (Weitz et al., 1986). The singly translated polyprotein is subsequently cleaved into 11 proteins through a cascade of proteolytic events brought about mainly by the viral 3C protease (Schultheiss et al., 1994, 1995). However, although the gen-

eral genomic organization and the expression pattern of HAV are very similar to those of most picornaviruses (Agol, 2002; Hollinger and Emerson, 2001), many differences exist which deserve a special attention.

## 2. Intriguing issues of the HAV RNA translation

The structure of the internal ribosome entry site (IRES) of HAV is unique among picornaviruses and constitutes the prototype of type III IRES (Braun et al., 1994; Ehrenfeld and Teterina, 2002) and additionally it shows a very low efficiency in directing translation (Whetter et al., 1994). It is likely that picornavirus IRESes have evolved by gradual addition of domains and elements that improved their function in ribosome recruitment or otherwise conferred regulation to the process of viral protein synthesis in a specific cell environment (Ehrenfeld and Teterina, 2002). Thus, an intriguing evolutionary question remains to be solved regarding the selection of such an inefficient IRES in HAV. An explanation has been suggested which accounts for the constraints caused by the need to accommodate the dual

\* Corresponding author. Tel.: +34 934034621; fax: +34 934034629.  
E-mail address: [rpinto@ub.edu](mailto:rpinto@ub.edu) (R.M. Pintó).



functions of translation and replication in adjacent regions of the 5'NCR, generating inadvertent consequences for either function (Ehrenfeld and Teterina, 2002).

HAV codes only for a protease, 3C, while other picornaviruses code for additional proteases such as the L protease, in genus *Aphthovirus*, or the 2A protease in *Enterovirus* and *Rhinovirus* genera (Leong et al., 2002). L and 2A proteases, when present, play a crucial role in the primary cleavages of the viral polyprotein while in those genera lacking these proteases, such *Hepatovirus* and *Paraechovirus*, both primary and secondary cleavages are conducted by the 3C protease. But what is most important is that these additional proteases are involved in the induction of cellular protein shutoff (Leong et al., 2002). Since picornaviruses utilize a mechanism of translation that is cap-independent and IRES-dependent, the inhibition of non-essential cap-dependent cellular translation could be advantageous to the virus. In doing so, the cellular translation machinery is utilized almost exclusively for the production of viral proteins (Kuechler et al., 2002). An early event preceding the shutoff of host cell protein synthesis is the cleavage of the cellular translation initiation factor eIF4G, and evidence exists supporting that the enzymes responsible of such a cleavage are 2A and L proteases in enterovirus and rhinoviruses, and aphthoviruses, respectively (Kuechler et al., 2002). An immediate consequence of the lack of any of these proteolytic activities in HAV is its incapacity to induce cellular shutoff which otherwise is directly related with its requirement for an intact uncleaved eIF4G factor for the formation of the initiation of translation complex (Borman et al., 1997; Jackson, 2002).

What has been described up to now denotes that HAV must inefficiently compete for the cellular translational machinery and thus it presents a unique translation strategy. This points out to another difference between HAV and other picornavirus members: the codon usage. HAV presents a higher codon usage bias compared with other members of the family, which conveys in the adaptation to use abundant and rare codons (Sánchez et al., 2003b). In fact, 15 amino acid families contain rare codons, defined in terms of their frequencies, making a total of 27 rare codons used (Table 1). But what is more surprising is that the HAV codon usage has evolved to be complementary to that of human cells, never adopting as abundant codons those abundant for the host cell, and even in some instances using these latter as rare codons (Table 1). This naturally highly deoptimized codon usage, unique to HAV, has been interpreted as a subtle strategy to avoid, as much as possible, competition for the cellular tRNAs in the absence of a precise mechanism of inducing shutoff of cellular protein synthesis (Sánchez et al., 2003b). As stated before, a consequence of this special codon bias is an increase in the number of rare codons used by HAV. Overall this increment is the result of the addition to the cellular rare codons, also used as rare by the virus, of those most abundant cellular codons that being unavailable for the virus are used at low frequencies. Altogether, the deoptimized HAV codon usage may contribute to its slow replication and to its low yields. In fact, poliovirus attenuated growth mutants have been obtained through artificial deoptimization of the codon usage with respect to that of the human host cell (Burns et al., 2006; Mueller et al., 2006) and

Table 1  
Comparative relative codon usage in HAV and human cells

Amino acid	Codon	HAV	Human cells
Arg	AGA	100	100
	<b>AGG</b>	29	99
	<b>CGC</b>	3	87
	<b>CGU</b>	3	38
	<b>CGA</b>	3	51
	<b>CGG</b>	1	95
Leu	UUG	100	32
	UUA	52	19
	CUU	46	33
	<b>CUG</b>	25	100
	<b>CUA</b>	9	17
	<b>CUC</b>	7	49
Ser	UCU	100	77
	UCA	84	62
	AGU	32	62
	<b>UCC</b>	28	91
	<b>UCG</b>	5	22
	<b>AGC</b>	5	100
Thr	ACU	100	69
	ACA	91	79
	<b>ACC</b>	18	100
	<b>ACG</b>	4	32
Pro	CCU	100	88
	CCA	89	85
	<b>CCC</b>	20	100
	<b>CCG</b>	2	35
Ala	GCU	100	66
	GCA	61	56
	<b>GCC</b>	30	100
	<b>GCG</b>	1	26
Gly	GGA	100	73
	GGU	58	48
	GGG	34	73
	<b>GGC</b>	28	100
Val	GUU	100	39
	GUG	46	100
	<b>GUA</b>	18	25
	<b>GUC</b>	13	52
Lys	AAA	100	76
	AAG	59	100
Asn	AAU	100	88
	<b>AAC</b>	19	100
Gln	CAG	100	100
	CAA	88	35
His	CAU	100	71
	<b>CAC</b>	22	100
Glu	GAA	100	72
	GAG	77	100
Asp	GAU	100	86
	<b>GAC</b>	19	100
Tyr	UAU	100	79
	<b>UAC</b>	26	100
Cys	UGU	100	83
	<b>UGC</b>	26	100
Phe	UUU	100	85
	<b>UUC</b>	27	100

Table 1 (continued)

Amino acid	Codon	HAV	Human cells
Ile	AUU	100	76
	AUA	32	35
	AUC	16	100

For each amino acid family the most abundant codon is given a value of 100 and the rest of codons are expressed as a percentage of this most abundant codon. HAV rare codons appear in bold.

while in the first of these works the decreased replicative fitness was suggested to be associated to an increase in the CG dinucleotides, in the second it was indeed associated to the rate of genome translation. It has been largely documented (Chou and Lakatos, 2004; Robinson et al., 1984; Sørensen et al., 1989) the role of rare codons in the control of translation speed, in the sense that clusters of rare codons would induce a transient stop of the translational complex since the rare aminoacyl-tRNA would take longer to diffuse into the A site of the ribosome. As a consequence these ribosomal pauses might impair the protein synthesis through different mechanisms such as the degradation of the RNA chain (Hoekema et al., 1987), the premature polypeptide chain termination (Parker, 1989) or the misincorporation of amino acids (Parker, 1989). Alternatively, a beneficial function of this ribosome stalling might be the assurance of the proper folding of the nascent protein (Adzhubei et al., 1996; Gavrilin et al., 2000; Evans et al., 2005). Such a function has been postulated for the P1 genome region of HAV, which codes for the structural proteins, where highly conserved clusters of rare codon-coded residues strategically located at the carboxi-ends of the structured elements have been reported (Sánchez et al., 2003b). In contrast, in poliovirus the rare codons position in the structural polyprotein genome region did not seem to play a significant role in controlling the protein folding, as proven with a mutant virus which kept the codon usage but changed the local position of the synonymous codons (Mueller et al., 2006). However, this is an expected finding due to both the low number of rare codons in the P1 genomic region in poliovirus in contrast to HAV and to the non-specific location of such rare codons in the natural optimized wild-type virus (Sánchez et al., 2003b). Additionally, it should not be forgotten that HAV has naturally evolved to a deoptimized codon usage, being probably this deoptimization an adaptative trait as can be noticed by comparing the specific infectivity (Domingo et al., 2005) of the naturally deoptimized HAV, with an average of 1 infectious unit per each 60 physical units (Jansen et al., 1988) and that of the artificially deoptimized polioviruses of 1 infectious unit per  $10^3$  to  $10^4$  or that of the natural poliovirus of 1 infectious unit per 115 physical units (Mueller et al., 2006). It is considered that a decrease in the specific infectivity generally precedes the transition to error catastrophe (Domingo et al., 2005), thus indicating that the codon usage deoptimization of HAV, although being deoptimized in terms of the cellular codon usage, is completely optimized and may be an adaptation to the cell environment.

Altogether and having in mind the already unanswered question of the highly inefficient IRES, it may also be suggested that a very efficient translation machinery recruitment to the IRES

combined with many ribosome stalls at the beginning of the coding region, would not be a very convenient arrangement but rather a very ineffective process hijacking many ribosomes on a few RNA molecules.

Another important issue in the control of the genome expression, is the functional role of the secondary and tertiary RNA structures (Brion and Westhof, 1997) as well as the RNA refolding (Klovins et al., 1997; van Meerten et al., 2001), and in this context the role of some particular codons, among them some rare codons, in maintaining such structure dynamics (Gavrilin et al., 2000; Sánchez et al., 2003b) might also be crucial.

### 3. Capsid variability and codon usage constraints

A certain contribution of the codon usage to the low variability of the HAV capsid has been proposed taking into account that 15% of its surface residues are coded by such functional rare codons (Sánchez et al., 2003b). This low capsid variability indeed correlates with a very low antigenic variability: a single serotype exists, being this another striking difference with other picornaviruses. The low capsid variability should rely on negative selection acting against potential newly arising proteins, since the viral population replicates as a quasispecies (Sánchez et al., 2003a). Interestingly, a quasispecies analysis of the HM175 43c HAV strain grown in the presence of two different monoclonal antibodies revealed that those clusters of amino acid residues coded by rare codons located on the capsid surface nearly to the antigenic epitopes are prompt to invariability (Aragonès et al., manuscript in preparation), suggesting a seminal role of such clusters of rare codons in the capsid cohesive stability.

Additionally, and due to the low protein synthesis that may be expected from the codon deoptimization, those proteins involved in RNA replication might also be found at limiting concentrations. As a consequence, although the mutation frequency of HAV is similar to that of other RNA viruses (Sánchez et al., 2003a), the overall RNA replication is probably lower and thus also the overall reservoir of mutants. In fact, the genetic and phenotypic flexibility of an evolving viral quasispecies is dependent on the mutant repertoire which is expanded with population size (Domingo and Holland, 1997). In such a context which includes low translation rate, low total RNA yields, rare codon constraints and last but not least protein constraints, it is advisable a very low capsid variability.

How does the virus overcome the host immune response with such an invariable capsid? The answer probably relies on that when the immune response appears the job is already done in a very quiescent way, and the virus population is ready to infect a second individual (see below). At this point, the question should be reformulated in terms of the possibility of newly arising variants escaping to the vaccine protection. Obviously only the future will provide us with the answer.

### 4. Capsid variability and biological cycle constraints

Only a minimal part of a RNA virus sequence space can be accessed and both RNA replication, expression of the genotype

into the phenotype as well as the overall infection cycle play a decisive role in shaping the viral fitness and the viral population landscapes (Eigen and Biebricher, 1988; Eigen et al., 1991).

Viral pathogenesis is in part determined by the spread of the virus to the target tissues (Rieder and Wimmer, 2002; Pfeiffer and Kirkegard, 2005; Vignuzzi et al., 2006). In this context, critical for the viral biological cycle and infection is to overcome the challenges posed by the acid pH of the stomach during the entry phase, the decoy factors during the viremic phase, and the action of detergents, particularly biliary salts, during the exit phase. Such an extremely resistant phenotype may only be achieved through a highly cohesive capsid conformation mediated through a very accurate folding, which also may explain the high persistence of HAV in the environment (Abad et al., 1994a, 1994b) and its transmission by contaminated foods and drinking water (Bosch et al., 1991; Reid and Robinson, 1987; Roseblum et al., 1990; Sánchez et al., 2002; Dentinger et al., 2001).

A particular key issue, for a virus that grows in polarized hepatocytes with different entry and exit membranes and thus relying in the blood connection of the enterohepatic cycle is, as above stated, to prevail over a viremic phase. Apart from the immunological defense, erythrocyte glycoproteins may function as decoy receptors attracting pathogens to the erythrocyte and keeping them away from target tissues (Gagneux and Varki, 1999). In fact, the use of modified erythrocytes expressing selective viral receptors has been proposed as a mechanism of dampening the viremic phase and thereby protecting the target organs from infections (Asher et al., 2005). HAV interacts with the glycoprotein A of the human erythrocytes, and the capsid region involved on this interaction is located around the putative pit area (Sánchez et al., 2004), as it happens in many picornaviruses where the pit region contains receptor binding residues (Rieder and Wimmer, 2002). However, this interaction is optimal at acid conditions, being impaired at neutral biological conditions, suggesting that the actual HAV capsid conformation allows escaping from erythrocyte attachment, probably constituting an advantage (Sánchez et al., 2004). This may contribute to the low frequency of isolation of natural escape mutants, in this particular capsid region (Costa-Mattioli et al., 2002, 2003; Sánchez et al., 2002), that would otherwise partially escape to convalescent sera binding (Ping and Lemon, 1992) and neutralization (Aragonès et al., manuscript in preparation). In fact, mutants containing substitutions in this region bind with much higher efficiency to human erythrocytes and are more rapidly cleared from the blood stream when inoculated into animal models (Costafreda et al., manuscript in preparation). This example reflects how a mutation may be far from neutral even when the virus does not present any disadvantage in terms of replication (Aragonès et al., manuscript in preparation) due to the complex network of the biological cycle. Other examples probably exist regarding the loss of fitness due to less stable capsids in scenarios of different biological bottlenecks and prove once more that RNA viruses live on the edge of error catastrophe (Domingo and Holland, 1997; Biebricher and Eigen, 2005).

It has very recently been demonstrated that viral pathogenesis and virulence of poliovirus are determined by the diversity

of the quasispecies, which would allow to overcome the bottlenecks imposed by the natural biological cycle such as the need to replicate in different tissues in order to spread to the central nervous system or during the transmission from one individual to another (Pfeiffer and Kirkegard, 2005; Vignuzzi et al., 2006). As stated above, something similar might be expected for HAV and, as it has been postulated for poliovirus (Vignuzzi et al., 2006), a cooperative role of the whole viral population might be crucial for the viral spread through the body with certain variants facilitating the colonization of the gut, others assisting the pass through the blood and others reaching the liver.

## 5. Replication at the edge of extinction

It is generally accepted that all RNA viruses (Biebricher and Eigen, 2005) and in particular picornaviruses (Racaniello, 2001), have a low specific infectivity or infectious/physical particle ratio. This low ratio has been suggested to be due to lethal genetic defects and/or to unsuccessful infectious cycles. In the particular case of poliovirus it has been found that the PFU/particle ratio is to a great extent the result of the virus capacity to overcome the host cell antiviral responses (Mueller et al., 2006). In many occasions, codon-deoptimized mutants, with lower translation rates, probably do not synthesize sufficient amounts of the proteases responsible of disabling the cell's antiviral responses, thus resulting in abortive infections. However, on those occasions where these viruses overcome the cell counterattack, the production of viral progeny appears to be unaltered (Mueller et al., 2006). This has led to the belief that picornaviruses not only replicate to the threshold of error catastrophe but also at the threshold of elimination by the host cell's antiviral defenses (Mueller et al., 2006).

In fact, it is well documented that HAV has developed mechanisms to prevent or reduce cellular antiviral responses (Brack et al., 1998, 2002; Fensterl et al., 2005). However, the exact mechanisms by which the virus is able to interfere with such antiviral responses have not been elucidated. Particularly, it is known that non-cytopathogenic strains of HAV do not induce apoptosis nor IFN- $\beta$  synthesis (Brack et al., 1998, 2002), being probably the result of the low efficiency of viral replication and consequently of the low concentration of viral dsRNA intermediates. But what is even more striking is that non-cytopathogenic strains, which replicate extremely slowly, very efficiently inhibit the dsRNA induction of such expression as well as apoptosis, while cytopathogenic strains, which replicate a little bit faster, do it less efficiently (Brack et al., 1998, 2002). The delicate balance between the levels of dsRNA intermediates and some viral protein(s) might modulate these mechanisms of inhibition of the antiviral cell responses. Thus, the optimally deoptimized codon usage of HAV likely induces a very low translation rate and a very low RNA replication rate which might be evenly undetected by the host cell defenses. This could explain the high specific infectivity of HAV in spite of its naturally deoptimized codon usage, which would indicate non-abortive infections due to the antiviral cell response, in contrast to what has been suggested for poliovirus (Mueller et al., 2006).

It should be noted the huge difference existing between poliovirus and HAV in the rate of replication. Although it is difficult to compare rates of replication *in vivo*, mostly because of the lack of data regarding replication in the human host but also for the lack of data in animal models for HAV, what is seen *in vitro* denotes a highly different pattern. While poliovirus easily reaches titers of around  $10^9$  PFU/ml in very short periods of replication in HeLa cells using multiplicities of infection of 5 PFU/cell (Burns et al., 2006; Mueller et al., 2006), HAV (strains HM175 43c, HM175 18f and HM175 24a) typically is only able to reach titers of around  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml in replication periods well over 1 week in FRhK-4 cells under such conditions. Taking into consideration the above mentioned specific infectivity ratios, these figures may become  $10^{11}$  and  $6 \times 10^8$  particles/ml for poliovirus and HAV, respectively. The few available data on patient stools show viral titers up to  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/g (Laasri et al., 2005) in oral poliovirus vaccinated excreting patients, that may be transformed to  $10^8$  particles/g, and up to  $10^{11}$  particles/g in hepatitis A patients (Costafreda et al., 2006). This apparent discrepancy might be however explained by the fact that fecal shedding in poliovirus is the result of the primary multiplication in the small intestine but not from the main focuses of multiplication such as the lymph nodes, brown fat, and muscles (Pallansch and Roos, 2001), while in HAV the fecal shedding is mainly the result of replication in the target organ the liver (Hollinger and Emerson, 2001), that besides is the most massive organ of the body. The comparison of the excreted titers of HAV with those of other enteric viruses, such as several gastroenteritis viruses whose replication takes place mainly in the intestine and with titers up to  $10^{13}$  particles/g of feces, proves that HAV titers are not excessively high (Caballero et al., 2003; Chan et al., 2006). Nevertheless, from the point of view of transmission by the fecal–oral route it would seem reasonably to postulate that HAV is likely to be more efficient than poliovirus, mostly because inter-individual transmission is probably the strongest bottleneck in the biological cycle, and the higher the population size the higher the mutant reservoir.

## 6. Conclusions

The slow translation/replication strategy of HAV may contribute to the modulation of the antiviral cell response thus preserving the already existing sites of replication and allowing the initiation of new ones. In this way the low viral yield per cell would be compensated and the mutant reservoir necessary for the adaptability of the viral population to the changing environment ensured. On the other hand, the slow translation rate is likely to contribute to the highly stable viral capsid necessary for a prolonged survival outside the host body.

## Acknowledgements

This work was supported in part by grants SP22-CT-2004-502571 from the European Union, BIO2005-05022 from CICyT of the Ministry of Education and Science, Spain, and 2005SSGR00966 from the Generalitat de Catalunya and by Cen-

tre de Referència de Biotecnologia de Catalunya (CeRba), Generalitat de Catalunya.

## References

- Abad, F.X., Pintó, R.M., Bosch, A., 1994a. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3704–3710.
- Abad, F.X., Pintó, R.M., Díez, J.M., Bosch, A., 1994b. Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2377–2383.
- Adzhubei, A.A., Adzhubei, I.A., Krashennnikov, I.A., Neidle, S., 1996. Non-random usage of “degenerate” codons is related to protein three-dimensional structure. *FEBS Lett.* 399, 78–82.
- Agol, V.A., 2002. Picornavirus genome: an overview. In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 127–148.
- Asher, D.R., Cerny, A.M., Finberg, R.W., 2005. The erythrocyte viral trap: transgenic expression of viral receptor on erythrocytes attenuates coxsackievirus B infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12897–12902.
- Baroudy, B.M., Ticehurst, J.R., Miele, T.A., Maizel, J.V., Purcell, R.H., Feinstone, S.M., 1985. Sequence analysis of hepatitis A virus cDNA coding for capsid proteins and RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 2143–2147.
- Borman, A.M., Kirchweiger, R., Ziegler, E., Rhoads, R.E., Skern, T., Kean, K.M., 1997. eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA* 3, 186–196.
- Bosch, A., Lucena, F., Díez, J.M., Gajardo, R., Blasi, M., Jofre, J., 1991. Human enteric viruses and indicator microorganisms in a water supply associated with an outbreak of infectious hepatitis. *J. Am. Water Works Assoc.* 83, 80–83.
- Brack, K., Berk, I., Magulski, T., Lederer, J., Dotzauer, A., Vallbracht, A., 2002. Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. *J. Virol.* 76, 11920–11930.
- Brack, K., Frings, A., Dotzauer, A., Vallbracht, A., 1998. A cytopathogenic, apoptosis inducing variant of hepatitis A virus. *J. Virol.* 72, 3370–3376.
- Braun, E.A., Zajac, A.J., Lemon, S.M., 1994. *In vitro* characterization of an internal ribosome entry site (IRES) present within the 5′ nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *J. Virol.* 68, 1066–1074.
- Biebricher, C.K., Eigen, M., 2005. The error threshold. *Virus Res.* 107, 117–127.
- Brión, P., Westhof, E., 1997. Hierarchy and dynamics of RNA folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 113–137.
- Burns, C.C., Shaw, J., Campagnoli, R., Jorba, J., Vincent, A., Quay, J., Kew, O., 2006. Modulation of poliovirus replicative fitness in HeLa cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region. *J. Virol.* 80, 3259–3272.
- Caballero, S., Guix, S., El-Senousy, W.M., Calicó, I., Pintó, R.M., Bosch, A., 2003. Persistent gastroenteritis in astrovirus infected children: association with serotype-3 strains. *J. Med. Virol.* 71, 245–250.
- Chan, M.V.W., Sung, J.J.Y., Lam, R.K.Y., Chan, P.K.S., Lee, N.L.S., Lai, R.W.M., Leung, W.K., 2006. Fecal viral load and Norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1278–1280.
- Chou, T., Lakatos, G., 2004. Clustered bottlenecks in mRNA translation and protein synthesis. *Phys. Rev. Lett.* 93, 198101.
- Cohen, J.I., Ticehurst, Purcell, R.H., Buckler-White, A., Baroudy, B.M., 1987. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A and other picornaviruses. *J. Virol.* 61, 50–59.
- Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Pérez-Bercoff, R., Casane, D., Colina, R., García, L., Vega, I., Glikman, G., Romanovsky, V., Castello, A., Nicand, E., Gassin, M., Billaudel, S., Ferre, V., 2002. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol.* 76, 9516–9525.
- Costa-Mattioli, M., Napoli, A.D., Ferre, V., Billaudel, S., Perez-Bercoff, R., Cristina, J., 2003. Genetic variability of hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.* 84, 3191–3201.



