

Capítol 2. El VHE a l'ambient.



2.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

Un dels paràmetres més utilitzats per determinar el nivell de desenvolupament d'un país és les condicions higiènic-sanitàries en les que viuen els seus habitants. La construcció d'estructures canalitzadores dels residus generats ha resultat ser una de les causes principals de l'increment de la qualitat de vida dels individus, aconseguint una disminució en els nivells d'incidència de moltes malalties de transmissió fecal-oral.

El Virus de l'Hepatitis E és un virus de transmissió fecal-oral. L'excreció s'inicia una setmana abans de l'aparició dels símptomes de la malaltia i pot prolongar-se durant 3 setmanes aproximadament (Aggarwal i Krawczynski, 2000). Aquesta característica del virus va fer possible que una de les primeres tècniques utilitzades per a la seva identificació i detecció fos l'observació al microscopi electrònic de la femta d'individus afectats. La posterior aparició de les tècniques moleculars va permetre l'estudi genètic del virus. Mitjançant l'aplicació de la tècnica molecular de la RT-PCR a partir d'extraccions d'àcids nucleics de sèrum o suspensions fecals de pacients es determina la presència o absència del virus encara que el seu títol sigui molt baix.

L'aplicació d'aquesta tècnica a mostres d'aigua residual urbana és una eina eficaç per l'obtenció d'informació sobre determinats agents infecciosos que circulen a les poblacions, com són els adenovirus humans, el virus de l'hepatitis A, el virus JC, el virus BK, etc... (Pina i col., 1998a; Pina i col., 2001; Bofill i col., 2000; Bofill i col., 2001). A més, les tècniques moleculars permeten detectar la presència tant de soques que causen infeccions clíniques com de les que causen infeccions subclíniques, aportant una visió global i real de la situació.

A països considerats endèmics pel VHE s'han identificat epidèmies associades a aigües i aliments contaminats pel virus. Els productes susceptibles d'actuar com a fonts d'infecció són aquells que poden haver entrat en contacte amb aigües contaminades fecalment, com són verdures, fruites i els mol·luscs bivalves que, degut al seu sistema d'alimentació (filtració d'aigua de mar) poden acumular partícules víriques. A més de les infeccions a regions endèmiques, també s'ha identificat casos esporàdics a països industrialitzats considerats no endèmics pel virus, casos tradicionalment associats a infeccions importades de regions endèmiques. Darrerament, però, s'han recollit evidències de l'existència d'infeccions provocades per soques autòctones de regions industrialitzades, malgrat que rarament s'identifiquen les fonts d'infecció, que probablement siguin les habituals de la transmissió fecal-oral. Algunes d'aquestes infeccions també s'han associat recentment al consum de carn

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

crua d'animals infectats pel virus (Tei i col., 2003) o a través de la ingesta d'infusions d'herbes (Ishikawa i col., 1995).

Tradicionalment, Espanya s'havia considerat una zona lliure del VHE. L'anàlisi de mostres d'aigua residual urbana de Barcelona per RT-PCR mitjançant l'ús d'encebadors dissenyats a partir de les seqüències de soques aïllades a regions endèmiques, només havia permès la identificació d'un aïllat molt similar als detectats a l'Índia (Pina i col., 1998b). Es va considerar que era una soca importada. Aquests resultats no explicaven les seroprevalències d'anticossos anti-VHE que s'havien obtingut a Espanya i Europa, que oscil·laven entre