- Costafreda, M.I., Bosch, A., Pintó, R.M., 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3846–3855.
- Dentinger, C.M., Bower, W.A., Nainan, O.V., Cotter, S.M., Myers, G., Dubusky, L.M., Fowler, S., Salehi, E.D., Bell, B.P., 2001. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *J. Infect. Dis.* 183, 1273–1276.
- Domingo, E., Escarmís, C., Lázaro, E., Manrubia, S.C., 2005. Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res.* 107, 129–139.
- Domingo, E., Holland, J.J., 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 151–178.
- Ehrenfeld, E., Teterina, N.L., 2002. Initiation of translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosome entry site. In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 159–170.
- Eigen, M., Biebricher, C.K., 1988. Sequence space and quasispecies distribution. In: Domingo, E., Holland, J.J., Ahlquist, R. (Eds.), *RNA Genetics: Variability of RNA Genomes*, vol. III. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 211–245.
- Eigen, M., Biebricher, C.K., Gebinoga, M., Gardiner, W.C., 1991. The hypercycle: coupling of RNA and protein biosynthesis in the infection cycle of an RNA bacteriophage. *Biochemistry* 30, 11005–11018.
- Evans, M.S., Clark IV, T.F., Clark, P.L., 2005. Conformations of co-translational folding intermediates. *Protein Pept. Lett.* 12, 189–195.
- Fauquet, C., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., 2005. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam.
- Fensterl, V., Grotthuer, D., Berk, I., Schlemminger, S., Vallbracht, A., Dotzauer, A., 2005. Hepatitis A virus suppresses RIG-I-mediated IRF-3 activation to block induction of beta interferon. *J. Virol.* 79, 10968–10977.
- Gagneux, P., Varki, A., 1999. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 9, 747–755.
- Gavrilin, G.V., Cherkasova, E.A., Lipskaya, G.Y., Kew, O.M., Agol, V.I., 2000. Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J. Virol.* 74, 7381–7390.
- Hoekema, A., Kastelein, R.A., Vasser, M., de Boer, H.A., 1987. Codon replacement in the *PGK1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2914–2924.
- Hollinger, F.B., Emerson, S.U., 2001. Hepatitis A virus. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1, 4th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, New York, pp. 799–840.
- Jackson, R.J., 2002. Proteins involved in the function of picornavirus Internal Ribosome Entry sites. In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 171–186.
- Jansen, R.W., Newbold, J.E., Lemon, S.M., 1988. Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis A virus: comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology* 163, 299–307.
- Klovins, J., Tsareva, N.A., de Smit, M.H., Berzins, V., van Duin, J., 1997. Rapid evolution of translational control mechanisms in RNA genomes. *J. Mol. Biol.* 265, 372–384.
- Kuechler, E., Seipelt, J., Liebig, H.-D., Sommergruber, W., 2002. Picornavirus proteinase-mediated shutoff of host cell translation: direct cleavage of a cellular initiation factor. In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 301–312.
- Mueller, S., Papamichail, D., Coleman, J.R., Skiena, S., Wimmer, E., 2006. Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J. Virol.* 80, 9687–9696.
- Laasri, M., Dragunsky, E., Enterline, J., Ereemeeva, T., Ivanova, O., Lottenbach, K., Belshe, R., Chumakov, K., 2005. Genomic analysis of vaccine-derived poliovirus strains in stool specimens by combination of full-length PCR and oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2886–2894.
- Leong, L.E.C., Cornell, C.T., Semler, B.L., 2002. Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus. In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 187–198.
- Pallansch, Roos, 2001. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1, 4th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, New York, p. 723797.
- Parker, J., 1989. Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiol. Rev.* 53, 273–298.
- Pfeiffer, J.K., Kirkegaard, K., 2005. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog.* 1, 0102–0110.
- Ping, L.-H., Lemon, S.M., 1992. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J. Virol.* 66, 2208–2216.
- Racaniello, V.R., 2001. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1, 4th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, New York, pp. 685–722.
- Reid, T.M.S., Robinson, H.G., 1987. Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiol. Infect.* 98, 109–112.
- Rieder, E., Wimmer, E., 2002. Cellular receptors of picornaviruses: an overview. In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 61–70.
- Robinson, M., Lilley, R., Little, S., Emtage, J.S., Yarranton, G., Stephens, P., Millican, A., Eaton, M., Humphreys, G., 1984. Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 12, 6663–6671.
- Roseblum, L.S., Mirkin, I.R., Allen, D.T., Safford, S., Hadler, S.C., 1990. A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *Am. J. Public Health* 80, 1075–1079.
- Sánchez, G., Aragonès, L., Costafreda, M.I., Ribes, E., Bosch, A., Pintó, R.M., 2004. Capsid region involved in the hepatitis A virus binding to the glycoporphin A of the erythrocyte membrane. *J. Virol.* 78, 9807–9813.
- Sánchez, G., Bosch, A., Gomez-Mariano, G., Domingo, E., Pintó, R.M., 2003a. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315, 34–42.
- Sánchez, G., Bosch, A., Pintó, R.M., 2003b. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J. Virol.* 77, 452–459.
- Sánchez, G., Pintó, R.M., Vanaclocha, H., Bosch, A., 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4148–4155.
- Schultheiss, T., Kusov, Y.Y., Gauss-Muller, V., 1994. Proteinase 3C of hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. *Virology* 198, 275–281.
- Schultheiss, T., Sommergruber, W., Kusov, Y., Gauss-Müller, V., 1995. Cleavage specificity of purified recombinant hepatitis A virus 3C proteinase on natural substrates. *J. Virol.* 69, 1727–1733.
- Sørensen, M.A., Kurland, C.G., Pedersen, S., 1989. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 207, 365–377.
- van Meerten, D., Girard, G., van Dui, J., 2001. Translational control by delayed RNA holding: identification of the kinetic trap. *RNA* 7, 483–494.
- Vignuzzi, M., Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E., Andino, R., 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439, 344–348.
- Weitz, M., Baroudy, B.M., Maloy, W.L., Ticehurst, J.R., Purcell, R.H., 1986. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J. Virol.* 60, 124–130.
- Whetter, L.E., Day, S.P., Elroy-Stein, O., Brown, E.A., Lemon, S.M., 1994. Low efficiency of the 5′ non-translated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J. Virol.* 68, 5253–5263.

Pintó, R.M., Costafreda, M.I. & Bosch, A. 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of Hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7350-7355.



# Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A<sup>∇</sup>

Rosa M. Pintó, M. Isabel Costafreda, and Albert Bosch\*

*Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology and Institute of Nutrition and Food Safety,  
University of Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 21 May 2009/Accepted 30 September 2009

**In the present work, we aimed at determining the relationship between the hepatitis A virus (HAV) numbers in imported frozen coquina clams involved in two hepatitis outbreaks, as well as the risk for human health. Due to HAV unculturability, a standardized TaqMan real-time reverse transcription-PCR controlling the virus/nucleic acid extraction and enzyme efficiencies was employed to figure the exposure dose for clams responsible for hepatitis cases. HAV numbers were then employed to figure the risk of infection based on a dose-response model for echovirus 12. The estimated risk of infection after consumption of lightly cooked clams matched actual attack rates. Our data show that prospective monitoring of bivalve samples may fail to prevent the occurrence of outbreaks, since HAV was detected in 44% of samples directly associated with cases but was undetectable in samples that were randomly collected from the importers and belonged to the same batches. A correlation was nevertheless observed between the prevalence of hepatitis A cases in the harvesting areas and positive HAV isolation in clams, which points to the need to identify and prevent hazards rather than relying on random sampling of finished products to ensure safety. However, when evidence shows that a critical limit of viral contamination has been exceeded in the potential sources of contamination discharging into the shellfish-growing beds, quantitative virological analysis addressing quality assurance and quality control requirements should be performed with the bivalves. This work provides the first evidence of accurate HAV levels in shellfish involved in outbreaks that could be of use for risk assessment purposes.**

Epidemiological evidence suggests that human enteric viruses are the most common pathogens transmitted by bivalve shellfish (22, 23, 31) and that hepatitis A virus (HAV) infection is the most serious viral infection linked to shellfish consumption, causing a debilitating disease and, occasionally, death. The first documented shellfish-borne outbreak of “infectious hepatitis” occurred in Sweden in 1955, when 629 cases were associated with raw oyster consumption (33). However, the most significant outbreak of HAV infection occurred in Shanghai, China, in 1988, in which almost 300,000 cases were caused by consumption of clams harvested from a sewage-polluted area (17). In fact, this is so far the largest virus-associated outbreak of food poisoning ever reported. Smaller outbreaks have been reported worldwide (10, 13, 24, 27, 29, 35, 37). Several issues, such as the fact that fecal HAV excretion precedes the onset of symptoms, together with the difficulties in completely removing and/or inactivating viruses through sewage treatment (6, 7), make hepatitis shellfish-borne outbreaks hard to prevent if the virus is circulating among the population.

Risk analysis may provide a sensible approach to increase the safety of shellfish consumption. Quantitative microbial risk assessment (QMRA) is a powerful statistical tool for estimating the probability of an event, e.g., virus infection, taking place, based on exposure and dose-response models (15, 16, 18, 34). Exposure assessment requires the quantitative determination of viruses present in the transmission vehicle. Due to the lack of a reliable cell system for the recovery of wild-type HAV, standardized quantitative molecular approaches, including ap-

propriate quality assurance and quality control measures to assess the efficiency of critical steps in virus analysis, open the possibility of producing consistent and accurate exposure data (11). Additionally, the lack of an actual dose-response model for HAV makes it necessary to apply models developed for other enteric viruses (21, 25, 36, 39).

In the present work, we aimed at determining the relationship between the HAV numbers in imported coquina clams directly involved in two hepatitis outbreaks and the derived likelihood of acquiring hepatitis A infection from consumption of the contaminated product. To our knowledge, no quantitative analysis of the health risk of HAV-contaminated bivalve mollusks has previously been reported. The information generated in this work may be used to formulate cost-effective risk management measures in shellfish-borne outbreak situations.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells and viruses.** The cytopathogenic pHM175 43c strain of HAV (courtesy of T. Cromeans, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) has been used throughout this study as a positive control of the detection technique. Virus replication in FRhK-4 cells was performed as previously described (4).

Infectious mengovirus strain MC<sub>0</sub> (ATCC VR-1957) was obtained after transfection of a cDNA clone, pMC<sub>0</sub> (kindly provided by Ann Palmenberg, University of Wisconsin), into HeLa cells as previously described (28). The MC<sub>0</sub> mutant strain, which lacks the poly(C) tract in comparison to the wild-type mengovirus, shows growth properties identical to those of the wild-type virus but with a completely avirulent phenotype (28). Mengovirus stocks were thereafter produced in the same cells and used as controls for procedures in each virus/nucleic acid extraction from shellfish as described elsewhere (11).

**Shellfish-borne hepatitis A outbreaks.** In a period of 10 years, two hepatitis A outbreaks occurred in Valencia (Spain) that were associated with the same source: frozen coquina clams imported from Peru. These molluscan bivalves complied with the European Union (EU) standards, based on the numbers of *Escherichia coli* in shellfish meat, which must be below 230 most probable numbers per 100 g of flesh to allow their market distribution (2). It is, however, well documented that bacterial microorganisms fail to give a reliable indication of

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, School of Biology, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Phone: 34934034620. Fax: 34934034629. E-mail: abosch@ub.edu.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 9 October 2009.



TABLE 1. Parameters employed for the estimation of HAV exposure<sup>a</sup> from consumption of clams from contaminated batches

Parameter	Description	Reference(s)
<i>P</i>	Prevalence or percentage of units contaminated. In our case, the unit was the batch package, and in the 1999 outbreak, since all analyzed packages were associated with cases, $P = 1$ .	This study
<i>C</i>	Concn of viruses, in our case the no. of genome copies per g of clam meat as determined by real-time RT-PCR.	11
<i>R</i>	Percent recovery of the detection method. In our case, it is estimated from the percent of recovery of a known concn of added mengovirus (as an extraction process control) and a known concn of an added external RNA molecule (as an RT-PCR control).	11
<i>I</i>	Proportion of infectivity of the detected viruses. In our case, the ratio of infectious/physical particle has been determined to be 1/60.	12, 20
<i>PR</i>	Percent virus titer reduction associated with clam cooking. The final concn of infectious virus after cooking was estimated by applying a reduction of the initial infectious virus of 99.46% in lightly cooked shellfish (until valves are opened) and 99.86% in well-cooked shellfish (5 min after opening of the valves).	1, 8
<i>W</i>	Amount of food consumed per serving. In our case, having in mind the culinary habits for consumption of clams in the outbreak location, mostly as tapas or in paella, we chose a serving size of 60 g of meat.	34

<sup>a</sup> Dose =  $P \times C \times 1/R \times I \times PR \times W$  (18, 38).

virological quality of bivalve molluscan shellfish or their waters (1, 23, 32). The first outbreak (9) occurred in 1999, lasted 3 months, and affected 184 patients. The amount of clams involved in the outbreak was 189 tons. In this outbreak, the transmission vehicle was ascertained through the detection of the same HAV sequences in patient and coquina samples (35). The second outbreak occurred in 2008, lasted 7 months, and affected 100 patients. The amount of clams involved in this outbreak was 3,766 tons. Again the same sequences, closely related to those of the 1999 outbreak, were detected in clinical and bivalve samples (unpublished data).

Frozen samples of clams directly associated with the outbreaks were tested for the presence of HAV. In the 1999 outbreak, 20 samples from households with cases were analyzed by standard reverse transcription-PCR (RT-PCR) (35). In the 2008 outbreak, nine package samples from households, seven from retail stores, and seven from importers were assayed by real-time RT-PCR (11). Details of the procedures are provided below.

**Virus and nucleic acid extraction.** Processing of shellfish samples from the 1999 outbreak was performed essentially by the method described by Atmar and coworkers (5). Briefly, the stomachs and digestive diverticula were dissected from the clams and subjected to high-speed homogenization (Sorval OCI Omni mixer; Omni Intl., Waterbury, CT). Viruses were extracted from the homogenates (corresponding to 1.5 g of shellfish tissue) by sequential extractions with chloroform-butanol and Cat-Floc T (Calgon Corp., Elwood, PA), and concentrated by polyethylene glycol precipitation. Nucleic acids from these concentrates were extracted with the RNeasy plant mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

Samples from the 2008 outbreak were processed as described by Lowther and colleagues (26) with minor modifications. Briefly, for each sample, 2.0 g of digestive glands was finely chopped using a razor blade. Homogenates were then prepared by treating the chopped digestive glands with 2 ml of a 100- $\mu$ g/ml proteinase K solution (30 U/mg; Promega). Samples were incubated at 37°C with shaking for 60 min, followed by an additional incubation at 60°C for 15 min. After a low-speed centrifugation at  $3,000 \times g$  for 5 min, supernatants were recovered and employed for RNA extraction using the NucliSens miniMAG magnetic system (BioMérieux), following the manufacturer's instructions.

The high variability inherent to the procedures for virus recovery from shellfish calls for the use of process controls. Mengovirus MC<sub>0</sub> (ATCC VR-1957) was used to control the efficiency of the extraction procedures described above. Ten microliters of a virus stock, containing  $10^7$  50% tissue culture infective doses per ml, was added to the homogenates prior to the extraction processes. The efficiency of the nucleic acid extraction was calculated by comparing the detected and added mengovirus genomes. Differences in the extraction efficiencies between the employed methods and also within repeated extractions using a given method were monitored through the use of the mengovirus. Appropriate corrective factors were subsequently applied to the raw figures obtained in the real-time assay. The final virus numbers for a given sample were of the same order of magnitude regardless of the extraction procedure employed.

**Primers, probes, and molecular assays.** HAV quantification was performed through a standardized real-time TaqMan RT-PCR with primers HAV240 and HAV68, probe HAV150(-) labeled at the 5' end with 6-carboxyfluorescein

(FAM) and modified at the 3' end with the addition of a minor groove binder (MGB), and assay conditions described elsewhere (11). This method includes the use of mengovirus as a process control for virus/nucleic acid extraction from shellfish tissues, as mentioned above. Quantification of mengovirus was carried out through a real-time procedure following the same conditions as for HAV with the reverse primer Mengo209 (5'-GAAGTAACATATAGACAGACGCA CAC-3'), the forward primer Mengo110 (5'-GCGGGTCCTGCCGAAAGT-3'), and the FAM-MGB probe Mengo147 (5'-ATCACATTACTGCCCAGC-3'). The target region for the quantification of mengovirus was selected to be as similar as possible to that of HAV in terms of structure, length, and base composition (11). Additionally the efficiencies of the RT-PCR enzymes were monitored by spiking an RNA control, as specified elsewhere (11).

**Estimation of accurate virus genome copy numbers in bivalve tissue.** The accurate number of genome copies in bivalve shellfish may be estimated by applying the corrective factors derived from the virus/nucleic acid extraction efficiency on the one hand and the efficiency of the RT-PCR amplification on the other (11). However, extraction efficiencies in shellfish samples usually range from 0.1% to 10%, while RT-PCR efficiencies range from 50% to 100%. Only in those cases in which the extraction efficiencies are  $\geq 10\%$  are both corrective factors considered, since the corrective factors are in the same log magnitude. This is usually observed when analyzing clinical samples. When extraction efficiencies are  $< 10\%$  and RT-PCR efficiencies are  $> 50\%$ , as occurred in the present study, it is not necessary to sum up both corrective factors, since they are not in the same log magnitude, the actual bottleneck being the extraction procedure.

**Quantitative risk assessment.** The risk of infection is the probability of acquiring the infection from a given exposure dose. The two main factors affecting this probability after consumption of food are the level of exposure (i.e., the number of infectious virus units per gram of clams and the ingested amount of clams) and the interaction of HAV and the host (defined by the dose-response curve). Table 1 depicts the parameters employed for the estimation of the HAV exposure from consumption of clams from contaminated batches, employing an adaptation of a general model for estimation of exposure of viruses in food proposed by Havelaar and Rutjes (18) based on the formula developed by Teunis et al. for estimation of exposure to protozoa in drinking water (38):  $dose = P \times C \times 1/R \times I \times PR \times W$ , where dose is the number of infectious virus particles ingested in a single meal,  $P$  is the prevalence (the percentage of units contaminated by one or more infectious particles) at a specified step in the food chain,  $C$  is the measured concentration in contaminated units at that step in the food chain,  $R$  is the percent recovery of the detection method,  $I$  is the proportion of infectious units in the total physical virus population,  $PR$  is the percent virus titer reduction of downstream processes including preparation for consumption, and  $W$  is the amount of food consumed (per serving). The HAV dose was employed to estimate the risk of infection based on dose-response models obtained in human volunteers with different enteric viruses reported to be isolated in shellfish, assuming a single serving of 60 g of meat tissue (34). The beta-Poisson formula,  $P_i = 1 - (1 + N/\beta)^{-\alpha}$ , was applied in this work, with  $P_i$  being the probability of infection,  $\alpha$  and  $\beta$  the dose-response parameters, and  $N$  the exposure expressed as the number of infectious units after cooking. Previously

TABLE 2. HAV numbers in clams from batches linked to the 1999 hepatitis A outbreak<sup>a</sup>

Sample batch	Genome copies/g <sup>b</sup>		Infectious units/g <sup>c</sup>		Infectious units/g after light cooking <sup>d</sup>	
	Without correction	With correction	Without correction	With correction	Without correction	With correction
20757	$8.0 \times 10^1$	$8.0 \times 10^4$	$1.3 \times 10^0$	$1.3 \times 10^3$	$7.0 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^0$
49254	$1.4 \times 10^1$	$1.4 \times 10^4$	$2.3 \times 10^{-1}$	$2.3 \times 10^2$	$1.2 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^0$
53323	$1.3 \times 10^1$	$1.3 \times 10^4$	$2.2 \times 10^{-1}$	$2.2 \times 10^2$	$1.2 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^0$
1054	$1.1 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$1.8 \times 10^0$	$1.8 \times 10^3$	$9.7 \times 10^{-3}$	$9.7 \times 10^0$

<sup>a</sup> Estimations are figured with or without applying corrective factors derived by extraction and enzyme efficiencies.

<sup>b</sup> Genome copy numbers per g of tissue were estimated by a TaqMan real-time RT-PCR (11).

<sup>c</sup> The numbers of infectious viruses per g of tissue were figured by applying a 1:60 factor to the number of physical particles (12, 20).

<sup>d</sup> The final numbers of infectious virus per gram of tissue after cooking were estimated by applying a reduction of 99.46% of the initial infectious virus, which is the reduction experimentally observed after light cooking (1, 8).

reported values of  $\alpha$  and  $\beta$  for rotavirus (39), echovirus 12 (36), poliovirus 1 (25), and poliovirus 3 (21) were employed.

The probability of infection was figured with or without applying corrective factors derived by extraction and enzyme efficiencies ( $R$  in Table 1), and since the vast majority of cases in both outbreaks occurred in the adult population (correlating with the primary population consuming shellfish), we assumed that all infections were symptomatic (risk of illness = risk of infection).

The actual attack rate could be determined only for the 1999 outbreak and was figured from the number of cases and the number of consumers theoretically associated with a given batch package, assuming a single serving of 60 g of shellfish. The net weight of the analyzed packages was ~2 kg. The numbers of consumers who developed hepatitis A after consumption of clams from packages of batches 20757, 49254, 53323, and 1054 were 9, 5, 4, and 18, respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

QMRA requires an accurate estimation of the exposure dose (14, 16, 18, 34). For unculturable viruses, such as HAV, for which cell culture is not adequate for primary isolation, standardized quantitative molecular procedures, including adequate controls to ascertain the efficiency of critical steps in food matrices, such as virus/nucleic acid extraction and enzyme inhibition, must be used (30). In the present study, the numbers of HAV genome copies per gram of tissue in clams associated with two outbreaks of hepatitis were figured by a standardized TaqMan real-time RT-PCR (11). Raw numbers of genome copies were corrected, taking into consideration the virus/nucleic acid extraction efficiencies and enzyme efficiencies.

Table 2 depicts the HAV levels in package samples from four batches of clams linked with the 1999 outbreak. The

numbers of infectious viruses were figured by applying a 1:60 factor to the number of physical particles (12, 20). In addition, since clams were sold frozen, it was assumed that they were not consumed raw but lightly cooked, following the local culinary habits. In this scenario, the final numbers of infectious virus after cooking were estimated by applying a reduction of 99.46% of the initial infectious virus, which is the reduction experimentally observed for HAV after light cooking (1, 8). From the data depicted in Table 2, the need to apply the corrective coefficients is evident, since otherwise the exposure dose for clams responsible for hepatitis cases would be far below a single infectious unit, assuming a single serving of 60 g of clam meat. The HAV infectious dose is unknown but according to the U.S. Food and Drug Administration presumably is around 10 to 100 virus particles (<http://www.seafoodhaccp.com/SeafoodData/BadBugBook/chap31.html>).

The actual attack rate for these batches is shown in Table 3. The number of HAV genome copies in tissues of lightly cooked clams, with or without correction, was employed for the estimation of the risk of infection using the beta-Poisson parameters obtained for human volunteers after ingestion of rotavirus (39), echovirus 12 (36), poliovirus 1 (25), and poliovirus 3 (21). From these data we can conclude that overall the fittest model after applying the required corrective factors is the one corresponding to echovirus 12, as was also suggested by Rose and Sobsey (34). This model was employed thereafter for HAV QMRA. According to our data (Tables 2 and 3), an infectious dose of 72 infectious particles may be associated

TABLE 3. Actual attack rate of HAV present in different clam batches linked to the 1999 outbreak and estimated risk of illness<sup>a</sup>

Sample batch	Attack rate <sup>b</sup>	Risk of illness based on dose-response curves for enteric viruses <sup>c</sup>							
		Rotavirus		Echovirus 12		Poliovirus 1		Poliovirus 3	
		Without correction	With correction	Without correction	With correction	Without correction	With correction	Without correction	With correction
20757	0.27	0.17	0.83	0.0008	0.36	0.000030	0.026	0.16	0.92
49254	0.14	0.04	0.74	0.0001	0.11	0.000005	0.005	0.03	0.84
53323	0.12	0.04	0.74	0.0001	0.11	0.000005	0.005	0.03	0.84
1054	0.54	0.20	0.85	0.0012	0.41	0.000042	0.035	0.20	0.93

<sup>a</sup> The risk of illness after consumption of lightly cooked clams was figured with or without applying corrective factors derived by extraction and enzyme efficiencies (11).

<sup>b</sup> The actual attack rate was calculated for each batch with the number of cases and the number of consumers associated with a batch package, assuming a single serving of 60 g of shellfish. Analyzed packages contained around 2 kg (net weight) of clams.

<sup>c</sup> Estimation based on reported dose-response models for different enteric viruses (34) and determined for consumption of 60 g of shellfish. Beta-Poisson formula:  $P_i = 1 - (1 + N/\beta)^{-\alpha}$ ,  $P_i$  being the probability of infection,  $\alpha$  and  $\beta$  the dose-response parameters, and  $N$  the exposure expressed as the number of infectious units after light cooking (see Tables 1 and 2). Values of  $\alpha$  and  $\beta$ , are, respectively, 0.26 and 0.42 for rotavirus (40), 0.374 and 186.69 for echovirus 12 (36), 0.1097 and 1,524 for poliovirus 1 (25), and 0.409 and 0.788 for poliovirus 3 (21).

TABLE 4. Genome copy numbers of HAV present in different clam batches linked to the 2008 outbreak and estimated risk of illness

Harvesting date	Genome copies/g shellfish	Estimated attack rate <sup>a</sup>		
		Uncooked	Lightly cooked	Well cooked
March 2007	$1.5 \times 10^4$	0.81	0.13	0.04
September 2007	$5.1 \times 10^3$	0.71	0.05	0.01
December 2007	$8.8 \times 10^4$	0.90	0.38	0.17
	$5.6 \times 10^3$	0.72	0.05	0.02
May 2008	$1.3 \times 10^4$	0.80	0.11	0.03
	$3.2 \times 10^3$	0.66	0.03	0.01
	$1.2 \times 10^5$	0.91	0.43	0.21

<sup>a</sup> Estimation based on the echovirus 12 reported dose-response model (34, 36). Exposure dose was figured by applying the formula and parameters described in Table 1. Data were figured by applying corrective factors derived by extraction and enzyme efficiencies. The final concentration of infectious virus after cooking was estimated by applying a reduction of the initial infectious virus in cooked shellfish as specified in Table 1 (1, 8).

with an 11% probability of infection (batches 49254 and 53323), while a dose of 420 infectious units may be associated with a 36% likelihood of infection (batch 20757) and 582 infectious units may be associated with a 41% probability of infection (batch 1054). From these data, it may be suggested that the likelihood of infection of HAV may be proportional to the dose. However, further studies are required with other outbreaks once the tools for quantitative molecular detection of the virus are implemented.

The 2008 hepatitis outbreak was long lasting (7 months) due to the involvement of nearly 4,000 tons of clams harvested in the Piura and Sechura provinces, Peru. When the outbreak was declared, risk management measures implemented by the Spanish Ministry of Health were (i) activating the national system of epidemiological surveillance to prevent the distribution of any further coquina shipments and (ii) reporting to officials at border checkpoints and the European Community Rapid Alert System for Foodstuffs. All Peruvian shellfish imports were banned in the EU, and around 1,000 tons of shellfish were immobilized. Besides the sanitary impact, the commercial economical burden of this hepatitis outbreak was overwhelming; the loss due only to the immobilized product was US\$4 million, and the losses derived from the EU ban were of enough magnitude to bankrupt the Peruvian fishery sector.

The actual attack rates associated with different clam batches could be figured for the 1999 outbreak due to the high number of cases occurring in a relatively narrow time period (184 cases in 3 months). However, the wide period in which hepatitis cases were reported in the 2008 outbreak (100 cases in 7 months) made the same quality level of case control studies unattainable. These 100 hepatitis A cases were associated with around 3,000 tons (gross weight equivalent to 1,500 tons of meat) of clams that were already consumed when the alert measures were implemented. From these data, an overall attack rate of 0.000004, assuming a single serving of 60 g, could be roughly figured, which is far below the estimated attack rate for specific HAV-positive batches (Table 4), pointing to a

small proportion of contaminated clams within the huge amount of involved mollusks.

One major issue in the monitoring of food products for virus occurrence is the representativity of the assayed sample, particularly in situations of a low proportion of contaminated samples, as occurred in the 2008 outbreak. Coquina samples from households ( $n = 9$ ) as well as from retail stores ( $n = 7$ ) directly associated with cases in the 2008 outbreak were sampled, and HAV genome copies were determined in our laboratory. Additionally, samples belonging to the same batches but obtained from import companies ( $n = 7$ ) were also analyzed. While HAV was detected in five (56%) home and two (30%) retail store samples, no virus was detected in samples from import companies (0%). Overall, HAV was detected in 44% of samples directly associated with cases but was undetectable in samples belonging to the same batches but randomly collected from the importers. Additionally, 50 samples from immobilized batches with no associated cases were also analyzed with negative results, altogether showing the difficulty of preventing outbreaks through the prospective monitoring of samples prior to the occurrence of cases in this kind of scenario. Prospective virological analysis of food is envisaged to ensure the safety of the foodstuff before public consumption. However, it is such a highly complex and costly process that obviously it cannot be universally applicable to a huge production of bivalves. The need to analyze representative samples is even more critical when the screening procedures are based on molecular analysis of minute amounts of a sample whose virus contamination, if present, is very low. Obviously any error at this step is critically carried over and impossible to correct even when highly sophisticated detection procedures are subsequently applied.

The genome copy numbers of HAV per gram of clams in positive samples from the 2008 outbreak are given in Table 4. QMRA for consumption of raw, lightly cooked, or well-cooked coquinas is also shown in Table 4. As expected, the level of heat treatment applied to the bivalves greatly influences the estimated attack rate. This has raised the possibility of including on the product label the recommendation to consume the clams well cooked, an option which is under discussion among shellfish producers and importers.

The harvesting dates of the positive samples expanded over a 1-year period, suggesting that the harvesting area contamination was a frequent event, although it likely occurred at a very low level, as suggested by the low proportion of positive isolations in the imported product. Data from the Red Bajo Piura of the Peruvian Health Authority on the occurrence of hepatitis A in the Piura and Sechura provinces reflect a moderate endemicity of HAV infection, with some symptomatic cases among a majority of asymptomatic cases. The number of hepatitis A cases per 100,000 inhabitants in the area was figured for 6-month periods from January 2007 to June 2008 (Fig. 1). The number of hepatitis A cases increased from July 2007 on, correlating with an increase both in the distribution of positive clam samples and in the number of HAV genome copies. Of note, 50% of the positive samples were harvested during the January–June 2008 period (cases per 100,000 inhabitants: 13.3), 33% during July–December 2007 (cases per 100,000 inhabitants: 11.6), and the remaining 17% during January–June 2007 (cases per 100,000 inhabitants: 3.3). Addition-

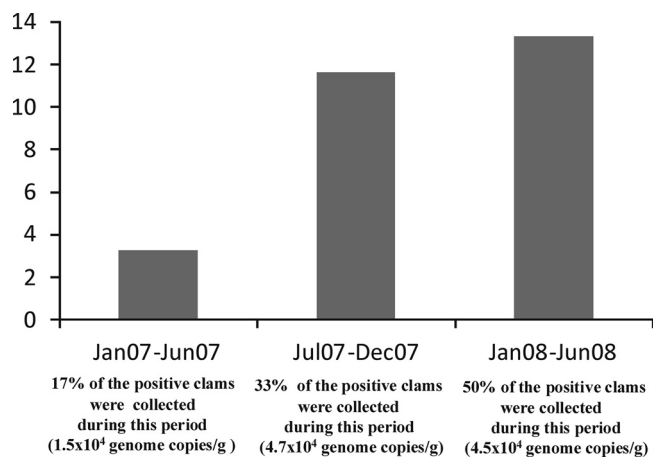


FIG. 1. Number of hepatitis A cases per 100,000 inhabitants in 6-month periods in the Piura and Sechura provinces, Peru (data from the Red Bajo Piura of the Peruvian Health Authority).

ally, the mean number of genome copies per gram of tissue of positive samples in the July–December 2007 and January–June 2008 periods also tended to be higher than that for January–June 2007 (Fig. 1), with some samples bearing a significantly higher virus load (Table 4).

The correlation between the prevalence of symptomatic hepatitis A cases among the population from the harvesting areas and positive HAV isolation in clams points to the need to identify and prevent hazards that could cause food-borne illnesses, rather than relying on random sampling of finished products to ensure safety. This constitutes the basis of the hazard analysis and critical control point system (19). A cost-effective hazard analysis and critical control point-based system applied to the viral safety of bivalves should rely on assessing hazard identification, critical limits, record keeping, and corrective actions in order to control the virological quality of harvesting areas through the continuous quantitative monitoring of such potential sources of contamination as treated or untreated wastewater or river water discharging into the shellfish-growing beds rather than the monitoring of shellfish for viruses (30). However, when evidence shows that a critical limit of viral contamination has been exceeded, quantitative virological analysis of bivalves should be performed before commercial distribution. These molecular assays for virus determination in harvesting areas and final product should be performed to address quality assurance and quality control requirements, like the one herein employed, in order to be internationally accepted in the future by regulatory agencies.

There is presently no internationally harmonized approach to shellfish testing, although bacterial indicators are almost universally employed to ensure the virological quality of bivalve mollusks. The United States and other countries require monitoring shellfish-harvesting waters, while the EU and other countries require testing the flesh of the animals (2, 3). In some particular situations, guidelines to ensure the specific virological safety of bivalve shellfish in the current situation of global food trade may be formulated and cost-effective risk management measures may be implemented. This work provides the first evidence of accurate HAV levels in shellfish involved in

outbreaks that could be of use for these risk assessment purposes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by EU projects SEAFOODplus, Food-CT-2004-506359, and Healthy-Water, Food-4B-2005-36306; Spanish Ministry of Science and Innovation projects BIO2005-05022, BIO2008-01312, and CSD2007-00016; and Generalitat de Catalunya projects 2005SGR00966 and Biotechnology Reference Network (XRB). M. I. Costafreda is a recipient of an FPI fellowship from the Ministry of Science and Innovation.

We thank the Epidemiology Section of the Directorate of Public Health of the Generalitat Valenciana for their cooperation in the present study.

#### REFERENCES

- Abad, F. X., R. M. Pinto, R. Gajardo, and A. Bosch. 1997. Viruses in mussels: public health implications and depuration. *J. Food Prot.* **60**:677–681.
- Anonymous. 2004. Regulation (EC) no. 854/2004 of the European Parliament and 16 of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of 17 official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Official Journal of the European Union* L226 of 25 June 2004:83–127.
- Anonymous. 2007. Shellfish Federal Regulations. National Shellfish Sanitation Program. Guide for the Control of Molluscan Shellfish. U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/Seafood/FederalStatePrograms/NationalShellfishSanitationProgram/ucm046353.htm>.
- Aragones, L., A. Bosch, and R. M. Pinto. 2008. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J. Virol.* **82**:1688–1700.
- Atmar, R. L., F. H. Neill, J. L. Romalde, F. Le Guyader, C. M. Woodley, T. G. Metcalf, and M. K. Estes. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3014–3018.
- Blatchley, E. R., III, W. L. Gong, J. E. Alleman, J. B. Rose, D. E. Huffman, M. Otaki, and J. T. Lisle. 2007. Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. *Water Environ. Res.* **79**:81–92.
- Bosch, A. 2007. Human viruses in water. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Bosch, A., F. X. Abad, R. Gajardo, and R. M. Pinto. 1994. Should shellfish be purified before public consumption? *Lancet* **344**:1024–1025.
- Bosch, A., G. Sanchez, F. Le Guyader, H. Vanaeloch, L. Haugarreau, and R. M. Pinto. 2001. Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Sci. Technol.* **43**:61–65.
- Conaty, S., P. Bird, G. Bell, E. Kraa, G. Grohmann, and J. M. McNulty. 2000. Hepatitis A in New South Wales, Australia from consumption of oysters: the first reported outbreak. *Epidemiol. Infect.* **124**:121–130.
- Costafreda, M. I., A. Bosch, and R. M. Pinto. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3846–3855.
- Deng, M. Y., S. P. Day, and D. O. Cliver. 1994. Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1927–1933.
- Dismukes, W. E., A. L. Bisno, S. Katz, and R. F. Johnson. 1969. An outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis due to raw clams. *Am. J. Epidemiol.* **89**:555–561.
- Gerba, C. P., J. B. Rose, C. N. Haas, and K. D. Crabtree. 1996. Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Water Res.* **30**:2929–2940.
- Haas, C. N. 1983. Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies. *Am. J. Epidemiol.* **118**:573–582.
- Haas, C. N., J. B. Rose, C. Gerba, and S. Regli. 1993. Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Anal.* **13**:545–552.
- Halliday, M. L., L.-Y. Kang, T.-Z. Zhou, M.-D. Hu, Q.-C. Pan, T.-Y. Fu, Y. S. Huang, and S.-L. Hu. 1991. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis.* **164**:852–859.
- Havelaar, A. H., and S. A. Rutjes. 2008. Risk assessment of viruses in food: opportunities and challenges, p. 221–236. *In* M. Koopmans, D. O. Cliver, and A. Bosch (ed.), *Food-borne viruses: progress and challenges*. ASM Press, Washington, DC.
- Jansen, J. 2008. Use of the Codex risk analysis framework to reduce risks associated with viruses in food, p. 209–220. *In* M. Koopmans, D. O. Cliver, and A. Bosch (ed.), *Food-borne viruses: progress and challenges*. ASM Press, Washington, DC.
- Jansen, R. W., J. E. Newbold, and S. M. Lemon. 1988. Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis A virus: comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology* **163**:299–307.



21. **Katz, M., and S. A. Plotkin.** 1967. Minimal infective dose of attenuated poliovirus for man. *Am. J. Public Health Nations Health* **57**:1837–1840.
22. **Lees, D.** 2000. Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* **59**:81–116.
23. **Le Guyader, F., L. Haugarreau, L. Miossec, E. Dubois, and M. Pommepuy.** 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3241–3248.
24. **Leoni, E., C. Bevini, S. Degli Esposti, and A. Graziano.** 1998. An outbreak of intrafamilial hepatitis A associated with clam consumption: epidemic transmission to a school community. *Eur. J. Epidemiol.* **14**:187–192.
25. **Lepow, M. L., R. J. Warren, V. G. Ingram, S. C. Daugherty, and F. C. Robbins.** 1962. Sabin type I (LSc2ab) oral poliomyelitis vaccine. Effect of dose upon response of newborn infants. *Am. J. Dis. Child.* **104**:67–71.
26. **Lowther, J. A., K. Henshilwood, and D. N. Lees.** 2008. Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *J. Food Prot.* **71**:1427–1433.
27. **Mackowiak, P. A., C. T. Caraway, and B. L. Portnoy.** 1976. Oyster-associated hepatitis: lessons from the Louisiana experience. *Am. J. Epidemiol.* **103**:181–191.
28. **Martin, L. R., G. M. Duke, J. E. Osorio, D. J. Hall, and A. C. Palmenberg.** 1996. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.* **70**:2027–2031.
29. **Mele, A., M. G. Rastelli, O. N. Gill, D. di Bisceglie, F. Rosmini, G. Pardelli, C. Valtriani, and P. Patriarchi.** 1989. Recurrent epidemic hepatitis A associated with consumption of raw shellfish, probably controlled through public health measures. *Am. J. Epidemiol.* **130**:540–546.
30. **Pintó, R. M., and A. Bosch.** 2008. Rethinking virus detection in food, p. 171–188. *In* M. Koopmans, D. O. Cliver, and A. Bosch (ed.), *Food-borne viruses: progress and challenges*. ASM Press, Washington, DC.
31. **Potasman, I., A. Paz, and M. Odeh.** 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.* **35**:921–928.
32. **Romalde, J. L., E. Area, G. Sanchez, C. Ribao, I. Torrado, X. Abad, R. M. Pinto, J. L. Barja, and A. Bosch.** 2002. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *Int. J. Food Microbiol.* **74**:119–130.
33. **Roos, B.** 1956. [Hepatitis epidemic transmitted by oysters.] *Sven. Lakartidn.* **53**:989–1003. (In Swedish.)
34. **Rose, J. B., and M. D. Sobsey.** 1993. Quantitative risk assessment for viral contamination of shellfish and coastal waters. *J. Food Prot.* **56**:1043–1050.
35. **Sanchez, G., R. M. Pinto, H. Vanaclocha, and A. Bosch.** 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4148–4155.
36. **Schiff, G. M., G. M. Stefanovic, E. C. Young, D. S. Sander, J. K. Pennekamp, and R. L. Ward.** 1984. Studies of echovirus-12 in volunteers: determination of minimal infectious dose and the effect of previous infection on infectious dose. *J. Infect. Dis.* **150**:858–866.
37. **Stroffolini, T., W. Biagini, L. Lorenzoni, G. P. Palazzesi, M. Divizia, and R. Frongillo.** 1990. An outbreak of hepatitis A in young adults in central Italy. *Eur. J. Epidemiol.* **6**:156–159.
38. **Teunis, P. F. M., G. J. Medema, L. Kruidenier, and A. H. Havelaar.** 1997. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source. *Water Res.* **31**:1333–1346.
39. **Ward, R. L., D. I. Bernstein, E. C. Young, J. R. Sherwood, D. R. Knowlton, and G. M. Schiff.** 1986. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J. Infect. Dis.* **154**:871–880.

Pintó, R.M., Costafreda, M.I., Pérez-Rodríguez, F.J., D'Andrea, L. & Bosch, A. 2010. Hepatitis A virus: state of the art. Food and Environmental Virology.



# Hepatitis A Virus: State of the Art

Rosa M. Pintó · M. Isabel Costafreda ·  
Francisco J. Pérez-Rodríguez · Lucía D'Andrea ·  
Albert Bosch

Received: 8 March 2010 / Accepted: 7 April 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** Hepatitis A is the most common among all hepatitis worldwide in spite of an efficient vaccine and improved hygiene. Shellfish-borne outbreaks are still of major concern causing hundreds of cases and huge economical losses in the present context of global food trade. Hepatitis A virus (HAV) is a unique picornavirus with many differences in its molecular biology including both its incapacity to induce the inhibition of the cellular protein synthesis and a highly biased and deoptimized codon usage with respect the cell. The final goal of this intriguing strategy seems to be the need for a fine-tuning control of the translation kinetics, particularly at the capsid coding region, and the underlying mechanism is the use of a right combination of common and rare codons to allow a regulated ribosome traffic rate thus ensuring the proper protein folding. Capsid folding is critical to warrant a high environmental stability for a virus transmitted through the fecal–oral route with long extracorporeal periods.

**Keywords** Hepatitis A · Picornavirus · Shellfish · Bivalves · Food-borne outbreaks

## Introduction

Four hundred years b.c., Hippocrates described an illness characterized by episodes of jaundice that could probably correspond to a viral hepatitis. Two thousand three hundred years later, at the beginning of the twentieth century, the term “infectious hepatitis” was defined and associated to a kind of infectious jaundice occurring in epidemics. In the early 1940s two separate entities were identified “infectious” and “serum” hepatitis, and from 1965 to nowadays the major etiological agents (hepatitis A, B, C, D and E viruses) of viral hepatitis have been identified. While all viral hepatitis are infectious the previously “infectious” and “serum” terms refer to the mode of transmission. The “infectious” type corresponds to those hepatitis transmitted through the fecal–oral route, or enteric hepatitis, and the “serum” hepatitis to those parenterally transmitted. The enteric hepatitis includes two types: hepatitis A and E which can be food borne and waterborne. The present chapter will focus on both the disease and the etiological agent of hepatitis A.

## Hepatitis A Infection: Natural Course and Epidemiology

Hepatitis A infection mostly develops asymptotically or subclinically among young children (under 5), while in older children and in the adulthood the infection usually proceeds with symptoms (Previsani et al. 2004). In this latter case, the clinical course of hepatitis A is indistinguishable from that of other types of acute viral hepatitis. The clinical case definition for hepatitis A is an acute illness with moderate onset of symptoms (fever, malaise, anorexia, nausea, abdominal discomfort, dark urine) and jaundice,

---

R. M. Pintó · M. I. Costafreda · F. J. Pérez-Rodríguez ·  
L. D'Andrea · A. Bosch  
Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology and  
Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona,  
Barcelona, Spain

R. M. Pintó (✉)  
Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology, School  
of Biology, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain  
e-mail: rpinto@ub.edu



and elevated serum bilirubin and aminotransferases levels later on. The incubation period of hepatitis A ranges from 15 to 50 days and clinical illness usually does not last longer than 2 months, although 10–15% of patients have prolonged or relapsing signs and symptoms for up to 6 months (Glikson et al. 1992; Sjogren et al. 1987). In fact, with the advent of new highly sensitive techniques even in normal clinical courses a high and long lasting viremia has been detected (Costafreda et al. 2006), with the peak (up to  $10^7$  genome copies/ml of sera) occurring at 2 weeks after the onset of symptoms and lasting up to an average of 6 weeks after the start of symptoms (Bower et al. 2000; Costafreda et al. 2006). There is no evidence of chronicity of the infection, however, occasionally the infection may proceed to a fulminant hepatitis, mainly among patients with underlying chronic liver diseases (Akriviadis and Redeker 1989; Previsani et al. 2004).

The distribution patterns of hepatitis A in different geographical areas of the world are closely related to their socioeconomic development (Gust 1992; Hollinger and Emerson 2007; Previsani et al. 2004). The endemicity is low in developed regions and high in underdeveloped countries. The epidemiological pattern has important implications on the average age of exposure and hence, as above stated, on the severity of the clinical disease. Since hepatitis A infection induces a life-long immunity (Hollinger and Emerson 2007), severe infections among adults are rare in highly endemic regions where most children are infected early in life. In contrast, in low endemic areas the disease occurs mostly in adulthood, mainly as a consequence of traveling to endemic regions, having sexual risky practices or consuming contaminated water or food and hence the likelihood of developing severe symptomatic illness is high. An epidemiological shift, from intermediate to low prevalence, has been noticed in recent decades in many countries, particularly in Southern Europe, including Spain, Italy, and Greece (Domínguez et al. 2008; Germinario et al. 2000; Van Damme and Van Herck 2005). Consequently, the Mediterranean basin as a whole should no longer be considered as an endemic area (Pintó et al. 2007a; Previsani et al. 2004).

Additionally, some other countries from Eastern Europe (Cianciara 2000; Tallo et al. 2003) have also described significant declines in the incidence of hepatitis A. Likewise, in several Asian and American countries a shift from highly to moderate endemic has as well been described (Barzaga 2000; Tanaka 2000).

### Hepatitis A Transmission: Shellfish as a Source of Big Outbreaks

After replication in the liver, hepatitis A virus (HAV) is found in the bile in large quantities, reaching the intestines

by the bile duct, and being subsequently shed in feces. Virion stability of HAV in the presence of biliary salts is guaranteed by the absence of a lipid envelope, which is not the case for serum hepatitis viruses. Symptomatic individuals as well as asymptomatic carriers shed virus that may contaminate water and food. HAV concentration in the patient stools is highest (up to  $10^{11}$  genome copies/g of feces) after 2 weeks of the onset of symptoms and lasts at least four more weeks. An additional concern is that viral excretion even in symptomatic patients starts before the onset of symptoms. Hepatitis A infection is mainly propagated via the fecal–oral route being the person-to-person contact the most common mode of transmission. In fact HAV persistence in contaminated fomites, such as sanitary paper, sanitary tile, and latex gloves, is very long (Abad et al. 1994a). In consequence, given the high excretion level of HAV, transmission of the infection is facilitated when poor sanitary conditions occur. In addition, active homosexual men are a risk group for HAV transmission and outbreaks are frequently reported (Stene-Johansen et al. 2002, 2007; Tortajada et al. 2009). Transmission through the parental route may also occasionally occur (Noble et al. 1984; Sheretz et al. 2005).

Viruses present in the stool of infected patients are discharged into sewage which ultimately may contaminate surface waters and seawater, and consequently be acquired and concentrated by shellfish growing in these waters. While in approximately 40% of the reported cases of hepatitis A the source of infection cannot be identified, food-borne outbreaks of the disease have been reported. Within this latter category, shellfish grown and harvested from waters receiving urban contaminants is a cause of many outbreaks of infectious hepatitis. The first documented shellfish-borne outbreak of “infectious hepatitis” occurred in Sweden in 1955, when 629 cases were associated with raw oyster consumption (Roos 1956). However, the most significant outbreak of HAV infection occurred in Shanghai, China, in 1988, in which almost 300,000 cases were caused by consumption of clams harvested from a sewage-polluted area (Halliday et al. 1991). In fact, this is so far the largest virus-associated outbreak of food poisoning ever reported. Smaller outbreaks have been reported worldwide (Conaty et al. 2000; Leoni et al. 1998; Mackowiak et al. 1976; Mele et al. 1989; Pintó et al. 2009; Sánchez et al. 2002; Stroffolini et al. 1990). Several issues, beside environmental parameters (see Maalouf same issue), such as the fact that fecal HAV excretion precedes the onset of symptoms, together with the difficulties to completely remove and or inactivate viruses through sewage treatment (Blatchley III et al. 2007; Bosch 2007) makes hepatitis shellfish-borne outbreaks hard to prevent if the virus is circulating among the population.

## Hepatitis A Virus: General Features

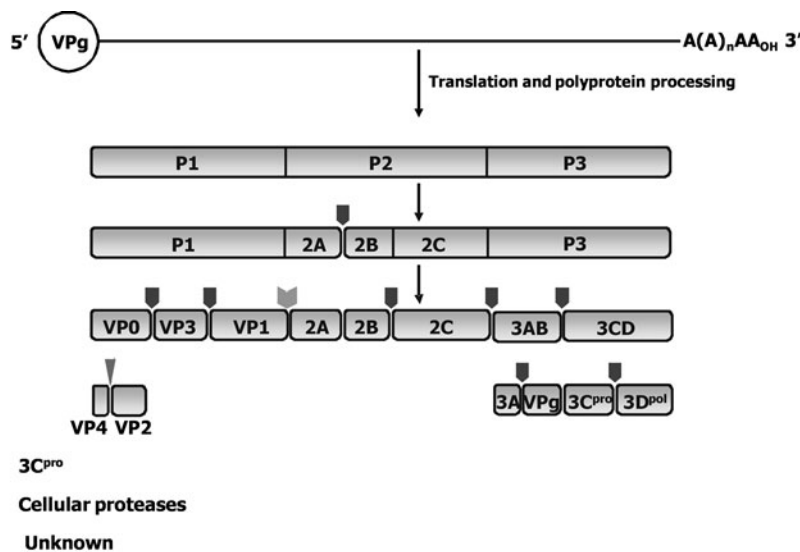
The etiological agent of hepatitis A is the HAV which belongs to genus *Hepatovirus* within family Picornaviridae, and as such it consists of a non-enveloped icosahedral capsid of around 30 nm in diameter containing a positive ssRNA genomic molecule of 7.5 kb (Fauquet et al. 2005). The genome contains a single open reading frame (ORF) encoding a polyprotein of around 2225 amino acids preceded by a 5' non-coding-region (5'NCR) that makes around 10% of the total genome, and followed by a much shorter 3'NCR that contains a poly(A) tract (Baroudy et al. 1985; Cohen et al. 1987). This genome is uncapped but covalently linked to a small viral protein (VPg) (Weitz et al. 1986). The singly translated polyprotein is subsequently cleaved into 11 proteins through a cascade of proteolytic events brought about mainly by the viral 3C protease (Schultheiss et al. 1994; Schultheiss et al. 1995). A general scheme of HAV genome organization and translation products is depicted in Fig. 1. However, although the general genomic organization and the expression pattern of HAV are very similar to those of most picornaviruses (Agol 2002; Hollinger and Emerson 2007), many differences exist which are discussed in the next section.

### HAV Unique Properties: The Low Translation Rate Necessary to Ensure a High Capsid Stability is Associated with a Low Antigenic Variability

The genetic distance between the genus *Hepatovirus* and the other genera of the family reflects not merely a difference in the nucleotide and amino acid composition but a difference in the molecular and biological characteristics of

HAV. From the genomic and proteomic points of view, several interrelated key issues must be brought up. First of all, the structure of the 5'NCR and its internal ribosome entry site (IRES). The HAV IRES is unique among picornaviruses and constitutes the type III model (Brown et al. 1994; Ehrenfeld and Teterina 2002), which shows a very low efficiency in directing translation (Whetter et al. 1994) compared to the other picornavirus IRESs. Second, HAV encodes only a protease, 3C, while other picornavirus codes for additional proteases such as the L protease, in genus *Aphthovirus*, or the 2A protease in *Enterovirus* and *Rhinovirus* genera (Leong et al. 2002). L and 2A proteases, when present, play a crucial role in the primary cleavages of the viral polyprotein while in those genera lacking these proteases, such *Hepatovirus* and *Paraechovirus*, both primary and secondary cleavages are conducted by the 3C protease. But what is most important is that these additional proteases are involved in the cellular protein shutoff induction (Leong et al. 2002). Since picornaviruses utilize a mechanism of translation that is cap-independent and IRES-dependent, the inhibition of non-essential cap-dependent cellular translation could be advantageous to the virus. In doing so, the cellular translation machinery is utilized almost exclusively for the production of viral proteins (Kuechler et al. 2002). An early event preceding the shutoff of host cell protein synthesis is the cleavage of the cellular translation initiation factor eIF4G, and evidence exists supporting that the enzymes responsible of such a cleavage are 2A and L proteases in enteroviruses and rhinoviruses, and aphthoviruses, respectively (Kuechler et al. 2002). An immediate consequence of the lack of any of these proteolytic activities in HAV is its incapacity to induce cellular shutoff which otherwise is directly related with its requirement for an intact uncleaved eIF4G factor for the formation of the initiation of translation complex

**Fig. 1** Organization of the hepatitis A virus genome. *Top* Diagram of the virus genome depicting the genome-linked VPg protein at the 5' end and the poly A tail at the 3' end. *Bottom* Proteolytic processing pattern of the polyprotein resulting after translation



(Borman et al. 1997; Jackson 2002). What has been described up to now denotes that HAV must inefficiently compete for the cellular translational machinery and thus it presents a unique translation strategy. This points out to the third difference between HAV and other picornavirus members: the codon usage. HAV presents a higher codon usage bias compared to other members of its family, which conveys in the adaptation to use abundant and rare codons (Sánchez et al. 2003b). In fact, 14 amino acid codon families contain rare codons, defined in terms of their frequencies, making a total of 22 used rare codons (Pintó et al. 2007b). But what is more surprising is that the HAV codon usage has evolved to be complementary to that of human cells, never adopting as abundant codons those abundant for the host cell, and even in some instances using these latter as rare codons. This disparity, unique to HAV, has been interpreted as a subtle strategy to avoid, as much as possible, competition for the cellular tRNAs in the absence of a precise mechanism of inducing shut-off of cellular protein synthesis (Sánchez et al. 2003b). As stated before, a consequence of this special codon bias is an increase in the number of rare codons used by HAV. Overall this increment is the result of the addition to the cellular rare codons, also used as rare by the virus, of those most abundant cellular codons that being unavailable for the virus are used at low frequencies. Altogether, the HAV codon usage may contribute to its slow replication and to its low yields. It has been largely documented (Chou and Lakatos 2004; Robinson et al. 1984; Sorensen et al. 1989) the role of rare codons in the control of translation speed, in the sense that clusters of rare codons would induce a transient stop of the translational complex in order to seek for a suitable tRNA present at a very low concentration among the pool of tRNAs. A function of these ribosome stallings has been suggested to be the assurance of the proper folding of the nascent protein (Adzhubei et al. 1996; Evans et al. 2005; Gavrilin et al. 2000). Such a function has been postulated for HAV, where highly conserved clusters of rare codons strategically located at the carboxy-ends of the structured elements of the capsid coding region have been reported (Sánchez et al. 2003b). In fact, the critical role of HAV codon usage, and particularly of these clusters of rare codons of the capsid coding region, has been shown during the process of adaptation of HAV to conditions of artificially induced cellular shutoff (Aragonès et al. 2010). An overall change in codon usage was necessary to regain viral fitness in these conditions, with a clear re-optimization with respect to the cellular codon usage, and particularly affecting the rare codons located at the abovementioned strategic positions of the capsid (Aragonès et al. 2010). This mechanism of adaptation to the cellular shutoff proves translation kinetics, i.e., the right combination of codons (common and rare) that allows a regulated

ribosome traffic rate ensuring the proper protein folding, as the driving selective force of HAV codon usage.

Additionally, a certain contribution of the codon usage to the low variability of the HAV capsid has been proposed taking into account that 15% of its surface residues are encoded by such functional rare codons, (Sánchez et al. 2003b). This low capsid variability indeed correlates with a very low antigenic variability: a single serotype exists, being this another striking difference with other picornaviruses. The low capsid variability relies on negative selection acting against newly arising proteins with replacements affecting the residues encoded by rare codons of the capsid surface, even under immune pressure (Aragonès et al. 2008), confirming again certain beneficial role of such rare codons. Since the clusters of rare codons are located near or at the epitope regions, the need to maintain such clusters might prevent the emergence of new serotypes.

Other important differences exist between HAV and other picornaviruses at the morphogenetic/structural level. The role of both ends (amino-VP4 and carboxi-2A) of the capsid polyprotein in the virion assembly is still controversial (Probst et al. 1999), and while there is no agreement on the requirement of VP4 for the maturation of pentamers into capsids, a complete consensus exists on the necessity of 2A for pentamer formation (Martin and Lemon 2006; Probst et al. 1999). The ulterior removal of 2A in the mature virion must be performed by a host cell protease (Graff et al. 1999; Martin et al. 1999), although the mature 2A protein has never been identified directly in infected cells.

The X-ray crystallographic structure has not yet been solved, due to the low viral yields obtained by in vitro replication. However, recent three-dimensional images of HAV produced by cryoelectron microscopy (Holland Cheng, unpublished results) have revealed important data being the most intriguing the lack of a well-defined canyon around the fivefold axis of symmetry. The pit region of many picornaviruses contains the receptor binding residues playing, thus, an important biological role. A human HAV receptor (huhavr-1) has been identified (Feigelstock et al. 1998), which contains both an amino terminal Ig-like domain followed by a mucin-like domain (Silberstein et al. 2003). Huhavr-1 has been detected in several human tissues, including the liver. Alternatively, the asialoglycoprotein receptor, to which IgA binds to, has been described to enable HAV internalization provided that the virus is complexed with such immunoglobulin (Dotzauer et al. 2000). However, whichever is the receptor, the capsid region involved in such an interaction remains to be elucidated. In contrast, the capsid region interacting with the glycoporphin A of the human erythrocytes is indeed located around the putative pit area (Sánchez et al. 2004). The capsid structure, however, is such that tolerates this

interaction only to occur at acid conditions, being impaired at neutral biological conditions. Erythrocyte glycoproteins may function as decoy receptors attracting pathogens to the erythrocyte and keeping them away from target tissues (Gagneux and Varki 1999), and hence the actual capsid conformation that allows escaping from erythrocyte attachment may constitute an advantage for a viremic infectious agent whose target organ is the liver. In fact, pathogenesis is in part determined by the spread of the virus to the target tissues. In this context, key factors for the viral biological cycle and infection outcome are a high stability to the acid pH of the stomach during the entry phase, a safe viremic phase, and resistance to the action of detergents, particularly biliary salts, during the exit phase. This extremely resistant phenotype of HAV explains its high persistence in the environment (Abad et al. 1994a, b) and its transmission by contaminated foods and drinking water (Bosch et al. 1991; Dentinger et al. 2001; Pintó et al. 2009; Reid and Robinson 1987; Roseblum et al. 1990; Sánchez et al. 2002), which probably are the result of a highly cohesive capsid conformation mediated through a very accurate folding ensured by a highly controlled kinetics of translation.

### Quasispecies and its Implications in Genetic Variability

Viral genetic variability results from the universal mechanisms of mutation, recombination, and genome segment reassortment, all them being replication-dependent. Since virus populations replicate at exceptionally high rates, they may be extremely variable. All this is particularly critical in RNA viruses, since they rely on error-prone polymerases lacking proof-reading activity which leads to complex mutant genome populations or quasispecies. Viral quasispecies are dynamic distributions of nonidentical but closely related viral genomes subjected to a continuous process of genetic variation, competition, and selection and which act as a unit of selection (review in Domingo et al. 2006). HAV as a RNA virus occurs as a swarm of mutants termed quasispecies (Sánchez et al. 2003a). In spite of the low antigenic variability of HAV, a certain degree of nucleotide variability, similar to that of other picornavirus, exists and allows the differentiation of HAV into several genotypes and subgenotypes. Different genomic regions, mainly from the capsid coding region (P1) or the junction between the capsid region (P1) and the contiguous non-structural region (P2), have been used to differentiate the genotypes. Particularly, the carboxy-terminus of the VP3 structural protein, the amino-terminus of the VP1 structural protein, the VP1X2A junction, the region spanning the carboxy-end of VP1 till the amino-terminus of 2B (VP1/P2B), and finally the entire VP1 region (see the review of Nainan et al. 2006).

However, partial genomic sequences will never guarantee the reliability of the complete P1/2A region. As a matter of fact, the identification of some HAV antigenic variants affecting residues not included in the genotyping regions (Costa-Mattioli et al. 2002; Gabrieli et al. 2004; Sánchez et al. 2002) could have been elusive in such circumstances. This is the reason why the use of long genomic regions covering at least the entire VP1 including its 2A junction, has recently been recommended (Costa-Mattioli et al. 2002); European HAV Network, unpublished results) for a more broad molecular typing of HAV. Nevertheless, the VP1X2A junction is still the genomic region most in use worldwide (Robertson et al. 1992). In this region, seven genotypes were initially defined, whose genetic distance was >15% nucleotide variation. After refining this classification through the addition of more sequences, only six genotypes exist at the present time (Costa-Mattioli et al. 2002; Lu et al. 2004). Three out of these six genotypes (I, II, and III) are of human origin while the others (IV, V, and VI) are of simian origin. Genotypes I and II contain subgenotypes (Ia, Ib, IIa, and IIb) defined by a nucleotide divergence of 7–7.5%. Although it is generally accepted that the severity of hepatitis A is mostly related with host factors such as aging and the occurrence of other underlying liver diseases, viral factors may also play a role in pathogenesis. Among these viral factors it may be pointed that some mutations at the 5'NCR of HAV or at the VP1X2A and 2C regions have been associated with fulminant hepatitis (Fujiwara et al. 2001, 2002, 2003) or higher virulence in tamarinds (Emerson et al. 2002), respectively. However, there is no consensus whether the VP1X2A-derived genotypes are clinically different, although some strains belonging to the former genotype VII now included in genotype II were associated with fulminant cases (Ching et al. 2002; Costa-Mattioli et al. 2002).

In addition to the clinical implications of genetic variability, genotype characterization may be highly relevant to trace the origin of outbreaks. However, when typing outbreak-related isolates, it must be borne in mind that not always an identical nucleotide sequence is obtained from a putative source virus (e.g. contaminated food or water) and the virus found in the infected recipients. High mutation rates render very unlikely the complete conservation of sequences as soon as virus replication occurs, in this case in the infected individuals.

### Prevention of Hepatitis A

Inactivated HAV vaccines are available since the early 1990s and provide long-lasting immunity against hepatitis A infection. The immunity is largely related to the induction of high titers of specific antibodies. Thanks to the



existence of a single serotype of HAV, these vaccines are of high efficacy. These vaccines consist of viruses grown in cell culture, purified, inactivated with formalin and adsorbed to an aluminum hydroxide adjuvant, making their economic cost quite high. This is the reason why many discrepancies already exist on their universal use in massive vaccination campaigns. Countries with previous intermediate endemicity of HAV such as Israel or some Autonomous Communities of Spain such as Catalonia, or some States of United States have performed studies on the impact of child vaccination on the overall incidence of hepatitis A concluding that the immunization is medically (Domínguez et al. 2008; Wasley et al. 2005) and economically (Dagan et al. 2005) justified. In contrast other countries in a similar situation such as Italy do not recommend at present the implementation of such a measure in terms of cost-benefits (Franco and Vitiello 2003). In this context is quite evident that high endemic countries that usually have low economic incomes do not regard the vaccination against hepatitis A as a primary policy (Teppakdee et al. 2002).

Although several attenuated vaccine candidates have also been attempted, due to the successful use of inactivated vaccines, its development is hardly plausible.

As a general rule in low and intermediate endemic regions, where paradoxically the severity of the disease is high, vaccination against hepatitis A should be recommended in high-risk groups, including travelers to high endemic areas, men having sex with men, drug users and patients receiving blood products. In addition, the inclusion of hepatitis A vaccines in mass vaccination programs in those countries receiving high numbers of immigrants from endemic countries is particularly advisable. However, and bearing in mind the quasispecies replication pattern of HAV (Sánchez et al. 2003a) that in populations with continued exposure to the virus could lead to the selection of new antigenic variants escaping immune protection (Aragonès et al. 2008), mass vaccination programs in highly endemic areas are controversial.

Food safety implementation programs represent important prevention actions. Prospective virological analysis of shellfish is such a highly complex and costly process that obviously cannot be universally applicable to the huge production of shellfish. The first difficulty to overcome is to choose representative samples; even more when the screening procedures are based on molecular analysis of minute amounts of a sample, whose virus contamination, if present, is very low. A sensible prospective food safety approach is to identify and prevent hazards that could cause food-borne illnesses, rather than relying on spot-checks of manufacturing processes and random sampling of finished products to ensure safety (Pintó and Bosch 2008). For instance, in the particular case of hepatitis A, significant

correlation between cases in the harvesting areas and positive HAV isolation in clams has been observed (Pintó et al. 2009). However, when evidence shows that a critical limit of viral contamination has been exceeded in the potential sources of contamination discharging into the shellfish growing beds, quantitative virological analysis addressing QA/QC requirements should be performed in the bivalves, since HAV levels in shellfish are predictors of the magnitude of the outbreak and can be used for risk assessment purposes (Pintó et al. 2009).

### Future Impact

Many centuries after Hippocrates description of hepatitis clinical symptoms, HAV is still the most common cause of viral hepatitis worldwide in spite of an efficient vaccine and improved hygiene that do not prevent the occurrence of shellfish-borne outbreaks. Global trade, climate change, and the inherent genetic variability in association with vaccination campaigns may promote the emergence of new variants. All this calls for the need to trace and characterize the circulating strains.

### References

- Abad, F. X., Pintó, R. M., & Bosch, A. (1994a). Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 3704–3710.
- Abad, F. X., Pintó, R. M., Díez, J. M., & Bosch, A. (1994b). Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 2377–2383.
- Adzhubei, A. A., Adzhubei, I. A., Krashennikov, I. A., & Neidle, S. (1996). Non-random usage of “degenerate” codons is related to protein three-dimensional structure. *FEBS Letters*, *399*, 78–82.
- Agol, V. I. (2002). Picornavirus genetics: An overview. In B. L. A. W. E. Semler (Ed.), *Molecular biology of picornaviruses* (pp. 269–284). Washington, DC: ASM.
- Akriviadis, E. A., & Redeker, A. G. (1989). Fulminant hepatitis A in intravenous drug users with chronic liver disease. *Annals of Internal Medicine*, *110*, 838–839.
- Aragonès, L., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2008). Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: Codon usage constraints limit capsid variability. *Journal of Virology*, *82*, 1688–1700.
- Aragonès, L., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2010). Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. *PLoS Pathogens*, *6*, e1000797.
- Baroudy, B. M., Ticehurst, J. R., Miele, T. A., Maizel, J. V., Jr., Purcell, R. H., & Feinstone, S. M. (1985). Sequence analysis of hepatitis A virus cDNA coding for capsid proteins and RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*, 2143–2147.
- Barzaga, N. G. (2000). Hepatitis A shifting epidemiology in South-East Asia and China. *Vaccine*, *18*, S61–S64.

- Blatchley, E. R., III, Gong, W. L., Alleman, J. E., Rose, J. B., Huffman, D. E., Otaki, M., et al. (2007). Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. *Water Environmental Research*, 79, 81–92.
- Borman, A. M., Kirchweber, R., Ziegler, E., Rhoads, R. E., Skern, T., & Kean, K. M. (1997). eIF4G and its proteolytic cleavage products: Effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA*, 3, 186–196.
- Bosch, A. (2007). *Human viruses in water*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Bosch, A., Lucena, F., Díez, J. M., Gajardo, R., & Blasi, M. (1991). Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *Journal of the American Water Works Association*, 83(3), 80–83.
- Bower, W., Nainan, O., Han, X., & Margolis, H. (2000). Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 182, 12–17.
- Brown, E. A., Zajac, A. J., & Lemon, S. M. (1994). In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: Comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *Journal of Virology*, 68, 1066–1074.
- Ching, K. Z., Nakano, T., Chapman, L. E., Demby, A., & Robertson, B. H. (2002). Genetic characterization of wild-type genotype VII hepatitis A virus. *Journal of General Virology*, 83, 53–60.
- Chou, T., & Lakatos, G. (2004). Clustered bottlenecks in mRNA translation and protein synthesis. *Physical Review Letters*, 93, 198101–198104.
- Cianciara, J. (2000). Hepatitis A shifting epidemiology in Poland and Eastern Europe. *Vaccine*, 18(Suppl 1), S68–S70.
- Cohen, J. I., Ticehurst, J. R., Purcell, R. H., Buckler-White, A., & Baroudy, B. M. (1987). Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: Comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *Journal of Virology*, 61, 50–59.
- Conaty, S., Bird, P., Bell, G., Kraa, E., Grohmann, G., & McNulty, J. M. (2000). Hepatitis A in New South Wales, Australia from consumption of oysters: The first reported outbreak. *Epidemiology and Infection*, 124, 121–130.
- Costafreda, M. I., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2006). Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3846–3855.
- Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H., Pérez-Bercof, R., Casane, D., Colina, R., et al. (2002). Molecular evolution of hepatitis A virus: A new classification based on the complete VP1 protein. *Journal of Virology*, 76, 9516–9525.
- Dagan, R., Leventhal, A., Anis, E., Slater, P., Ashur, Y., & Shouval, D. (2005). Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *JAMA—Journal of the American Medical Association*, 294, 202–210.
- Dentinger, C. M., Bower, W. A., Nainan, O. V., Cotter, S. M., Myers, G., Dubusky, L. M., et al. (2001). An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *Journal of Infectious Diseases*, 183, 1273–1276.
- Domínguez, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J., & Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: Biological implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 299, 51–82.
- Domínguez, A., Oviedo, M., Carmona, G., Batalla, J., Bruguera, M., Salleras, L., et al. (2008). Impact and effectiveness of a mass hepatitis A vaccination programme of preadolescents seven years after introduction. *Vaccine*, 26, 1737–1741.
- Dotzauer, A., Gebhardt, U., Bieback, K., Gottke, U., Kracke, A., Mages, J., et al. (2000). Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *Journal of Virology*, 74, 10950–10957.
- Ehrenfeld, E., & Teterina, N. L. (2002). Initiation of translation of picornavirus RNAs: Structure and function of the internal ribosome entry site. In B. L. W. E. Semler (Ed.), *Molecular biology of picornaviruses* (pp. 159–169). Washington, DC: ASM Press.
- Emerson, S. U., Huang, Y. K., Nguyen, H., Brockington, A., Govindarajan, S., St, C. M., et al. (2002). Identification of VP1/2A and 2C as virulence genes of hepatitis A virus and demonstration of genetic instability of 2C. *Journal of Virology*, 76, 8551–8559.
- Evans, M. S., Clarke, T. F., & Clark, P. L. (2005). Conformations of co-translational folding intermediates. *Protein and Peptide Letters*, 12, 189–195.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (2005). *Virus taxonomy, eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. New York, NY: Elsevier Academic Press.
- Feigelstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., Zhang, Y., & Kaplan, G. G. (1998). The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *Journal of Virology*, 72, 6621–6628.
- Franco, E., & Vitiello, G. (2003). Vaccination strategies against hepatitis A in southern Europe. *Vaccine*, 21, 696–697.
- Fujiwara, K., Yokosuka, O., Ehata, T., Saisho, H., Saotome, N., Suzuki, K., et al. (2002). Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA: Strains from fulminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions. *Gut*, 51, 82–88.
- Fujiwara, K., Yokosuka, O., Fukai, K., Imazeki, F., Saisho, H., & Omata, M. (2001). Analysis of full-length hepatitis A virus genome in sera from patients with fulminant and self-limited acute type A hepatitis. *Journal of Hepatology*, 35, 112–119.
- Fujiwara, K., Yokosuka, O., Imazeki, F., Saisho, H., Saotome, N., Suzuki, K., et al. (2003). Analysis of the genotype-determining region of hepatitis A viral RNA in relation to disease severities. *Hepatology Research*, 25, 124–134.
- Gabrieli, R., Sánchez, G., Macaluso, A., Cenko, F., Bino, S., Palombi, L., et al. (2004). Hepatitis in Albanian children: Molecular analysis of hepatitis A virus isolates. *Journal of Medical Virology*, 72, 533–537.
- Gagneux, P., & Varki, A. (1999). Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*, 9, 747–755.
- Gavrilin, G., Cherkasova, E. A., Lipskaya, G. Y., Kew, O. M., & Agol, V. I. (2000). Evolution of circulating wild poliovirus and vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: A unifying model. *Journal of Virology*, 74, 7381–7390.
- Germinario, C., Luigi Lopalco, P., Chicanna, M., & Da Villa, G. (2000). From hepatitis B to hepatitis A and B prevention: The Puglia (Italy) experience. *Vaccine*, 18, 3326.
- Glikson, M., Galun, E., Oren, R., Tur-Kaspa, R., & Shouval, D. (1992). Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. *Medicine (Baltimore)*, 71, 14–23.
- Graff, J., Richards, O. C., Swiderek, K. M., Davis, M. T., Rusnak, F., Harmon, S. A., et al. (1999). Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogeneous C terminus. *Journal of Virology*, 73, 6015–6023.
- Gust, I. D. (1992). A vaccine against hepatitis A—at last. *Medical Journal of Australia*, 157, 345–346.
- Halliday, M. L., Kang, L.-Y., Zhou, T.-Z., Hu, M.-D., Pan, Q.-C., Fu, T.-Y., et al. (1991). An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *Journal of Infectious Diseases*, 164, 852–859.
- Hollinger, F. B., & Emerson, S. U. (2007). Hepatitis A virus. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (pp. 911–947). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

- Jackson, T. A. (2002). Proteins involved in the function of picornavirus internal ribosome entry sites. In B. L. W. E. Semler (Ed.), *Molecular biology of picornaviruses* (pp. 171–186). Washington, DC: ASM Press.
- Kuechler, E., Seipelt, J., Liebig, H.-D., & Sommergruber, W. (2002). Picornavirus proteinase-mediated shutoff of host cell translation: Direct cleavage of a cellular initiation factor. In B. L. W. E. Semler (Ed.), *Molecular biology of picornaviruses* (pp. 301–312). Washington, DC: ASM Press.
- Leong, L. E. C., Cornell, C. T., & Semler, B. L. (2002). Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus. In B. L. W. E. Semler (Ed.), *Molecular biology of picornaviruses* (pp. 187–198). Washington, DC: ASM Press.
- Leoni, E., Bevini, C., Degli Esposti, S., & Graziano, A. (1998). An outbreak of intrafamilial hepatitis A associated with clam consumption: Epidemic transmission to a school community. *European Journal of Epidemiology*, *14*, 187–192.
- Lu, L., Ching, K. Z., de Paula, V. S., Nakano, T., Siegl, G., Weitz, M., et al. (2004). Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *Journal of General Virology*, *85*, 2943–2952.
- Mackowiak, P. A., Caraway, C. T., & Portnoy, B. L. (1976). Oyster-associated hepatitis: Lessons from the Louisiana experience. *American Journal of Epidemiology*, *103*, 181–191.
- Martin, A., Bénichou, D., Chao, S. F., Cohen, L., & Lemon, S. M. (1999). Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3Cpro proteinase. *Journal of Virology*, *73*, 6220–6227.
- Martin, A., & Lemon, S. M. (2006). Hepatitis A virus: From discovery to vaccines. *Hepatology*, *43*, S164–S172.
- Mele, A., Rastelli, M. G., Gill, O. N., di Bisceglie, D., Rosmini, F., Pardelli, G., et al. (1989). Recurrent epidemic hepatitis A associated with consumption of raw shellfish, probably controlled through public health measures. *American Journal of Epidemiology*, *130*, 540–546.
- Nainan, O. V., Xia, G. L., Vaughan, G., & Margolis, H. S. (2006). Diagnosis of hepatitis A virus infection: A molecular approach. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*, 63–79.
- Noble, R. C., Kane, E. M., Reeves, S. A., & Roeckle, I. (1984). Posttransfusional hepatitis A in a neonatal intensive care unit. *The Journal of the American Medical Association*, *252*, 2711–2715.
- Pintó, R. M., Alegre, D., Domínguez, A., El Senousy, W. M., Sánchez, G., Villena, C., et al. (2007a). Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiology and Infection*, *135*, 270–273.
- Pintó, R. M., Aragonès, L., Costafreda, M. I., Ribes, E., & Bosch, A. (2007b). Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Research*, *127*, 158–163.
- Pintó, R. M., & Bosch, A. (2008). Rethinking virus detection in food. In M. Koopmans, D. O. Cliver, & A. Bosch (Eds.), *Foodborne viruses: Progress and challenges* (pp. 171–188). Washington, DC, USA: ASM Press.
- Pintó, R. M., Costafreda, M. I., & Bosch, A. (2009). Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*, 7350–7355.
- Previsani, N., Lavanchy, D., & Siegl, G. (2004). Hepatitis A. In I. K. Mushahwar (Ed.), *Viral hepatitis molecular biology diagnosis epidemiology and control* (pp. 1–30). California: Elsevier.
- Probst, C., Jecht, M., & Gauss-Muller, V. (1999). Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *Journal of Biological Chemistry*, *274*, 4527–4531.
- Reid, T. M. S., & Robinson, H. G. (1987). Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiology and Infection*, *98*, 109–112.
- Robertson, B. H., Jansen, R. W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O. V., Siegl, G., et al. (1992). Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology*, *73*, 1365–1377.
- Robinson, M., Lilley, R., Little, S., Emtage, J. S., Yarranton, G., Stephens, P., et al. (1984). Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *12*, 6663–6671.
- Roos, B. (1956). Hepatitis epidemic transmitted by oysters. *Svenska Läkartidningen*, *53*, 989–1003.
- Roseblum, L. S., Mirkin, I. R., Allen, D. T., Safford, S., & Hadler, S. C. (1990). A multistate outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *American Journal of Public Health*, *80*, 1075–1080.
- Sánchez, G., Aragonès, L., Costafreda, M. I., Ribes, E., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2004). Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycophorin A of the erythrocyte membrane. *Journal of Virology*, *78*, 9807–9813.
- Sánchez, G., Bosch, A., Gomez-Mariano, G., Domingo, E., & Pintó, R. M. (2003a). Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology*, *315*, 34–42.
- Sánchez, G., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2003b). Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *Journal of Virology*, *77*, 452–459.
- Sánchez, G., Pintó, R. M., Vanaclocha, H., & Bosch, A. (2002). Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*, 4148–4155.
- Schultheiss, T., Emerson, S. U., Purcell, R. H., & Gauss-Muller, V. (1995). Polyprotein processing in echovirus 22: A first assessment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *217*, 1120–1127.
- Schultheiss, T., Kusov, Y. Y., & Gauss-Muller, V. (1994). Proteinase 3C of hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2–P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. *Virology*, *198*, 275–281.
- Sheretz, R. J., Russell, B. A., & Reunman, P. D. (2005). Transmission of hepatitis A by transfusion of blood products. *Archives of Internal Medicine*, *1441*, 1579–1580.
- Silberstein, E., Xing, L., van de, B. W., Lu, J., Cheng, H., & Kaplan, G. G. (2003). Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin-and mucin-like regions. *Journal of Virology*, *77*, 8765–8774.
- Sjogren, M. H., Tanno, H., Fay, O., Sileoni, S., Cohen, B. D., Burke, D. S., et al. (1987). Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Annals of Internal Medicine*, *106*, 221–226.
- Sorensen, M. A., Kurland, C. G., & Pedersen, S. (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *207*, 365–377.
- Stene-Johansen, K., Jenun, P. A., Hoel, T., Blystad, H., Sunde, H., & Skaug, K. (2002). An outbreak of hepatitis A among homosexuals linked to a family outbreak. *Epidemiology and Infection*, *129*, 113–117.
- Stene-Johansen, K., Tjon, G., Schreier, E., Bremer, V., Bruisten, S., Ngui, S. L., et al. (2007). Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *Journal of Medical Virology*, *79*, 356–365.
- Stroffolini, T., Biagini, W., Lorenzoni, L., Palazzesi, G. P., Divizia, M., & Frongillo, R. (1990). An outbreak of hepatitis A in young adults in central Italy. *European Journal of Epidemiology*, *6*, 156–159.
- Tallo, T., Norder, H., Tefanova, V., Ott, K., Ustina, V., Prukk, T., et al. (2003). Sequential changes in hepatitis A virus genotype distribution in Estonia during 1994 to 2001. *Journal of Medical Virology*, *70*, 187–193.
- Tanaka, J. (2000). Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine*, *18*, S57–S60.

- Teppakdee, A., Tangwitoon, A., Khemasuwan, D., Tangdhanakanond, K., Suramaethakul, N., Sriratanaban, J., et al. (2002). Cost-benefit analysis of hepatitis a vaccination in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *33*, 118–127.
- Tortajada, C., de Olalla, P. G., Pintó, R. M., Bosch, A., & Cayla, J. (2009). Outbreak of hepatitis A among men who have sex with men in Barcelona, Spain, September 2008–March 2009. *Euro-surveillance* *14*(15): pii: 19175.
- Van Damme, P., & Van Herck, K. (2005). Effect of hepatitis A vaccination programs. *JAMA-Journal of the American Medical Association*, *294*, 246–248.
- Wasley, A., Samandari, T., & Bell, B. P. (2005). Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination. *Journal of the American Medical Association*, *294*, 194–201.
- Weitz, M., Baroudy, B. M., Maloy, W. L., Ticehurst, J. R., & Purcell, R. H. (1986). Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *Journal of Virology*, *60*, 124–130.
- Whetter, L. E., Day, S. P., Elroystein, O., Brown, E. A., & Lemon, S. M. (1994). Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *Journal of Virology*, *68*, 5253–5263.





Pérez-Sautu, U., Costafreda, M.I., Lite, J., Sala, R., Barrabeig, I., Bosch, A. & Pintó, R.M. 2011. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005–2009: Circulation of newly emerging strains. *Journal of Clinical Virology*, 52: 98-102.





## Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005–2009: Circulation of newly emerging strains

Unai Pérez-Sautu<sup>a</sup>, M. Isabel Costafreda<sup>a</sup>, Josep Lite<sup>b</sup>, Rosa Sala<sup>c</sup>, Irene Barrabeig<sup>c</sup>, Albert Bosch<sup>a,\*</sup>, Rosa M. Pintó<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Enteric Virus Laboratory, Department of Microbiology and Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> CatLab, Viladecavalls, Spain

<sup>c</sup> Department of Health, Autonomous Government of Catalonia, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 April 2011

Received in revised form 10 June 2011

Accepted 24 June 2011

#### Keywords:

Hepatitis A virus

Genotype

Food imports

MSM

### ABSTRACT

**Background:** In spite of annual vaccination campaigns, hepatitis A cases increased in Catalonia (North-East Spain) in the period 2002–2005 calling for the elucidation of the underlying mechanisms associated to the epidemiological shifts.

**Objective:** The molecular characterization of the circulating strains to trace their origin and the study of the effects of vaccination on the incidence of sporadic and outbreak-associated cases.

**Study design:** Forty-eight different hepatitis A virus (HAV) strains isolated from sporadic and outbreaks cases during 2005–2009 in Catalonia were molecularly characterized.

**Results:** Seventeen out of 48 strains were imported from endemic areas through traveling, immigration and food trade, 12 were endemic strains circulating in the men having sex with men (MSM) group and 1 was from a Roman child. The remaining 18 could not be associated to any specific origin and thus were considered autochthonous. Forty-eight percent of the strains belonged to subgenotype IA, 40% to subgenotype IB and 2% to subgenotype IIIA. The remaining 10% belonged to an undetermined subgenotype equidistant from IA and IB.

**Conclusions:** During the period 2005–2009, the annual attack rates remained around 3.5 and even increased up to 6.5 in the first half of 2009. This increase with respect to the period 1999–2001, in which vaccination campaigns started to be implemented, is explained by an increase in the number of outbreaks. The predominant subgenotypes were IA and IB. However a considerable amount of strains imported from Peru through consumption of contaminated shellfish belonged to an undetermined subgenotype that may constitute a new candidate subgenotype IC.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Background

The incidence of hepatitis A in Catalonia (North-East Spain) significantly decreased during the period 2000–2001 due to the implementation since 1999 of a vaccination program among preadolescents.<sup>1</sup> The effectiveness of the vaccination campaign is clearly reflected in the attack rate reduction from 6.2 cases per 100,000 inhabitants in the period 1996–98 to 2.6 in the period 1999–2001. However since 2001, the number of cases raised,<sup>2</sup> in spite of annual vaccination campaigns, with an increase of the attack rate up to 3.5 in the period 2002–2005.

\* Corresponding author at: Department of Microbiology, School of Biology, Diagonal 645, 08028, Barcelona, Spain. Tel.: +34 934034620; fax: +34 934034629.

\*\* Corresponding author at: Department of Microbiology, School of Biology, Diagonal 645, 08028, Barcelona, Spain. Tel.: +34 934034621; fax: +34 934034629.

E-mail addresses: [abosch@ub.edu](mailto:abosch@ub.edu) (A. Bosch), [rpinto@ub.edu](mailto:rpinto@ub.edu) (R.M. Pintó).

In low-moderate endemicity areas, hepatitis A infection mainly develops as outbreaks among the adolescent and adult populations, as some sporadic cases and to a much lesser extent as asymptomatic cases in children. Virus introduction from endemic areas is mainly done through consumption of imported foods and traveling. In recent years, several outbreaks related with consumption of imported contaminated food have been reported in Europe.<sup>3–6</sup> Several outbreaks related to travels have also been reported.<sup>7,8</sup> Additionally, and particularly in the case of Catalonia, the high immigration flows from North Africa, South America and other areas of high endemicity might represent the introduction of new viral strains. A high risk group for hepatitis A infection is men having sex with men (MSM) and several outbreaks affecting the MSM group have been recently reported in different countries across Europe.<sup>9,10</sup>

Comparative studies of HAV strains have suggested that sequence relatedness can be correlated with the geographical origin of the virus.<sup>11</sup> Nucleotide sequences may be used as molecular

markers for the elucidation of origins and modes of transmission of the virus. Different genomic regions have been used to differentiate HAV genotypes.<sup>12</sup> However, partial genomic sequences will never achieve the reliability of the complete genome. This is the rationale of the choice of long genomic regions covering at least the entire VP1 including its 2A junction<sup>13</sup> (European HAV Network) for a more broad molecular typing of HAV. Using this latter region, HAV strains are classified into six genotypes: I, II and III of human origin and IV, V and VI of simian origin. Genotypes I, II and III are further subdivided into subgenotypes, being their nucleotide distance cut-off of 7.5% and 5.1% in the VP1X2A<sup>11</sup> and complete VP1 regions,<sup>13</sup> respectively.

## 2. Objective

The molecular characterization of strains circulating in Catalonia in the period 2005–2009 and the study of the effects of vaccination on the incidence of sporadic and outbreak-associated cases.

## 3. Study design

### 3.1. Serum samples

Serum specimens ( $n = 157$ ) were collected from anti-HAV IgM-positive patients in Catalonia from April 2005 to July 2009. Samples were from both sporadic ( $n = 54$ ) and outbreak ( $n = 103$ ) related cases. Epidemiological data including age, sex, vaccination status, suspected source of infection, recent travels, mode of transmission (person to person, sexual contact, intravenous drug administration) and sexual orientation were recorded.

### 3.2. RNA extraction

RNA was extracted from 150  $\mu$ l of serum samples with the Nucleospin RNA virus kit (Macherey Nagel).

### 3.3. Detection and typing

HAV RNA was amplified by RT-PCR. Two independent two-step-RT-PCR assays were conducted: one corresponding to the N-terminal fragment of the VP1 coding region and another to the C-terminal fragment. Altogether both fragments included the VP3/VP1 junction, the entire VP1 and the VP1/2A junction. The previously described primer pairs NH2-VP1 and COOH-VP1<sup>6</sup> were used in both reactions, respectively. The Expand Reverse Transcriptase and the Expand HiFi PCR System enzyme kits (Roche) were used.

### 3.4. Sequencing

DNA was purified using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche) and sequenced using the ABI Prism<sup>®</sup> Big Dye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems) and the ABI Prism 3700 automatic sequencer (Applied Biosystems). The reverse strand was sequenced and all mutations confirmed in the forward strand.

### 3.5. Phylogenetic analysis

Whenever possible, sequences of both amplicon fragments (1057 bp) were used for the phylogenetic analysis. Otherwise, sequences of the amplicon corresponding to the C-terminal part of the VP1 coding region (521 bp) were used.

Nucleotide sequences were compared with those deposited in GenBank and EMBL using the BLAST N and CLUSTAL W softwares. Boot-Strap phylogenetic trees were constructed using the

**Table 1**

Number of declared hepatitis A cases during the period April 2005–July 2009. The annual attack rate per 100,000 inhabitants is shown.

	Total cases	Actual annual attack rate	Annual attack rate taking into consideration only sporadic cases
2005 <sup>a</sup>	130	3.2 <sup>b</sup>	1.4
2006	282	3.9	2.6
2007	225	3.3	1.9
2008	255	3.6	2.0
2009 <sup>a</sup>	229	6.5 <sup>b</sup>	0.5
Total	1.121		

<sup>a</sup> The epidemiological study started April 2005 and ended July 2009, thus the number of cases shown in 2005 corresponds to those occurring during the period April–December 2005 and those shown in 2009 correspond to the period January–July 2009.

<sup>b</sup> Attack rate corresponding to the April–December 2005 and January–July 2009 periods, respectively.

MEGA software package, version 4.0.2 with the following settings: neighbor-joining trees using the kimura 2-parameter model and a 1000 pseudoreplics bootstrap resampling. Sequences have been deposited in GenBank with accession numbers HQ401214 to HQ401267.

## 4. Results

### 4.1. Study population

Analyzed samples ( $n = 157$ ) represented 14% of total declared cases (Table 1). Fifty-four samples (34.4%) were from sporadic cases and 103 (65.6%) from outbreaks. This represent a certain bias towards the analysis of outbreaks since sporadic cases accounted for 45.7% of total hepatitis cases while outbreak-associated cases accounted for 54.3%. As can be observed in Table 1 the total annual attack rate per 100,000 inhabitants clearly increased in 2009 due to a huge outbreak. However the attack rate per 100,000 inhabitants not taking into consideration the outbreak-associated cases remained low along the studied period.

Among sporadic cases, 52% of patients were male and 48% female and the average age was 24.8 years (21 cases in the 0–12 years group; 0 cases in the 12–21 years group corresponding to the vaccinated group; 33 cases in the >21 years group). Travel information could be obtained for 23 out of 54 sporadic cases (42.6%) and of these 14 (61%) were confirmed to be travel-related. Travel-related cases corresponded to local people visiting endemic countries or immigrant people visiting their countries of birth. The most visited country was Morocco followed by Egypt and, to a lesser extent, Peru and India. The origin of the remaining 31 sporadic cases (57.4%) could not be traced.

Seven outbreaks affecting 225 patients were studied and of these 103 samples were analyzed (Table 2). The total number of outbreaks of the period was of 135 and the total number of patients was 609.

### 4.2. Phylogenetic analysis

HAV-typing was achieved in 129 out of 157 analyzed samples. Most of the non-typable samples corresponded to sera obtained long after the onset of symptoms. Forty-eight different strains were distinguished among these 129 isolates. Twenty-three strains (102 isolates) belonged to subgenotype IA, 19 strains belonged to subgenotype IB (21 isolates) and 1 strain belonged to subgenotype IIIA (1 isolate). The remaining 5 strains (5 isolates) belonged to an undetermined subgenotype equidistant from IA and IB.

**Table 2**  
Characteristics of outbreaks occurred in Catalonia 2005–2009.

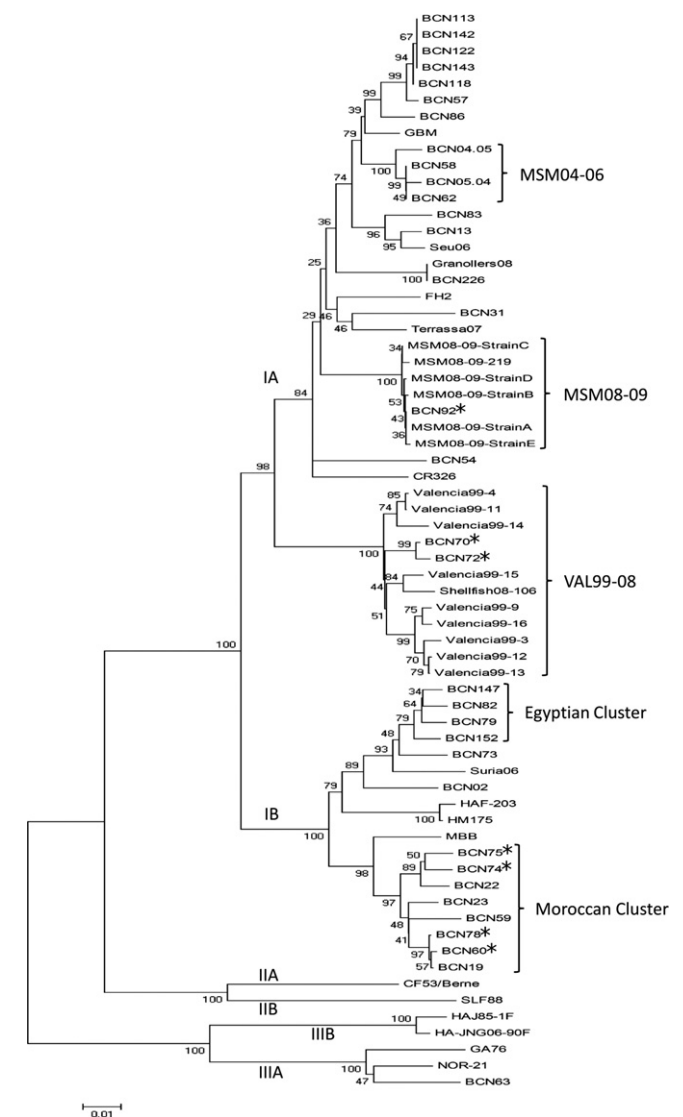
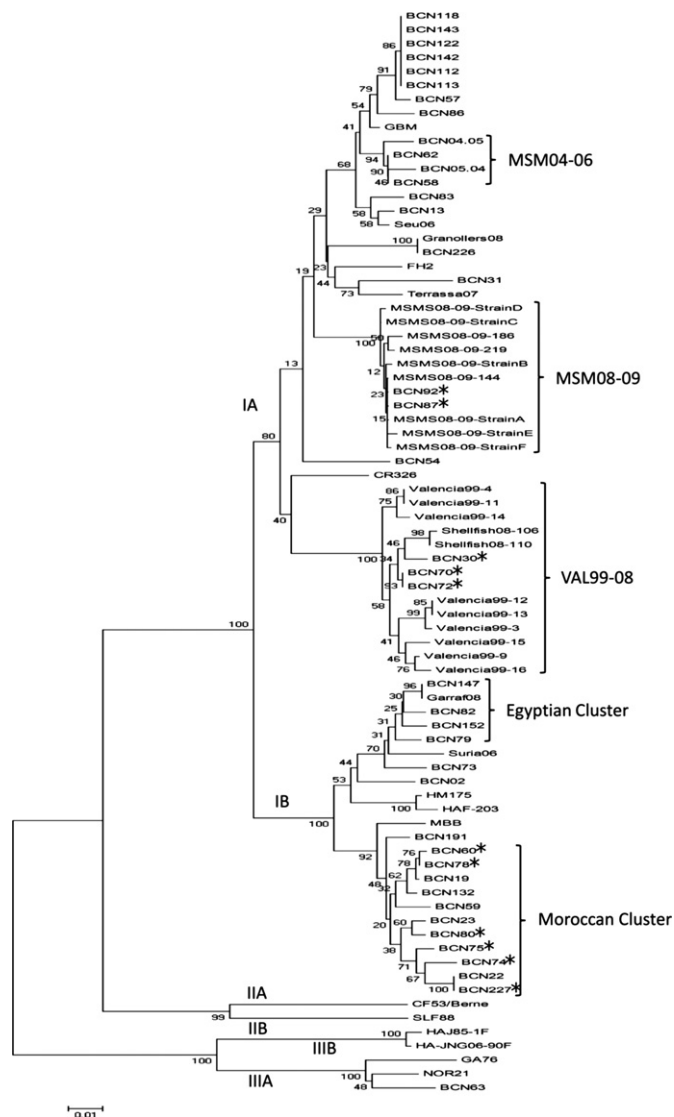
Date	Setting	Index case	Average age (gender) <sup>a</sup>	Source of infection
May06	Family	Adopted Ethiopian child	36.0 m (2M) 33.0 y (1F)	Immigration
Jun06	Nursery	Boy returning from Colombia	2.3 y (5M, 3F) 29.6 y (5M, 7F)	Immigration
May07	Family	Husband of a couple	Unknown (1M, 1F)	Unknown
Jul08	Nursery	Father of a child	2.5 y (1M, 1F) 37.7 y (4M, 3F)	Unknown
Oct08	General	Unknown	29.3 y (1M, 1F)	Imported clams
Sep08–Mar09	MSM	Unknown	33.0 y (185M)	Risky sexual practices
Oct08	School	Boy returning from Egypt	6.0 y (3M, 1F)	Travel-related

In outbreaks declared in nurseries or schools, as well as that affecting the MSM community, vaccination to contacts was implemented as a measure to prevent spread of the infection. The foodborne outbreak, that in Catalonia affected very few people but that was responsible for over 100 cases in the rest of Spain, caused the immobilization of around 1000 tons of shellfish and the ban of all Peruvian shellfish imports in the European Union (14).

<sup>a</sup> Average age is expressed in years (y) or months (m). Children and adults data are shown separately. The number of males (M) and females (F) is depicted in brackets.

Phylogenetic trees of sequences from the C-terminal fragment of VP1 (Fig. 1) or the complete VP1 gene (Fig. 2) were generated. Sequences from samples isolated off the period under study were also included to see a broader overview.

Among subgenotype IA strains two clusters were detected in association with the MSM group. The MSM04-06 cluster contained strains from MSM patients isolated during the period 2004–2006 with one strain previously isolated in 2004 (BCN05-04)



**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on the C-terminal fragment of VP1 protein. Neighbor-joining, Kimura 2-parameter, bootstrap 1000 replicates. Those strains labeled with an asterisk were not epidemiologically confirmed regarding its origin within the cluster.

**Fig. 2.** Phylogenetic tree based on the complete VP1 protein sequence. Neighbor-joining, Kimura 2-parameter, bootstrap 1000 replicates. Those strains labeled with an asterisk were not epidemiologically confirmed regarding its origin within the cluster.

**Table 3**

Genetic distances (percent of homology) between prototype strains of subgenotypes IA and IB and the strains of candidate subgenotype IC.

Strains	CR326 (IA)	GBM (IA)	HM175 (IB)	MBB (IB)	30 (IC)	70/72 (IC)	106 (IC)	110 (IC)
CR326 (IA)		98.2 96.3 95.6	92.3 91.4 90.6	93.4 91.4 90.3	93.4 94.4 –	94.6 95.2 93.5	92.8 94.0 93.3	92.8 94.2 –
GBM (IA)	100 99.4 98.6		91.7 91.4 90.8	94.0 91.7 91.6	94.6 93.8 –	94.6 94.4 93.3	92.8 93.5 93.1	93.4 93.7 –
HM175 (IB)	98.2 98.8 99.1	98.2 99.4 98.9		96.4 95.4 94.1	91.7 91.5 –	92.3 91.4 91.0	91.7 91.4 90.8	92.3 91.5 –
MBB (IB)	98.2 98.8 98.9	98.2 99.4 98.6	100 100 99.7		94.0 91.0 –	94.6 91.7 90.8	92.8 91.0 90.4	93.4 91.2 –
30 (IC)	98.2 98.8 –	98.2 99.4 –	100 100 –	100 100 –		99.4 98.6 –	97.6 98.5 –	98.2 98.6 –
70/72 (IC)	98.2 98.8 99.1	98.2 99.4 98.9	100 100 100	100 100 99.7	100 100 –		98.2 98.6 97.6	98.8 98.8 –
106 (IC)	98.2 98.8 99.1	98.2 99.4 98.9	100 100 100	100 100 99.7	100 100 –	100 100 100		99.4 99.8 –
110 (IC)	98.2 98.8 –	98.2 99.4 –	100 100 –	100 100 –	100 100 –	100 100 –	100 100 –	

Figures at the top right indicate results of pairwise comparison of the nucleotide sequences and figures at the bottom left indicate results of pairwise comparison of the deduced amino acid sequences. First row corresponds to comparisons made with the VP1X2A region (168 nt). Second row corresponds to comparisons made with the carboxi-terminal VP1 region (521 nt). Third row, when available, corresponds to comparisons made with the VP3XVP1X2A region (1057 nt). Additional information: maximum homology of the whole capsid region (2457 nt) of strains belonging to the proposed IC subgenotype (isolated in a previous period to that of the present study) with the herein included prototype IA and IB strains is of 93%, below the 95% and 94% homology observed among IA strains or IB strains, respectively.

04 with 1 single isolate) and two strains in the present period of study, one in 2005 (BCN04-05 with 1 single isolate) and another in 2006 (2 identical isolates BCN52, BCN68). However, a more significant number of strains were isolated during the MSM-outbreak 2008–2009 (MSM08-09). Nine different strains (with an average of 99% homology among them) were isolated in this outbreak. Additionally, another strain, isolated before the beginning of the outbreak in 2 samples, belonged to this same cluster. The strain was isolated from male patients although information regarding their sexual behavior was not available (BCN87 and BCN92; labeled with an asterisk in the trees), and thus although phylogenetically-related their epidemiological relationship remains unclear. Simultaneously to the MSM08-09 outbreak, 2 strains also belonging to subgenotype IA were detected in several sporadic cases. No epidemiological information could be obtained for these samples, although the phylogenetic analysis revealed that these cases were caused by 2 strains which did not belong to the MSM08-09 cluster.

Among subgenotype IB strains, two clusters of closely related strains could be clearly differentiated. The so-called Egyptian cluster related with travels to Egypt and including sporadic and outbreak cases. The strain isolated from the outbreak May-2006 (Suria06) was closely related with this Egyptian cluster and in fact the origin was Ethiopia. The so-called Moroccan cluster consisted of strains detected in sporadic cases related with travels to this country. This cluster also included strains from sporadic cases not related with recent travels (BCN60, BCN74, BCN75, BCN78, BCN80 and BCN227; labeled with an asterisk in the trees), whose close relationship with the aforementioned Moroccan strains, suggested a common geographical origin.

Apart from subgenotype IA and IB strains, one subgenotype IIIA strain was detected in one sample corresponding to a child of Roman origin.

#### 4.3. A new subgenotype I (IC) endemic in Peru is circulating in Spain

Two strains were isolated from patients who had consumed coquina clams imported frozen from Peru (Shellfish08-106, Shellfish08-110). These strains form a closely related cluster with other strains isolated during another shellfish-borne outbreak in 1999 (Valencia strains), being the source of infection the same type of coquinas imported from Peru. The relatedness of these strains in spite of the time lapsed between their isolations indicates that this cluster is highly endemic in Peru. Another three strains (BCN30, BCN70 and BCN72) isolated before the foodborne outbreak of 2008 belonged to the same cluster and probably represent strains circulating in our area since the first importation from Peru in 1999. The strains forming this cluster belong to an undetermined subgenotype midway from IA and IB following the phylogenetic information (Figs. 1 and 2). The maximum nucleotide homology of this cluster with reference strains belonging to subgenotype IA (CR326 and GBM, GenBank accession numbers M10033 and X75215, respectively) or IB (HM175 and MBB, GenBank accession numbers M14707 and M20273, respectively) is of 94.6% with both subgenotypes in the VP1X2A region and 93.5% (IA) and 91.0% (IB) in the VP3XVP1X2A region (Table 3). Given these values, and the independent branch in the phylogenetic tree of the VP3XVP1X2A region (Fig. 2), it is not possible to ascertain to which subgenotype these samples belong. Consequently a new subgenotype, IC, is proposed.



## 5. Discussion

Molecular characterization of HAV strains isolated from sporadic and outbreak related cases in Catalonia during the period 2005–2009 was undertaken. Around 17% of the outbreak-related cases (103 out of 609) and 11% of the sporadic cases (54 out of 512) were analyzed. Overall 11.5% of the circulating isolates (129 isolates) were molecularly characterized.

Sixteen different strains were detected in the outbreaks, 2 in a shellfishborne outbreak, 9 in the MSM08-09 outbreak and 1 in each of the remaining outbreaks. While isolation of different strains in shellfishborne outbreaks may be expected,<sup>5,6</sup> the isolation of so many strains in a MSM outbreak whose origin is likely to be from a single individual is less expected. Nevertheless it may be explained bearing in mind the quasispecies distribution of HAV<sup>14</sup> and the selective pressure imposed by a partial immune response in vaccinated HIV+ patients.<sup>15</sup> Thirty-one different strains were detected from 54 sporadic cases. Three strains were detected in both sporadic and outbreaks cases. In total 48 different strains were isolated. Since only 11.5% of the circulating strains were molecularly characterized an actual higher diversity is expected to occur. Circulation of mixtures of strains is very common in non-endemic areas,<sup>13,16</sup> while circulation of very few or even single strains is the rule in endemic areas.<sup>11,15,17–20</sup>

Four out of the seven analyzed outbreaks were caused by travel-imported strains. Importation of HAV strains has also been very recently described in Germany.<sup>7</sup> Most travel-related strains belong to subgenotype IB and originated in Africa, with the exception of one subgenotype IA, whose origin was Colombia. On the contrary, autochthonous strains belong to subgenotypes IA, IB and IIIA. No subgenotype IIA strains were detected in contrast to the recently described isolation in neighboring France.<sup>21</sup>

The critical role of shellfish global trade in the introduction of HAV in Spain has very recently been addressed.<sup>22</sup> The shellfishborne strains could not be clearly classified as subgenotype IA or IB and clustered together with previously isolated ones also imported through shellfish from Peru.<sup>5,6</sup> This cluster was previously identified as belonging to subgenotype IB,<sup>6</sup> yet a more exhaustive analysis suggests the occurrence of a third subgenotype I, i.e. IC, probably derived, by the quasispecies dynamics, from subgenotype IA, the most common in South America.<sup>13</sup> At this moment this candidate new subgenotype IC is already circulating both in Peru and Spain.

While massive vaccination campaigns are compulsory implemented in Catalonia, at the age of 12 since 1999, and most inhabitants older than 50 were naturally immunized in their childhood, most of the age group 24–50 is naïve to the virus. Thus vaccination of MSM individuals and travelers to endemic countries among this group must be recommended. However, hepatitis outbreaks due to the consumption of contaminated food are harder to prevent without adoption of regulatory measures of virus detection in food or vaccination of this age group.

## Funding

BIO2008-01312 from Ministry of Science and Innovation, Spain; 2009 266 SGR 24 and Xarxa de Referència de Biotecnologia de Catalunya 267 from Generalitat de Catalunya, Catalunya, Sapin.

## Conflicts of interest

None.

## Competing interests

None.

## Ethical approval

Not required.

## Acknowledgments

This work was supported in part by grant BIO2008-01312 (Ministry of Science and Innovation, Spain; <http://web.micinn.es/>), 2009 SGR 24 and Xarxa de Referència de Biotecnologia de Catalunya (Generalitat de Catalunya; [www.gencat.cat/agaur](http://www.gencat.cat/agaur)).

The Enteric Virus Laboratory participates in the European Network on hepatitis A.

## References

- Dominguez A, Salleras L, Carmona G, Batalla J. Effectiveness of a mass hepatitis A vaccination program in preadolescents. *Vaccine* 2003;**21**:698–701.
- Dominguez A, Oviedo M, Carmona G, Batalla J, Bruguera M, Salleras L, et al. Impact and effectiveness of a mass hepatitis A vaccination programme of preadolescents seven years after introduction. *Vaccine* 2008;**26**:1737–41.
- Pettrignani M, Harms M, Verhoef L, van HR, Swaan C, van SJ, et al. Update: a food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands related to semi-dried tomatoes in oil January–February 2010. *Euro Surveill* 2010;15.
- Pettrignani M, Verhoef L, van HR, Swaan C, van SJ, Boxman I, et al. A possible foodborne outbreak of hepatitis A in the Netherlands January–February 2010. *Euro Surveill* 2010;15.
- Pinto RM, Costafreda MI, Bosch A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl Environ Microbiol* 2009;**75**:7350–5.
- Sanchez G, Pinto RM, Vanaclocha H, Bosch A. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J Clin Microbiol* 2002;**40**:4148–55.
- Faber MS, Stark K, Behnke SC, Schreiber E, Frank C. Epidemiology of hepatitis A virus infections Germany, 2007–2008. *Emerg Infect Dis* 2009;**15**:1760–8.
- Frank C, Walter J, Muehlen M, Jansen A, van Treec U, Hauri AM, et al. Major outbreak of hepatitis A associated with orange juice among tourists Egypt, 2004. *Emerg Infect Dis* 2007;**13**:156–8.
- Stene-Johansen K, Tjon G, Schreiber E, Bremer V, Bruisten S, Ngui SL, et al. Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *J Med Virol* 2007;**79**:356–65.
- Tortajada C, de Olalla PG, Pinto RM, Bosch A, Cayla J. Outbreak of hepatitis A among men who have sex with men in Barcelona, Spain September 2008–March 2009. *Euro Surveill* 2009;14.
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992;**73**:1365–77.
- Nainan OV, Xia GL, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* 2006;**19**:63–79.
- Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercoff R, Casane D, Colina R, et al. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol* 2002;**76**:9516–25.
- Sanchez G, Bosch A, Gomez-Mariano G, Domingo E, Pinto RM. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 2003;**315**:34–42.
- Perez-Sautu U, Costafreda MI, Cayla J, Tortajada C, Lite J, Bosch A, et al. Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence. *Emerg Infect Dis* 2011;**17**:734–8.
- Costa-Mattioli M, Napoli AD, Ferre V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 2003;**84**:3191–201.
- Cristina J, Bartenschlager R. Hepatitis viruses in the XXI century. *Virus Res* 2007;**127**:129–30.
- Gabrieli R, Sanchez G, Macaluso A, Cenko F, Bino S, Palombi L, et al. Hepatitis in Albanian children: molecular analysis of hepatitis A virus isolates. *J Med Virol* 2004;**72**:533–7.
- Tallo T, Norder H, Tefanova V, Ott K, Ustina V, Prukk T, et al. Sequential changes in hepatitis A virus genotype distribution in Estonia during 1994 to 2001. *J Med Virol* 2003;**70**:187–93.
- Taylor MB. Molecular epidemiology of South African strains of hepatitis A virus: 1982–1996. *J Med Virol* 1997;**51**:273–9.
- Desbois D, Couturier E, Mackiewicz V, Graube A, Letort MJ, Dussaix E, et al. Epidemiology and genetic characterisation of Hepatitis A virus genotype IIA. *J Clin Microbiol* 2010. JCM.
- Polo D, Vilarino ML, Manso CF, Romalde JL. Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses. *Emerg Infect Dis* 2010;**16**:1036–8.





Pintó, R.M., D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, F.J., Costafreda, M.I., Ribes, E., Guix, S. & Bosch, A. 2012. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiology*, 7: 1-15.



# Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines

Rosa M Pintó<sup>\*1,2,3</sup>, Lucía D'Andrea<sup>1,2,3</sup>, Francisco J Pérez-Rodríguez<sup>1,2,3</sup>, M Isabel Costafreda<sup>1,2,3</sup>, Enric Ribes<sup>1,4</sup>, Susana Guix<sup>1,2,3</sup> & Albert Bosch<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Enteric Virus Laboratory, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Institute of Nutrition & Food Safety, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department of Microbiology, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Department of Cellular Biology, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

\*Author for correspondence: Department of Microbiology, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain ■ Tel.: +34 934 034 621 ■ Fax: +34 934 034 629 ■ [rpinto@ub.edu](mailto:rpinto@ub.edu)

Hepatitis A is the most common infection of the liver worldwide and is fecal-orally transmitted. Its incidence tends to decrease with improvements in hygiene conditions but at the same time its severity increases. Hepatitis A virus is the causative agent of acute hepatitis in humans and belongs to the *Hepatovirus* genus in the *Picomaviridae* family, and it has very unique characteristics. This article reviews some molecular and biological properties that allow the virus to live in a very quiescent way and to build an extremely stable capsid that is able to persist in and out of the body. Additionally, the relationship between the genomic composition and the structural and antigenic properties of the capsid is discussed, and the potential emergence of antigenic variants is evaluated from an evolutionary perspective.

## Hepatitis A infection

### Differential definition

Approximately 400 years BCE, Hippocrates described an illness characterized by episodes of jaundice that could probably correspond to a viral hepatitis. In ancient China, jaundice illnesses were well recognized as well. However, it is not until the middle of the 20th century that the expression 'infectious hepatitis' was defined and associated with a kind of infectious jaundice that could occur in epidemics. Nevertheless, to be historically accurate, it should be mentioned that the first accurate reference to epidemic jaundice could be that recorded by Cleghorn in *Epidemic Diseases of Minorca 1744 to 1749* [1]. In the 1940s, two separate entities were identified – 'infectious' and 'serum' hepatitis – and since 1965, the major etiological agents (hepatitis A, B, C, D and E viruses) of viral hepatitis have all been identified. While all hepatitis viruses are infectious, the previously used 'infectious' and 'serum' terms refer to the mode of transmission. The 'infectious' type corresponds to hepatitis transmitted through the fecal–oral route, or enteric hepatitis, and includes hepatitis A and E, while the 'serum' hepatitis corresponds to those that are parenterally transmitted, and include hepatitis B, C and D (see Box 1).

### Clinical features

Hepatitis A is an acute infection of the liver produced by the hepatitis A virus (HAV). In

children under 5 years of age the infection mostly develops asymptotically or subclinically, while in older children and in adults, the infection usually presents with symptoms [2]. In the latter case, the clinical course of hepatitis A is indistinguishable from that of other types of acute viral hepatitis. The clinical case definition for hepatitis A is an acute illness with a moderate onset of symptoms including fever, malaise, anorexia, nausea, abdominal discomfort, dark urine and jaundice, with elevated serum bilirubin and aminotransferases levels later on [3]. The incubation period of hepatitis A ranges from 15 to 50 days and clinical illness usually does not last longer than 2 months, although 1.5–15% of patients have prolonged or relapsing signs and symptoms for up to 6 months [3–5]. In fact, with the advent of new highly sensitive techniques, a high and long-lasting viremia has been detected even in normal clinical courses [6], with the peak (up to  $10^7$  genome copies/ml of sera) occurring from just before the beginning to 2 weeks after, the onset of symptoms, and the viremia lasts up to an average of 6 weeks after the start of symptoms [6,7]. By contrast, fecal shedding of the virus reaches its maximum just before the onset of symptoms, at which point the individual is most infectious (see Figure 1 for evolution of viral titers and clinical signs of the disease). There is no evidence of chronicity of the infection. However, the infection may

### Keywords

- codon usage ■ fitness
- hepatitis A virus
- quasispecies
- vaccine-escaping antigenic variant

**Box 1. Hepatitis viruses.**

- Hepatitis A virus (HAV) is the causative agent of hepatitis A infection. It belongs to the *Picornaviridae* family (30-nm naked particles containing a single-stranded positive RNA genome of approximately 7 kb coding for a single open reading frame [ORF]) and is transmitted through the fecal–oral route
- HBV is the causative agent of hepatitis B infection. It belongs to the *Hepadnaviridae* family (42–47-nm enveloped particles containing a partially double-stranded circular DNA genome of approximately 3 kb coding for four ORFs) and is parenterally transmitted
- HCV is the causative agent of hepatitis C infection. It belongs to the *Flaviviridae* family (40–50-nm enveloped particles containing a single-stranded positive RNA genome of approximately 10 kb coding for a single ORF) and is parenterally transmitted
- HDV is the causative agent of hepatitis D infection. It belongs to the *Deltaviridae* family (30-nm enveloped particles containing a single-stranded covalently closed RNA genome of approximately 1.7 kb, which needs a helper virus to replicate, usually HBV) and is parenterally transmitted
- HEV is the causative agent of hepatitis E infection. It belongs to the *Hepeviridae* family (30–34-nm naked particles containing a single-stranded positive RNA genome of approximately 7 kb coding for three ORFs) and is transmitted through the fecal–oral route
- HFV is the causative agent of a putative type F hepatitis infection. It belongs to the *Flaviviridae* family (40–50-nm enveloped particles containing a single-stranded positive RNA genome of approximately 10 kb coding for a single ORF) and is parentally transmitted. Its existence requires further confirmation
- GB viruses belong to the *Flaviviridae* family (40–50-nm enveloped particles containing a single-stranded positive RNA genome of approximately 10 kb coding for a single ORF) and are parenterally transmitted. Their role in human hepatitis is still unclear
- Transfusion-transmitted viruses belong to the *Circoviridae* family (30–50-nm enveloped particles containing a single-stranded negative DNA genome of approximately 3.8 kb) and are, mainly, parenterally transmitted. Their role in human hepatitis is still unclear

occasionally proceed to a fulminant hepatitis, mainly among patients with underlying chronic liver diseases [2,3,8].

#### **Hepatitis A epidemiology: lower prevalence correlates with increased disease severity**

Although hepatitis A is a clinically moderate illness, it still remains the most important acute hepatitis in regard to the number of cases worldwide.

The distribution patterns of hepatitis A in different geographical areas of the world are closely related to their socioeconomic development [2,3]. Hepatitis A infection is highly endemic in developing regions while it is much less frequent in developed regions. This epidemiological pattern has important implications on the average age of exposure and hence on the severity of clinical disease. Since hepatitis A infection induces life-long immunity, severe infections among adults are rare in highly endemic regions where most children are infected early in life. By contrast, in low-endemic areas, the disease occurs mostly in adulthood, mainly as a consequence of traveling to endemic regions, having risky sexual practices or consuming contaminated water or food [3] and hence the likelihood of developing severe symptomatic illness is high.

An epidemiological shift, from intermediate to low prevalence, has been noticed in recent decades in many countries, particularly in southern Europe, including Spain, Italy and Greece [9–11]. Consequently, although the first well-documented hepatitis epidemic occurred in the

Mediterranean island of Minorca 250 years ago, the Mediterranean basin as a whole should no longer be considered as an endemic area [2,3,12].

Additionally, some other countries from eastern Europe [13,14] have also described significant declines in the incidence of hepatitis A. Likewise, in several Asian and Latin American countries, a shift from highly to moderately endemic has been described as well [15–17].

#### **Hepatitis A prevention: highly effective vaccines**

Inactivated HAV vaccines have been available since the early 1990s and provide long-lasting immunity against hepatitis A infection. The immunity is largely related to the induction of high titers of specific antibodies. Thanks to the existence of a single serotype of HAV, these vaccines are highly efficacious [10,18]. They consist of viruses grown in cell culture, purified, inactivated with formalin and adsorbed into an aluminum hydroxide adjuvant, making their financial cost relatively high. This is the reason why many discrepancies already exist regarding their universal use in massive vaccination campaigns. However, the effectiveness of pediatric mass vaccination programs in reducing the incidence of hepatitis A has been evidenced in several countries [11,19–22]. As a general rule, in low- and inter-mediate endemic regions, where, paradoxically, the severity of the disease is high, vaccination against hepatitis A should be recommended in at least high-risk groups, including travelers to high endemic areas, MSM, drug users and patients receiving blood products. In

addition, the inclusion of hepatitis A vaccines in mass vaccination programs in those countries receiving high numbers of immigrants from endemic countries is also recommended.

Although several attenuated vaccine candidates have also been attempted, due to the successful use of inactivated vaccines, their development has not progressed.

### Hepatitis A virus

#### Life cycle: adaptation at the edge of extinction

##### Cycle in the host

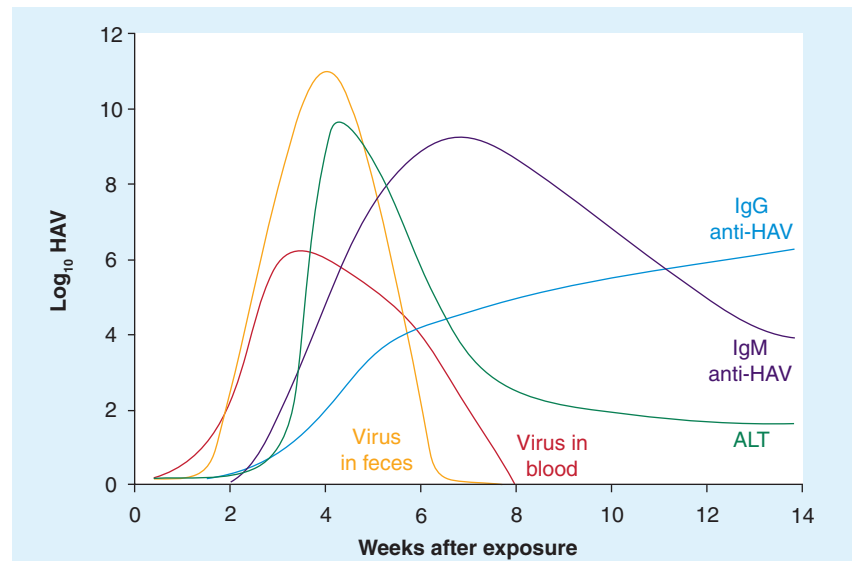
The only available animal models for HAV replication and disease induction are simians [23,24]. In experimental oral infections performed in monkeys, HAV antigen was detected both early and late after inoculation in cells from the stomach, the small and large intestines [25] and obviously in the liver, bile and stools [25,26], and led to the postulation of an 'enterohepatic cycle' model of replication [3]. This cycle involves an initial oral entry of viruses followed by their adsorption from the stomach/intestine into the bloodstream, to finally reach the liver. After replication in the liver, the virus is released through the biliary canaliculus into the intestine and out of the body in the feces or, alternatively, the enterohepatic cycle can be repeated again. However, the exact mechanism by which the virus enters the bloodstream is still not completely understood. Although a certain degree of intestinal primary replication does occur [27], virus release would probably be mostly into the intestinal lumen since it has been shown in *in vitro* infections of polarized human epithelial cell cultures that virus release is largely restricted to the apical membrane [28]. Transcytosis of the intestinal amplified virus inoculum through M cells, which surround the Peyer's patches in the distal ileum, could be one way to reach the blood vessels, as does happen with polioviruses [29]; however, it has never been demonstrated in HAV. A second model is based on reverse transcytosis of IgA-coated HAV particles through cells of the intestinal epithelium with missorted polymeric immunoglobulin receptor in the apical membrane [30]. This second model, although not proven in intestinal cells but in a kidney epithelium, is based on the fact that an important proportion of HAV particles in the intestine are IgA-coated and that the IgA-HAV complexes are infectious in hepatocytes [31]. Whatever may be the most significant way of crossing the intestinal epithelium, one should expect that viruses, which live at the edge of extinction, must explore

and use as many entry ways as possible, and thus both models should be considered compatible rather than excluding each other.

For the development of an infection cycle, HAV has to overcome the challenges posed by the acidic pH of the stomach and the action of intestinal proteases and detergents (particularly biliary salts) during the entry phase, the decoy factors during the viremic phase and, again, the action of proteases and detergents during the exit phase. The selective pressure of pH, proteases and biliary salts calls for the need to shape a highly cohesive and stable capsid. Additionally, HAV replication in polarized hepatocytes with different entry and exit membranes, and thus relying on the blood connection of the enterohepatic cycle to initiate infection of new cells, requires a capsid that, as much as possible, escapes the blood clearance mechanisms of the host. In such a sense, the HAV capsid has evolved to avoid its interaction with the glycoprotein A present in the erythrocyte membrane [32].

#### Cellular cycle

The main target cells for HAV replication are hepatocytes, although crypt cells of the intestine and Kupffer cells of the liver have also been



**Figure 1. Evolution of viral titers and clinical signs during hepatitis A infection.** In those cases of symptomatic infection, the onset of symptoms usually starts 2 weeks after exposure and clinical signs last over 5 weeks. Among clinical signs, increases in serum ALT activity (green) are remarkable. The immunological response includes anti-HAV IgM (purple) and IgG (blue) responses. While the IgM response is usually short-lived, the IgG response is usually life-long. Regarding the evolution of HAV viremia titers (red) develop from before the onset of symptoms to more than 3 weeks after the onset, reaching peaks of approximately  $10^6$  genome copies/ml of sera. In the same way, shedding of viruses in feces (orange) occurs from before the onset of symptoms to approximately 3 weeks after the onset, with peaks of approximately  $10^{11}$  genome copies/g of feces. ALT: Alanine aminotransferase; HAV: Hepatitis A virus.

proven positive for HAV antigen [25]. Two different cell entry mechanisms have been proposed for the initiation of the HAV cell cycle. On the one hand, the HAV cell receptor 1 (HAVCR1), which belongs to the T-cell immunoglobulin mucin family [33], has been shown to be a HAV receptor. On the other, the asialoglycoprotein receptor, which binds and internalizes IgA molecules, has also been proposed as a receptor for infectious IgA-coated HAV complexes [31]. Additionally, the IgA $\lambda$  chain is a specific ligand of HAVCR1, and binding of the IgA $\lambda$  chain of the IgA–HAV complex has a synergistic effect on the interaction of HAV with the receptor [34]. Thus, free HAV particles may use HAVCR1, while HAV particles in the form of IgA-coated complexes may use both HAVCR1 and the asialoglycoprotein receptor, showing once again the need for viruses to be as adaptable as possible.

The general scheme of the replicative cycle of HAV is very similar to that of the rest of picornaviruses [35]. After interaction with the receptor(s), the uncoating of the positive-sense RNA viral genome contained in the capsid takes place. This process is extremely slow in HAV, at least *in vitro* with cell-adapted strains, with described times of several hours compared with the most common 30-min period in most picornaviruses [36]. Once the RNA is in the cytoplasm, a cap-independent translation of the viral genome (see FIGURE 2 for the genomic organization) occurs through an internal ribosome entry site within the 5' noncoding region. The polyprotein is co- and post-translationally processed by the viral protease, and the newly generated RNA-dependent RNA polymerase, as well as several membrane-interacting proteins, assemble with the 3' end of the genomic RNA to start the synthesis of a negative-strand copy of the viral genome. The negative-strand copy of the genome is used as template for synthesis of multiple new copies of genomic positive-strand RNA, which in turn will be recycled for further RNA synthesis or translated into new proteins. After the assembly of the structural proteins into capsid particles, the positive-strand RNA molecules are packaged, and the newly synthesized virions are secreted across the apical membrane of the hepatocyte into the biliary canaliculus, from which they are passed into the bile and small intestine.

#### Immune response induced by the virus infection

IgM antibodies are usually detected by the onset of clinical symptoms and, later on, IgA and IgG are also synthesized [37,38]. The anti-HAV IgM

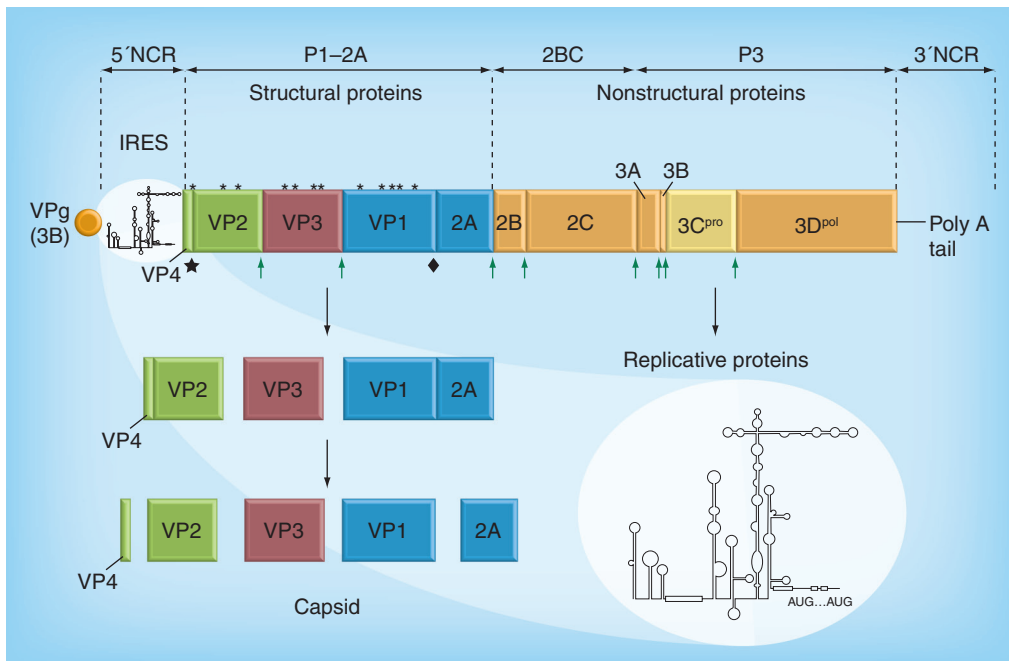
response is usually limited to the initial infection and is used as a marker of acute disease. IgA is also induced for a limited period of time and is present in serum and feces, but the role of the secretory immunity in protection against HAV infection appears to be very limited. By contrast, the IgG response is delayed compared with IgM and IgA responses but is long-lasting and confers resistance to reinfection. All of these antibodies are mostly directed against discontinuous epitopes of the immunodominant site of the HAV particle (see below).

HAV-specific, HLA-restricted cytotoxic T cells have also been identified within the liver during acute HAV infection and may play an essential role in viral clearance and the induction of liver damage [3].

HAV replicates quietly, but efficiently, within the liver for several weeks during the incubation period of the disease, in which there is almost no liver damage, and this has been suggested to be due to the ability of the virus to avoid the type-I IFN innate response. In fact, a limited type I IFN response within the liver has been very recently shown in experimentally HAV-infected chimpanzees [39]. Such a response may be the result of a low synthesis of dsRNA viral intermediate molecules necessary for the initiation of the IFN-induction cascade and/or very efficient mechanisms to disrupt the cascade once initiated. Regarding this latter point, it has been shown that, during a HAV infection of cultured cells, two virus nonstructural protein intermediates, 3ABC and 3CD, cleave the MAV protein, which is involved in the RIG-I receptor pathway, and the TRIF, which is involved in the TLR3 pathway, respectively [24,40]. What is really striking is that compared with HCV, which also disrupts the signaling pathway of type I IFN synthesis, HAV is much more efficient in doing so, suggesting the occurrence of additional mechanisms in HAV to escape from this antiviral cellular response [39]. Thus, HAV infections should be considered a distinctly unique archetype in virus–host interactions.

#### Unique molecular features of HAV: the key for a quiescent replication & an extremely stable phenotype

Several unique molecular characteristics of the HAV genome make it entirely distinguishable from other picornaviruses (see BOX 2), the first of which is the structure of the 5' noncoding region, which contains the internal ribosome entry site (IRES). The HAV IRES is unique among picornaviruses and constitutes the type



**Figure 2. Hepatitis A virus genomic organization and expression.** The hepatitis A virus genome is composed of an RNA molecule that can be directly translated (positive RNA genome) and which contains a single open reading frame encoding a polyprotein. Strategically located clusters of rare codons of the capsid-coding region (asterisks) have been proposed to play an essential role in capsid folding through the control of translation speed. The polyprotein is autoprocessed by the viral protease 3C<sup>pro</sup> (yellow box) at all cleavage sites (green arrows), with the exception of two cleavages made by proteases other than the viral 3C<sup>pro</sup>: a yet-to-be-identified cellular protease (diamond), which releases the 2A fragment from the capsid, and an unknown proteolytic activity (star), which participates in the last capsid maturation process. IRES: Internal ribosome entry site; NCR: Noncoding region.

III model [41,42], which shows a very low efficiency in directing translation [43] compared with other picornavirus IRESs.

Second, HAV possesses a complex internal stem-loop near the 5' end of the polymerase-coding sequence that functions as a *cis*-acting replication element, which is distinguishable from other picornaviral *cis*-acting replication

elements by its relatively large size and the length of its top loop [44].

Third, HAV encodes only protease, 3C, while other picornaviruses code for additional proteases such as the L protease in the genus *Aphthovirus*, or the 2A protease in the *Enterovirus* and *Rhinovirus* genera [45]. L and 2A proteases, when present, play a crucial role

### Box 2. Unique molecular characteristics of hepatitis A virus compared with the rest of the picornaviruses.

- Hepatitis A virus (HAV) has a type III internal ribosome entry site, which is highly inefficient at directing translation
- HAV has a *cis*-acting replication element in the 5' end of the polymerase-coding region, which is larger than other picornaviral *cis*-acting replication elements
- HAV encodes a single protease, 3C, which is not involved in the processing of the eIFG4 translation factor. In fact, HAV needs an intact eIFG4 factor for its own translation and consequently does not induce the protein cellular shut-off by this common method. Thus, HAV competes poorly with the cell for resources such as tRNAs
- HAV has significant codon usage and CpG biases
- The codon usage of HAV is not only highly biased but also highly deoptimized with respect to the cellular codon usage
- HAV has a great ability to inhibit the cellular IFN response
- HAV replicates in a quite quiescent mode
- The 2A protein of HAV is necessary during capsid morphogenesis, particularly for pentamer formation. The removal of 2A from the capsid is performed by a cellular protease(s)
- The capsid of HAV seems to be extremely smooth, and the absence of a pit or canyon region has been highlighted in cryo-electron microscopy images
- HAV's nucleotide diversity in the capsid-coding region is similar to that of other picornaviruses; however, the amino acid variability is much lower and HAV exists as a single serotype

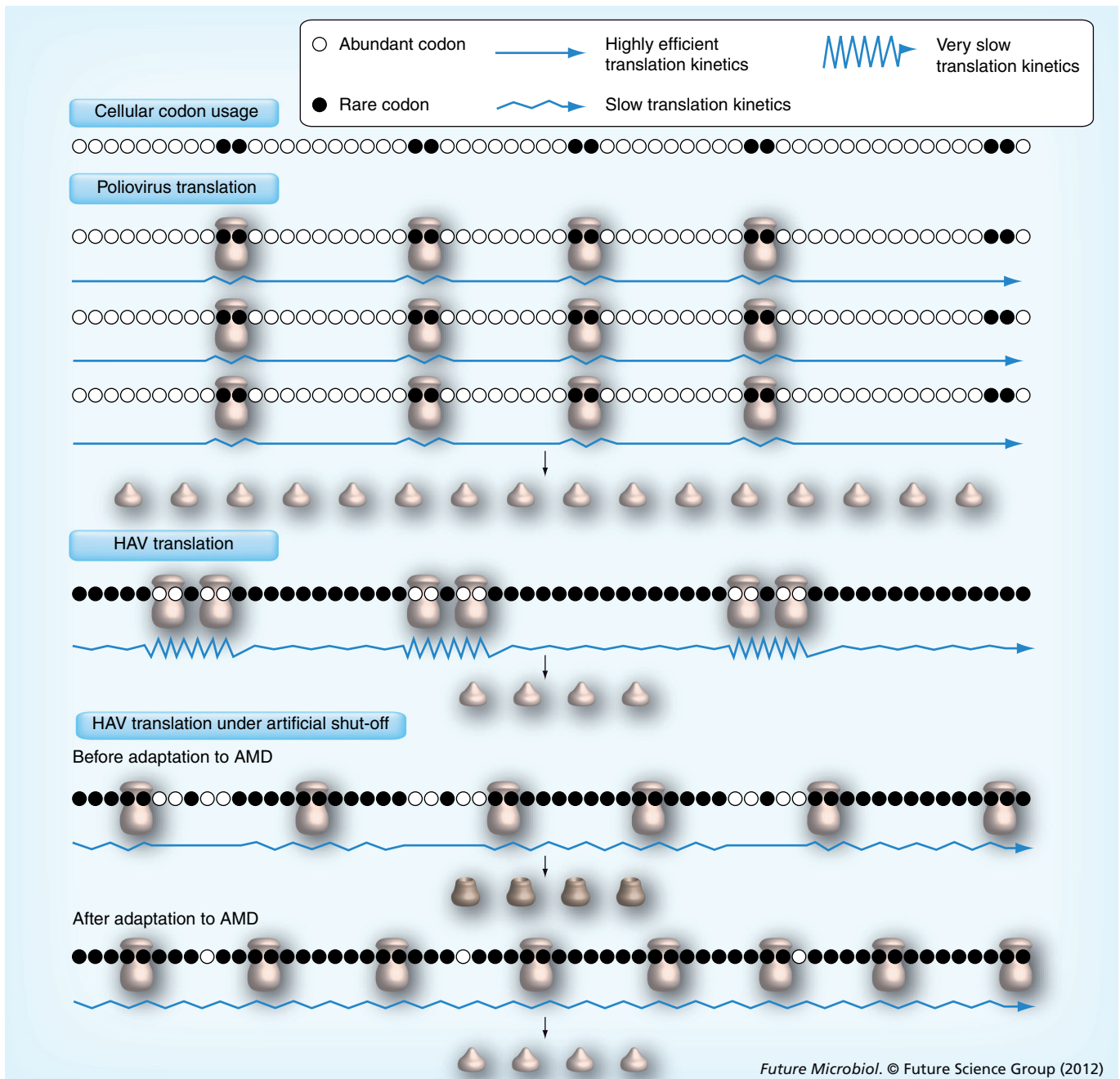


in the primary cleavages of the viral polyprotein, while in those genera lacking these proteases, such as *Hepatitis virus* and *Paraechovirus*, both primary and secondary cleavages are conducted by the 3C protease. But what is most important is that these additional proteases are involved in the cellular protein shut-off induction [45]. Since picornaviruses utilize a mechanism of translation that is cap-independent and IRES-dependent, the inhibition of nonessential, cap-dependent cellular translation could be advantageous to the virus. In doing so, the cellular translation machinery is utilized almost exclusively for the production of viral proteins [46]. An early event preceding the shut-off of host cell protein synthesis is the cleavage of the cellular translation initiation factor eIF4G, and evidence exists supporting the idea that the enzymes responsible for such a cleavage are 2A protease in enteroviruses and rhinoviruses, and L protease in aphthoviruses [46]. An immediate consequence of the lack of any of these proteolytic activities in HAV is its inability to induce cellular shut-off, which otherwise is directly related to its requirement for an intact uncleaved eIF4G factor for the formation of the initiation of the translation complex [47,48].

What has been described up to now indicates that HAV must inefficiently compete for cellular translational machinery and consequently it has evolved a unique translation strategy. This highlights the third difference between HAV and other picornavirus members: codon usage. The preference of one codon over another synonymous codon to specify an amino acid is termed 'codon usage bias'. HAV presents a higher codon usage bias compared with other members of its family, which is characterized by the adaptation to use abundant and rare codons [49]. But what is more surprising is that the HAV codon usage has evolved to be complementary to that of human cells, never adopting as abundant codons those abundant for the host cell, and even in many instances using the latter as rare codons. A consequence of this special codon bias is an increase in the number of rare codons used. Overall, this increment is the result of the addition to the cellular rare codons, also used as rare by the virus, of those most abundant cellular codons. The rationale is that the cognate tRNAs of the codons abundantly used by the cell are unavailable for the virus and thus these codons are used by the virus at low frequency. In summary, HAV has a naturally deoptimized codon usage. The role of rare codons in the control of translation

speed has been largely documented [50–52], in the sense that clusters of rare codons would induce a transient stop of the translational complex in order to seek a suitable tRNA present at a very low concentration among the pool of tRNAs. A function of these ribosome stallings has been suggested to be the assurance of the proper folding of the nascent protein [53–55]. Such a function has also been postulated for HAV, where highly conserved clusters of rare codons strategically located at the carboxy-ends of the structured elements of the capsid-coding region have been reported [49]. The critical role of HAV codon usage, and particularly of these clusters of rare codons of the capsid-coding region, has been shown in functional genomic studies during the process of adaptation of HAV to conditions of artificially induced cellular shut-off (replication in the presence of actinomycin D) [56]. An overall change in the codon usage of the capsid region was necessary to regain viral fitness, after an initial fitness loss, during the adaptation to actinomycin D, with a clear re-optimization with respect to the cellular codon usage, and particularly affecting the rare codons located at the aforementioned strategic positions of the capsid [56]. This mechanism of adaptation to the cellular shut-off proves translation kinetics – that is, the right combination of codons (common and rare) that allows a regulated ribosome traffic rate ensuring proper protein folding – as a driving selective force of the HAV codon usage at the capsid region (FIGURE 3). The accuracy of HAV capsid folding may contribute to the extremely resistant phenotype of HAV to high temperatures, acid pH and detergents [23,38], and to its high persistence in the environment [57,58] that consequently enables transmission by contaminated foods and drinking water [59–64]. In fact, those populations adapted to replicate in the presence of actinomycin D, which have re-optimized their codon usage, show an important decrease of resistance to all of these factors [COSTAFREDA MI *ET AL.*, MANUSCRIPT IN PREPARATION]. Additionally, this special codon usage may answer the intriguing question of why HAV has evolved to have a highly inefficient IRES, since a very efficient translation machinery recruitment to the IRES combined with many ribosome stalls at the beginning of the coding region would not be a very convenient arrangement, but rather a very ineffective process hijacking many ribosomes on a few RNA molecules.

The highly deoptimized codon usage of HAV has also been interpreted as a subtle strategy to avoid, as much as possible, competition for



Future Microbiol. © Future Science Group (2012)

**Figure 3. Fine-tuning translation kinetics selection in the capsid-coding region of hepatitis A virus.** Codon usage bias is the result of a sum of pressures including mutation bias and diverse selection forces. Among these selection forces, at least two are translation-related processes, one of which is translational selection or the adaptation of the codon usage to the tRNA pools for a highly efficient and accurate rate of translation. In the virus world, this implies the optimization of the virus codon usage to that of the host cell, as happens in poliovirus. The other translation-related process is fine-tuning translation kinetics selection, or the right combination of common and rare codons to regulate the ribosome traffic rate and thus to ensure proper protein folding. Ribosome stallings at rare codon positions allow sequential folding, and consequently the occurrence of clusters of strategically located rare codons is essential. The codon usage of HAV is highly biased and highly deoptimized with respect to that of the cellular host. Since HAV does not possess mechanisms to induce cellular shut-off, it may compete poorly for tRNAs; thus, it has adapted to use codons that are not highly used by the cell as abundant codons, and codons that are used as rare, but also those that are abundantly used by the cells, as rare codons. Additionally, rare codons of the capsid-coding region, but not those of other genome regions, such as the polymerase-coding region, are strategically located at the carboxy-borders of the predicted  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets. When cellular shut-off is artificially induced with AMD (with the associated changes in tRNA pools), HAV shows a fitness loss. HAV thereafter adapts to grow in the presence of AMD through an overall change of the codon usage of the capsid-coding region towards a re-optimization. Fitness variations correlate with changes of the capsid stability and antigenicity, which in turn may reflect modifications of capsid folding due to different kinetics of translation associated with changes in codon usage. AMD: Actinomycin D; HAV: Hepatitis A virus.

the cellular tRNAs in the absence of a precise mechanism of inducing shut-off of cellular protein synthesis [49] and, additionally, may also contribute to a slow genome replication since all the viral proteins are encoded in a single open reading frame and thus the expected low protein synthesis may also affect those proteins involved in RNA replication (see FIGURE 2). Thus, a low efficiency of viral replication will probably contribute to a low concentration of dsRNA intermediates. In fact, only 10% of HAV-infected liver cells were positive for dsRNA in experimentally infected chimpanzees [39], a rather low proportion compared with what is observed in HCV infection [65]. Additionally, as stated above, HAV has developed mechanisms to prevent or reduce cellular antiviral responses [40,66,67]. The delicate balance between the levels of dsRNA intermediates and some viral intermediate proteins (3ABC and 3CD; see above) might modulate the inhibition of the antiviral cell responses.

Other important differences exist between HAV and other picornaviruses at the morphogenetic/structural level. The role of both ends (amino-VP4 and carboxy-2A) of the capsid polyprotein in the virion assembly is still controversial [68], and while there is no agreement on the requirement of VP4 for the maturation of pentamers into capsids, a complete consensus exists on the necessity of 2A for pentamer formation [23]. The ulterior removal of 2A in the mature virion must be performed by a host cell protease [69,70], although the mature 2A protein has never been identified directly in infected cells. The x-ray crystallographic structure has not yet been solved, due to the low viral yields obtained by *in vitro* replication. However, 3D images of HAV produced by cryoelectron microscopy [CHENG H, UNPUBLISHED DATA] [23] have revealed important data, the most intriguing being the lack of a well-defined canyon around the fivefold axis of symmetry. The receptor-binding residues of many picornaviruses are located in the pit region [35,71]. However, whichever is the HAV receptor, the capsid region involved in receptor binding remains to be elucidated. By contrast, the capsid region interacting with the glycophorin A of human erythrocytes is indeed located around the putative pit area [32]. The capsid structure, however, is such that it will only tolerate this interaction in acidic conditions, being impaired at neutral biological conditions, enabling escape from erythrocyte attachment and thus constituting an advantage, as stated above.

### Quasispecies dynamics of evolution & virus fitness

Viral genetic variability results from the universal mechanisms of mutation, recombination and genome segment reassortment, all of which are replication-dependent. Since virus populations replicate at exceptionally high rates, they may be extremely variable. All this is particularly critical in RNA viruses, since they rely on error-prone polymerases lacking proofreading activity, which leads to complex mutant genome populations or quasispecies. Viral quasispecies are dynamic distributions of nonidentical but closely related viral genomes subjected to a continuous process of genetic variation, competition and selection, and which act as a unit of selection (reviewed in [72]).

RNA viruses have the capacity to quickly explore large regions of sequence space thanks to their high mutation rates, which are in the range of  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  substitutions per nucleotide copied [72]. However, their genome size and diverse selective constraints limit the diversity that is actually expressed [73].

### Genetic & antigenic diversity of the virus: structural & biological constraints limit the antigenic variability

HAV, as an RNA virus, occurs as a swarm of mutants or quasispecies [74]. The nucleotide diversity is similar to that of other picornaviruses [49], and allows its differentiation into several genotypes and subgenotypes. The *VP1X2A* junction region is still the genomic region most in use worldwide to study the genetic diversity of HAV [75]. Six genotypes, whose genetic distance in the *VP1X2A* region – a highly variable genomic region – is >15% nucleotide variation, have been defined [76]. Three out of these six genotypes (I, II and III) are of human origin, while the others (IV, V and VI) are of simian origin. Genotypes I, II and III contain subgenotypes defined by a nucleotide divergence of 7–7.5%. Genetic diversity of HAV is evidenced by the emergence of new subgenotypes [77]. Genotypic characterization may be highly relevant to tracing the origin of outbreaks.

Despite this nucleotide variability, the diversity is limited at the amino acid level and only a few natural antigenic variants have been isolated [63,78], suggesting the occurrence of severe structural and biological constraints of the capsid that would prevent the emergence of new serotypes. Consequently, a single serotype of HAV exists [38], which represents another striking difference from other picornaviruses.

Table 1. *In vitro* and naturally isolated variants of the main antigenic sites of hepatitis A virus.

Capsid epitopes	Substituted residues in mAb-resistant mutants <sup>†</sup>	Substituted residues in natural antigenic mutants <sup>‡</sup>
Immunodominant site/multiple mAb binding site <sup>§</sup>	VP3: P65S, D70A, D70H, D70N, D70Y, S71P, Q74R VP1: S102L, N104D, K105R, V171E, A176D, Q232E	VP3: V72I VP1: V166G, V171A, Y181S, R189T, A280V, A280E
Glycophorin A binding site/H7C27 mAb binding site	VP1: G217D, K221E, K221M	None
4E7 mAb binding site	None	None

<sup>†</sup>Data taken from [30,76,77].  
<sup>‡</sup>Data taken from [60,75].  
<sup>§</sup>The immunodominant site is defined by most of the existing mAbs against hepatitis A virus with the exception of the mAbs H7C27 and 4E7.  
mAb: Monoclonal antibody.

The antigenic structure of the HAV capsid is defined by three main epitopes (TABLE 1). The immunodominant site composed of closely clustered epitopes is defined by two major groups of escape mutants that include residues 70, 71 and 74 of VP3 and residues 102, 171 and 176 of VP1 [79,80]. A second epitope is the glycophorin A binding site, represented by mutants around residue 221 of VP1 [79,32]. Finally, there is a third and still undefined epitope, represented by escape mutants to the 4E7 monoclonal antibody (mAb).

Apart from the expected structural constraints due to those amino acid residues playing critical roles in capsid folding, a certain contribution of the codon usage to the low antigenic variability of the HAV capsid has also been suggested [81]. A total of 15% of the surface capsid residues are encoded by rare codons. These rare codons are highly conserved among the different HAV strains [49] and their substitution is negatively selected even under specific immune pressure [81]. Many of these capsid residues encoded by rare codons are surface exposed and located near or at the epitope regions, and this negative selection would prevent the emergence of antigenic variants. The need to maintain the clusters of rare codons responds to the requirement for proper capsid folding, which is controlled through the kinetics of translation (see above), and it is quite unlikely that a nucleotide substitution would give rise to a new codon of similar rarity and a compatible amino acid. Also, some biological constraints have been proposed to contribute to the low antigenic variability of HAV [82]. mAb-resistant mutants (MARs) representing the aforementioned epitopes show a completely different fitness pattern [81]. While MARs of the H7C27 mAb (glycophorin A binding site) show a similar fitness to that of wild-type viruses in *in vitro* assays, those of the K34C8

mAb (immunodominant site) show a significantly lower fitness than wild-type viruses. By contrast, among the few antigenic variants isolated from patients, only representatives of the immunodominant site are available (TABLE 1) [63,76,78,83]. This discrepancy may be explained by taking into consideration the biological constraints imposed by the enterohepatic cycle described above and the need to escape from erythrocyte attachment, since a conformational change in the glycophorin A binding site may result in an increased erythrocyte binding capacity, which is low in wild-type viruses at physiological conditions [32]. Avoiding blood clearance – that is, the removal of viruses from the fluid compartment of blood – may constitute an advantage for a viremic infectious agent whose target organ is the liver, contributing to the final fitness outcome *in vivo*.

#### Potential emergence of variants escaping the protection of the available vaccines: the need to complete the vaccination schedules in the HIV-positive MSM group

The emergence of a new serotype requires extensive substitutions in the capsid that seem quite unlikely to occur in a virus with such severe genomic, structural and biological constraints. However, the emergence of new variants is plausible if virus populations are forced through bottleneck conditions such as immune selective pressures.

Recently, the isolation of several natural antigenic variants of the immunodominant site during an outbreak of hepatitis A in the MSM community of Barcelona (Spain) has been described [78]. Of particular interest is one of these variants with two amino acid substitutions at positions 166 (V to G) and 171 (V to A) of the capsid protein VP1, just in the core of the immunodominant site (TABLE 1). MAR mutants around



this location show a phenotype of complete resistance to the available vaccines and a lower fitness, compared with wild-type viruses, in normal conditions, but higher fitness in the presence of antibodies [74]. A total of 4% of the whole affected group of patients had been vaccinated, and among these, 62% were HIV-positive. Additionally, among those who were vaccinated, only 12% had followed the complete schedule of vaccination, while 88% had received only one dose. These are the optimal conditions for the selection of those variants that, despite their lower fitness, are able to escape the neutralization effect of antibodies.

The immunocompromised population, particularly HIV-positive individuals, have an impaired immunological response to HAV vaccines, which means that they may have lower concentrations of anti-HAV IgG in sera than healthy individuals after vaccination and as such they require additional vaccine doses [84,85]. The normal schedule for HAV vaccination usually requires two doses. Between both doses, the level of IgG in immunocompromised patients is very low and insufficient to completely neutralize the virus, particularly if the input virus is high. Conditions of high input virus occur in some risky sexual practices, bearing in mind that the HAV titer in feces can be as high as  $10^{11}$  particles/g, particularly in HIV-positive individuals at 2 weeks after the onset of symptoms [6]. It cannot be forgotten that the peak of viruses in feces occurs even before the onset of symptoms, and thus the titers are even higher during the prodromic phase (FIGURE 1). Replication of the non-neutralized viruses in the presence of low concentrations of specific IgG may contribute to selecting, among the swarm of mutants generated by the quasispecies dynamics of replication, those variants that are resistant to the effect of the vaccines [86]. In other situations in which the level of input virus is low, such as in foodborne transmission, even low concentrations of IgG are able to neutralize virus infection [3].

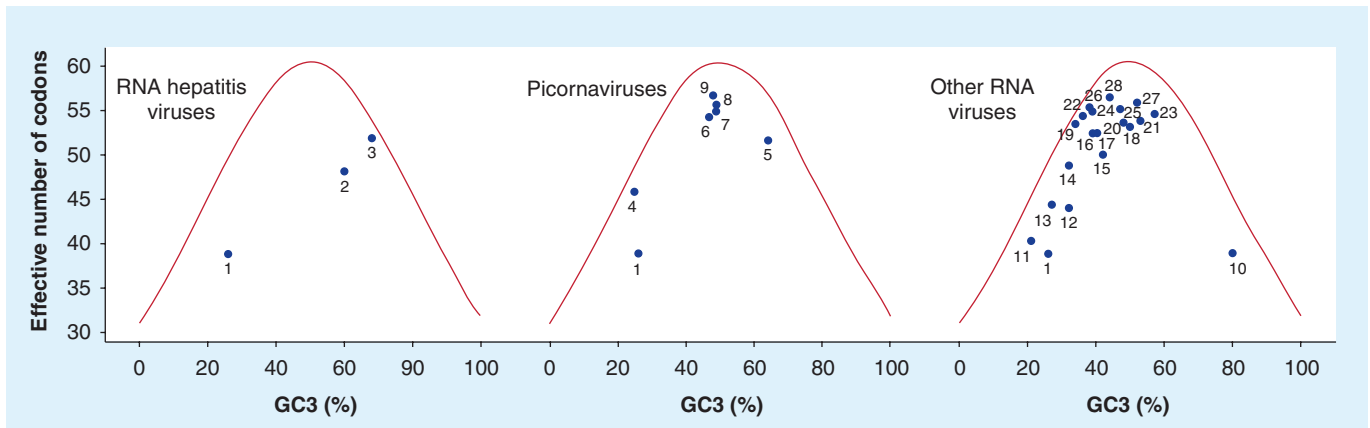
Whether these newly emerged strains will further circulate worldwide or disappear is yet to be elucidated. However, what is imperative is to target the MSM community with more effective information on risky sexual practices and vaccination programs. Additionally, efforts should be made, particularly among HIV-positive MSM, to completely accomplish the HAV vaccination schedule to avoid the potential emergence of antigenic variants as much as possible.

### What else can bioinformatics tell us about HAV genomic composition & evolution?

Bioinformatics and computational biology generate lots of information about the genomic composition of organisms and open the possibility to infer their evolution.

The degeneracy of the genetic code gives an organism the flexibility to encode a given protein sequence in its genome in an extraordinarily large number of ways [87]. In addition to codon bias, there are other genome biases such as codon-pair bias – that is, the preference or avoidance of certain codon pairs and dinucleotides biases, or in other words, the preference or avoidance of certain dinucleotides. The molecular and genetic mechanisms underlying these biases may be diverse, and it is likely that a combination of all of them is the actual evolutionary force acting within each genome. In the virus world, at least four mechanisms are envisaged, three of them in common with all organisms [88]; first, mutational bias and the specific nucleotide composition; second, translation selection, or the optimal codon adaptation to the tRNA pool in order to get a highly efficient and accurate translation; third, fine-tuning translation kinetics selection, or the right combination of codons to allow a regulated ribosome traffic rate that temporally separates protein folding events, ensuring ‘beneficial’ and avoiding ‘unwanted’ interactions within the growing peptide [89]; and fourth, selection for mechanisms to escape the antiviral cell responses.

HAV shows a significant codon usage bias, does not show codon-pair bias and has a very important dinucleotide bias [87,90]. All of these biases are obviously inherent to genomic compositional constraints [90,91], but probably not exclusively. The comparative analyses of the relationship between the effective number of codons and the G+C content at the third codon position of the HAV genome and other picornaviruses, RNA hepatitis viruses or other RNA viruses (FIGURE 4) allows us to conclude that the distance from the theoretical curve (compositional constraints as exclusive forces of codon usage bias) of HAV is the highest among all viruses tested, indicating that although compositional constraints play an important role in shaping its codon usage, other forces may also be involved. The percentage of deviation from the theoretical curve for HAV is 17.2%. Only hepatitis E virus shows a similar degree of deviation (16.7%) and is then followed by HIV (16%), Dengue virus (15%), yellow fever virus (12%), rabies and West Nile



**Figure 4. Influence of compositional constraints on codon usage bias of hepatitis A virus and other RNA viruses.** Hepatitis A virus shows a significant codon usage bias, which is obviously inherent to genomic compositional constraints, but probably not exclusively. The comparative analyses of the relationship between the effective number of codons and the G+C content at the third codon position (GC3%) of RNA hepatitis viruses (1: hepatitis A virus; 2: hepatitis E virus and 3: HCV), picornaviruses (4: rhinovirus; 5: foot and mouth disease virus; 6: poliovirus; 7: encephalomyocarditis virus; 8: coxsackievirus A and 9: enterovirus 71) and other RNA viruses (10: rubella virus; 11: rotavirus; 12: HIV; 13: respiratory syncytial virus; 14: hantavirus; 15: Dengue virus; 16: vesicular stomatitis virus; 17: influenza A virus; 18: yellow fever virus; 19: Marburg virus; 20: rabies virus; 21: West Nile virus; 22: mumps virus; 23: western equine encephalitis virus; 24: astrovirus; 25: measles virus; 26: ebola virus; 27: Japanese encephalitis virus and 28: norovirus) allows us to conclude that the distance from the theoretical curve (compositional constraints as exclusive forces of codon usage bias) of HAV is the highest among all viruses tested, indicating that although compositional constraints play an important role in shaping its codon usage, other forces may also be involved.

virus (11%) and poliovirus (10%). The average deviation for the other viruses is in the range of 2–9%. How significant these deviations are is difficult to define. However, among the viruses with higher deviations, fine-tuning translation kinetics selection and translation selection have been proven by functional genomics to contribute to the delineation of codon usage in HAV [56] and HIV, respectively [92]. Consequently, those conclusions on the origin of codon usage bias based exclusively on computational analyses should be interpreted with caution.

HAV shows a very low occurrence of CpG dinucleotide [87,90]. This low CpG occurrence cannot be explained by the overall low G+C content in the HAV genome (37%) since the dinucleotide GpC is eight-times more frequent [87]. The cytosine in CpG is the primary target of cellular DNA methylation. Methylated cytosine, in turn, is prone to deamination, creating a thymine in the process, which results in a transition mutation in the next round of DNA replication and systematic loss of cytosine over evolutionary time frames. In somatic cells, the majority of the remaining genomic CpGs outside active gene promoter regions are in fact methylated [93]. As a result of the scarcity of freely accessible, non-methylated CpG in the cell (that is not bound by cellular CpG-binding proteins or components of the transcriptional machinery), DNA sequences rich in unmethylated CpG, if encountered by the cellular machinery (e.g., as part of a

pathogen's genome), are recognized as foreign, and innate defense pathways are activated. While such CpG-mediated innate immune recognition is well established for DNA pathogens [94], evidence for a similar mechanism of CpG in RNA genomes is very sparse [95]. However, it can be speculated that the elimination, as much as possible, of CpG RNA motifs in the HAV genome is an evolutionary mechanism to avoid antiviral responses. This would again fit with the quiescent HAV replicative cycle to prevent triggering the cell antiviral responses.

Mutational pressure and different selective forces shape the HAV genome composition and contribute to its codon and dinucleotide biases, which in turn may play an important role in the virus replicative cycle. Thus, the endless question of whether mutation or selection were first remains to be answered.

### Conclusion

Although HAV as an RNA virus exists as a swarm of mutants or quasispecies, due to important structural and biological constraints, its phenotypic variability is rather low and a single serotype exists. Nevertheless, this situation should not be misunderstood; indeed, HAV, similar to any other RNA virus, continuously mutates, and although a long history of evolution has selected a constrained phenotype, new pressures may induce the emergence of viruses adapting to novel situations. An example of such

## Executive summary

**Hepatitis A infection**

- Hepatitis A is an acute infection of the liver by the hepatitis A virus (HAV), which is transmitted through the fecal–oral route.
- Infection is mostly asymptomatic among children under 5 years of age, while in older children and adults, it proceeds with symptoms.
- During the prodromic phase, virus titers in feces are very high, while the peak of viremia extends from the prodromic phase to 2 weeks after the onset of symptoms.
- Hepatitis A infection never develops to a chronic hepatitis and induces a long-lasting immunity.
- Highly effective inactivated vaccines are available today although, due to the difficulties in growing the virus, they are quite expensive.

**Hepatitis A virus**

- HAV belongs to the *Picornaviridae* family. Its replicative cycle has been studied *in vitro* with cell-adapted strains and, although it shares most of its replicative steps with the rest of picornaviruses, it is characterized by highly prolonged replication times.
- HAV enters the host by the oral route and, to reach the target organ, the liver, an enterohepatic cycle has been proposed. The input virus could replicate in the intestine, cross it into the bloodstream and reach the hepatocytes. After liver replication, progeny viruses would be released into the intestine through the biliary canaliculus and excretion in the feces and/or reinitiation of the cycle would proceed.
- HAV can use different mechanisms for its entry process: direct virus binding to the hepatitis A cellular receptor 1; indirect virus interaction with the asialoglycoprotein receptor, which binds and internalizes IgA molecules and consequently IgA-coated HAV; or direct and indirect binding to the hepatitis A cellular receptor 1 through the dual interaction of the virus particle and the IgA $\lambda$  chain of an IgA–HAV complex. Thus, both virus-free particles and IgA-coated particles are able to infect susceptible cells.
- HAV possesses a highly inefficient internal ribosome entry site to initiate translation, which constitutes a unique type III internal ribosome entry site, cannot induce the cellular shut-off and requires an intact cellular translation initiation factor eIF4G. This means that the tRNAs, among other resources, will be limiting for the virus.
- HAV has a highly biased codon usage that is also highly de-optimized with respect the cellular codon usage. This means that HAV uses codons that are not highly used by the cell as abundant codons and uses as rare codons those that are rare for the cell but also those that are highly used by the cell and whose pairing tRNAs will not be easily available for the virus. In the capsid-coding region, there are clusters of residues encoded by rare codons strategically located in the carboxy-borders of the highly structured elements and folded near or at the surface epitopes. One underlying molecular mechanism explaining why the clusters of rare codons are kept is the need to control the speed of translation. A correct combination of rapidly translated codons (those pairing with abundant tRNAs) and slowly translated codons (those pairing with scarce tRNAs) allows a regulated ribosome traffic pathway that is compatible with very precise protein folding, giving highly cohesive and stable capsids.
- HAV exists as a single serotype, another striking difference from the rest of picornaviruses.

**Quasispecies dynamics of evolution & virus fitness**

- HAV as an RNA virus replicates as a complex mutant genome population, or quasispecies, which is subjected to a continuous process of genetic variation, competition and selection.
- Genome size and diverse selective constraints limit the diversity that is actually expressed.
- Several structural constraints, both at the amino acid and codon usage levels, may contribute to the low variability of the HAV capsid. The clusters of rare codons needed to control the speed of translation are highly conserved among different HAV strains and their replacement is negatively selected even under immune pressure. Thus, the need to keep the clusters of rare codons, with the aim to preserve a proper capsid folding, contributes to the low antigenic variability of HAV and does not enable the emergence of a new serotype.
- The occurrence of an enterohepatic cycle calls for the need for a highly stable capsid to acid pH and biliary salts, which is able to escape blood clearance mechanisms. HAV has evolved to have the ineffective binding to the glycoprotein A decoy factor present in the erythrocyte membrane, and the region involved in such low interaction must be preserved.
- With so many constraints, the fitness landscape of HAV is predicted to be narrow and antigenic diversity is expected to be low. However, the ability of RNA viruses to explore the sequence space is enormous and, given the existence of selective pressures, such as the immune pressure, the emergence of new antigenic variants should not be neglected.
- To avoid as much as possible the emergence of antigenic variants escaping the effect of the available vaccines, the replication of the virus in the presence of low concentrations of neutralizing antibodies should be avoided. Thus, the complete vaccination schedule is a must, particularly among the HIV-positive MSM group.

**What else can bioinformatics tell us about HAV genomic composition & evolution?**

- HAV presents a highly biased codon usage but also a highly biased dinucleotide composition. HAV has an extremely low proportion of the CpG dinucleotide.
- Bioinformatics tells us that HAV genomic composition plays an important role in such biases. However most bioinformatic tools are not sensitive enough to provide information on the impact of different selective pressures in delineating such biases. Among them, fine-tuning control of the translation kinetics and avoiding the antiviral cell responses may play a significant role as mechanisms underlying the codon usage and dinucleotide bias, respectively.

a situation is to give the virus the opportunity to replicate in the presence of antibodies, which will probably end up in the selection of resistant mutants. The available vaccines are highly effective; however, to avoid the emergence of resistant viruses, incomplete vaccination schedules among the immunocompromised population, and particularly in the HIV-positive MSM group, must be totally avoided.

### Future perspective

The available inactivated vaccines against HAV are highly effective. This is indeed very good news for public health, but it has resulted in a lack of interest in the biology of HAV by the scientific community.

HAV has traditionally been considered an invariable virus. Nothing could be further from the truth. As an RNA virus, it is continuously evolving and exploring the sequence space. However, how wide the mutant spectrum could be depends on the fitness landscape, and indeed HAV suffers many structural and biological constraints, which will narrow this landscape. Additionally, although the mutation frequency of HAV is similar to that of other RNA viruses, the mutant repertoire is narrower, since the population size is small due to a slow replication ratio. In fact, the quasispecies theory predicts that in populations of RNA viruses with rapid replication, the narrower the fitness landscape, the higher the number of individuals in the progeny that will be lost due to their much lower fitness than the parent. Thus, given the predicted narrow landscape of the capsid-coding region of HAV, it would not be a good investment to have a rapid replication phenotype. Overall, in such a context, it could be expected that HAV will forever exist as

a single serotype. However, since the sequence space is almost infinite, the emergence of new viruses adapting to new conditions remains an open possibility. From the public health point of view, molecular epidemiology surveys to control the potential circulation of newly arising strains escaping the effect of the available vaccines should be performed, particularly among the HIV-positive MSM group.

From the biotechnology point of view, the new insights that genomic information has produced must be applied in the postgenomic era to provide new methods to obtain more affordable HAV reagents through the selection of a virus bearing a more efficient IRES and having an optimized genomic composition and codon usage, which could allow a higher antigen production.

### Financial & competing interests disclosure

*Research in the Enteric Virus Laboratory of the University of Barcelona is supported by Spanish Ministry of Science and Innovation (projects BIO2008-01312, BIO2011-23461 and CSD2007-00016), Generalitat de Catalunya (project 2005SGR00966 and Biotechnology Reference Network) and European Commission (project Food-4B-2005-36306).*

*The authors would like to disclose that the Enteric Virus Laboratory of the University of Barcelona owns intellectual property in the field of hepatitis A virus genetics and hepatitis A virus antigen production. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.*

*No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.*

### References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
- of considerable interest

1. Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *QJM* 6, 1–29 (1912).
2. Previsani N, Lavanchy D, Siegl G. Hepatitis A. In: *Viral Hepatitis Molecular Biology, Diagnosis, Epidemiology and Control*. Mushahwar IK (Ed.). Elsevier, The Netherlands, 1–30 (2004).
3. Cuthbert J. Hepatitis A: old and new. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 38–58 (2001).
4. Sjogren MH, Tanno H, Fay O *et al.* Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann. Intern. Med.* 106, 221–226 (1987).
5. Glikson M, Galun E, Oren R, Tur-Kaspa R, Shouval D. Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. *Medicine (Baltimore)* 71, 14–23 (1992).
6. Costafreda MI, Bosch A, Pinto RM. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3846–3855 (2006).
7. Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS *et al.* Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J. Infect. Dis.* 182, 12–17 (2000).
8. Akriviadis EA, Redeker AG. Fulminant hepatitis A in intravenous drug users with chronic liver disease. *Ann. Intern. Med.* 110, 838–839 (1989).
9. Germinario C, Luigi Lopalco P, Chicanna M, Da Villa G. From hepatitis B to hepatitis A and B prevention: the Puglia (Italy) experience. *Vaccine* 18(Suppl. 1), S83–S85 (2000).
10. Van Damme P, Van Herck K. Effect of hepatitis A vaccination programs. *JAMA* 294, 246–248 (2005).
11. Domínguez A, Oviedo M, Carmona G *et al.* Impact and effectiveness of a mass hepatitis A vaccination programme of preadolescents seven years after introduction. *Vaccine* 26, 1737–1741 (2008).
12. Pinto RM, Alegre D, Dominguez A *et al.* Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiol. Infect.* 135, 270–273 (2007).



13. Cianciara J. Hepatitis A shifting epidemiology in Poland and eastern Europe. *Vaccine* 18(Suppl. 1), S68–S70 (2000).
14. Tallo T, Norder H, Tefanova V *et al.* Sequential changes in hepatitis A virus genotype distribution in Estonia during 1994 to 2001. *J. Med. Virol.* 70, 187–193 (2003).
15. Barzaga NG. Hepatitis A shifting epidemiology in south-east Asia and China. *Vaccine* 18(Suppl. 1), S61–S64 (2000).
16. Tanaka J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 18(Suppl. 1), S57–S60 (2000).
17. Lee D, Cho YA, Park Y *et al.* Hepatitis A in Korea: epidemiological shift and call for vaccine strategy. *Intervirol* 51, 70–74 (2008).
18. Van Herck K, Jacquet JM, Van Damme P. Antibody persistence and immune memory in healthy adults following vaccination with a two-dose inactivated hepatitis A vaccine: long-term follow-up at 15 years. *J. Med. Virol.* 83, 1885–1891 (2011).
19. Samandari T, Bell BP, Armstrong GL. Quantifying the impact of hepatitis A immunization in the United States, 1995–2001. *Vaccine* 22, 4342–4350 (2004).
20. Wasley A, Samandari T, Bell BP. Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination. *JAMA* 294, 194–201 (2005).
21. Dagan R, Leventhal A, Anis E, Slater P, Ashur Y, Shouval D. Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *JAMA* 294, 202–210 (2005).
22. Vacchino MN. Incidence of hepatitis A in Argentina after vaccination. *J. Viral Hepat.* 15(Suppl. 2), 47–50 (2008).
23. Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* 43, S164–S172 (2006).
24. Yang Y, Liang Y, Qu L *et al.* Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 7253–7258 (2007).
- **A mechanism of inhibition of IFN synthesis.**
25. Asher LVS, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassell RA, Young GD. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Med. Virol.* 47, 260–268 (1995).
26. Schulman AN, Dienstag JL, Jackson DR *et al.* Hepatitis A Antigen particles in liver, bile, and stool of chimpanzees. *J. Infect. Dis.* 134, 80–84 (1976).
27. Ticehurst J, Rhodes LL Jr, Krawczynski K *et al.* Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *J. Infect. Dis.* 165, 835–845 (1992).
28. Blank CA, Anderson DA, Beard M, Lemon SM. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J. Virol.* 74, 6476–6484 (2000).
29. Ouzilou L, Caliot E, Pelletier I, Prévost MC, Pringault E, Colbère-Garapin F *et al.* Poliovirus transcytosis through M-like cells. *J. Gen. Virol.* 83, 2177–2182 (2002).
30. Dotzauer A, Brenner M, Gebhardt U, Vallbracht A. IgA-coated particles of hepatitis A virus are translocated antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Gen. Virol.* 86, 2747–2751 (2005).
31. Dotzauer A, Gebhardt U, Bieback K *et al.* Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J. Virol.* 74, 10950–10957 (2000).
- **A mechanism of entry of hepatitis A virus (HAV) into hepatocytes.**
32. Sanchez G, Aragones L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A, Pinto RM. Capsid region involved in hepatitis A virus binding to glycoprotein A of the erythrocyte membrane. *J. Virol.* 78, 9807–9813 (2004).
33. Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 15, 4282–4296 (1996).
34. Tami C, Silberstein E, Manangeeswaran M *et al.* Immunoglobulin A (IgA) is a natural ligand of hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1), and the association of IgA with HAVCR1 enhances virus-receptor interactions. *J. Virol.* 81, 3437–3446 (2007).
- **A mechanism of entry of HAV into cells.**
35. Racaniello VR. *Picornaviridae*, the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. Knipe DM, Howley PM (Eds). Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA, 795–838 (2007).
36. Bishop NE, Anderson DA. Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. *J. Virol.* 74, 3423–3426 (2000).
37. Lemon SM, Binn LN. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.* 148, 1033–1039 (1983).
38. Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. In: *Fields' Virology*. Knipe DM, Howley PM (Eds). Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA, 911–947 (2007).
39. Lanford RE, Feng Z, Chavez D *et al.* Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 11223–11228 (2011).
40. Qu L, Feng Z, Yamane D *et al.* Disruption of TLR3 signaling due to cleavage of TRIF by the hepatitis A virus protease-polymerase processing intermediate, 3CD. *PLoS Pathog.* 7, E1002169 (2011).
- **A mechanism of inhibition of IFN synthesis.**
41. Brown EA, Zajac AJ, Lemon SM. *In vitro* characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *J. Virol.* 68, 1066–1074 (1994).
42. Ehrenfeld E, Teterina NL. Initiation of translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosome entry site. In: *Molecular Biology of Picornaviruses*. Semler BL, Wimmer E (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 159–169 (2002).
43. Whetter LE, Day SP, Elroystein O, Brown EA, Lemon SM. Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J. Virol.* 68, 5253–5263 (1994).
- **Evidence of the low efficiency of the HAV internal ribosome entry site.**
44. Yang Y, Yi M, Evans DJ, Simmonds P, Lemon SM. Identification of a conserved RNA replication element (CRE) within the 3Dpol-coding sequence of hepatoviruses. *J. Virol.* 82, 10118–10128 (2008).
45. Leong LEC, Cornell CT, Semler BL. Processing determinants and functions of cleavage products of picornavirus. In: *Molecular Biology of Picornaviruses*. Semler BL, Wimmer E (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 187–198 (2002).
46. Kuechler E, Seipelt J, Liebig H-D, Sommergruber W. Picornavirus proteinase-mediated shutoff of host cell translation: direct cleavage of a cellular initiation factor. In: *Molecular Biology of Picornaviruses*. Semler BL, Wimmer E (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 301–312 (2002).
47. Borman AM, Kean KM. Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology* 237, 129–136 (1997).
- **Need for an intact eIF4G factor for HAV translation.**

48. Ali IK, McKendrick L, Morley SJ, Jackson RJ. Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *J. Virol.* 75, 7854–7863 (2001).
49. Sanchez G, Bosch A, Pinto RM. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J. Virol.* 77, 452–459 (2003).
50. Chou T, Lakatos G. Clustered bottlenecks in mRNA translation and protein synthesis. *Phys. Rev. Lett.* 93(19), 198101 (2004).
51. Robinson M, Lilley R, Little S *et al.* Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 12, 6663–6671 (1984).
52. Sorensen MA, Kurland CG, Pedersen S. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 207, 365–377 (1989).
53. Adzhubei AA, Adzhubei IA, Krashennnikov IA, Neidle S. Non-random usage of 'degenerate' codons is related to protein three-dimensional structure. *FEBS Lett.* 399, 78–82 (1996).
54. Gavrilin GV, Cherkasova EA, Lipskaya GY, Kew OM, Agol VI. Evolution of circulating wild poliovirus and vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J. Virol.* 74, 7381–7390 (2000).
55. Evans MS, Clarke TF, Clark PL. Conformations of co-translational folding intermediates. *Protein Pept. Lett.* 12, 189–195 (2005).
56. Aragonès L, Guix S, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. *PLoS Pathog.* 6, E1000797 (2010).
- **Role of capsid rare codons in HAV fitness.**
57. Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3704–3710 (1994).
58. Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int. Microbiol.* 1, 191–196 (1998).
59. Reid TMS, Robinson HG. Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiol. Infect.* 98, 109–112 (1987).
60. Roseblum LS, Mirkin IR, Allen DT, Safford S, Hadler SC. A multistate outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *Am. J. Public Health* 80, 1075–1080 (1990).
61. Bosch A, Lucena F, Diez JM, Gajardo R, Blasi M, Jofre J. Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *J. Am. Water Works Assoc.* 83, 80–83 (1991).
62. Dentinger CM, Bower WA, Nainan OV *et al.* An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *J. Infect. Dis.* 183, 1273–1276 (2001).
63. Sanchez G, Pinto RM, Vanaclocha H, Bosch A. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4148–4155 (2002).
64. Pinto RM, Costafreda MI, Bosch A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7350–7355 (2009).
65. Liang Y, Shilagard T, Xiao S *et al.* Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. *Gastroenterology* 137, 1448–1458 (2009).
66. Brack K, Berk I, Magulski T, Lederer J, Dotzauer A, Vallbracht A. Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. *J. Virol.* 76, 11920–11930 (2002).
67. Fensterl V, Grotheer D, Berk I, Schlemminger S, Vallbracht A, Dotzauer A. Hepatitis A virus suppresses RIG-I-mediated IRF-3 activation to block induction of beta interferon. *J. Virol.* 79, 10968–10977 (2005).
68. Probst C, Jecht M, Gauss-Muller V. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *J. Biol. Chem.* 274, 4527–4531 (1999).
69. Graff J, Richards OC, Swiderek KM *et al.* Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogeneous C terminus. *J. Virol.* 73, 6015–6023 (1999).
70. Martin A, Bénichou D, Chao SF, Cohen L, Lemon SM. Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3C<sup>pro</sup> proteinase. *J. Virol.* 73, 6220–6227 (1999).
71. Fry EE, Stuart DA. Virion structure. In: *The Picornaviruses*. Ehrenfeld E, Domingo E, Roos R (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 59–71 (2010).
72. Domingo E, Martin V, Perales C, Grande-Perez A, Garcia-Arriaza J, Arias A. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299, 51–82 (2006).
73. Overbaugh J, Bangham CRM. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science* 292, 1106–1109 (2001).
74. Sanchez G, Bosch A, Gomez-Mariano G, Domingo E, Pinto RM. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315, 34–42 (2003).
75. Robertson BH, Jansen RW, Khanna B *et al.* Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.* 73, 1365–1377 (1992).
76. Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H *et al.* Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol.* 76, 9516–9525 (2002).
77. Perez-Sautu U, Costafreda MI, Lite J *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005–2009: circulation of newly emerging strains. *J. Clin. Virol.* 52, 98–102 (2011).
78. Perez-Sautu U, Costafreda MI, Cayla J *et al.* Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 734–738 (2011).
- **Emergence of HAV antigenic variants in the HIV-positive MSM risk group.**
79. Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J. Virol.* 66, 2208–2216 (1992).
80. Nainan OV, Brinton MA, Margolis HS. Identification of amino-acids located in the antibody-binding sites of human hepatitis-A virus. *Virology* 191, 984–987 (1992).
81. Aragonès L, Bosch A, Pintó RM. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability. *J. Virol.* 82, 1688–1700 (2008).
- **Role of rare capsid codons in the low antigenic variability of HAV.**
82. Pinto RM, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res.* 127, 158–163 (2007).
83. Gabrieli R, Sanchez G, Macaluso A *et al.* Hepatitis in Albanian children: molecular analysis of hepatitis A virus isolates. *J. Med. Virol.* 72, 533–537 (2004).
84. Neilsen GA, Bodsworth NJ, Watts N. Response to hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected homosexual men. *J. Infect. Dis.* 176, 1064–1067 (1997).
85. Weissman S, Feucht C, Moore BA. Response to hepatitis A vaccine in HIV-positive patients. *J. Viral Hepat.* 13, 81–86 (2006).
86. Borrego B, Novella IS, Giralt E, Andreu D, Domingo E. Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *J. Virol.* 67, 6071–6079 (1993).
87. Bosch A, Mueller S, Pintó RM. Codon biases and viral fitness. In: *The Picornaviruses*. Ehrenfeld E, Domingo E, Roos R (Eds). ASM Press, Washington, DC, USA, 271–283 (2010).
88. Hershberg R, Petrov DA. Selection on codon bias. *Annu. Rev. Genet.* 42, 287–299 (2008).

89. Komar AA. A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends Biochem. Sci.* 34, 16–24 (2009).
90. D'Andrea L, Pintó RM, Bosch A, Musto H, Cristina J. A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in hepatitis A virus. *Virus Res.* 157, 19–24 (2011).
91. Zhang Y, Liu Y, Liu W *et al.* Analysis of synonymous codon usage in hepatitis A virus. *Virol. J.* 8, 174 (2011).
92. van Weringh A, Ragonnet-Cronin M, Pranckeviciene E, Pavon-Eternod M, Kleiman L, Xia X. HIV-1 modulates the tRNA pool to improve translation efficiency. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1827–1834 (2011).
93. Tucker KL. Methylated cytosine and the brain: a new base for neuroscience. *Neuron* 30, 649–652 (2001).
94. Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin. Immunol.* 16, 17–22 (2004).
95. Sugiyama T, Gursel M, Takeshita F *et al.* CpG RNA. Identification of novel single-stranded RNA that stimulates human CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes. *J. Immunol.* 174, 2273–2279 (2005).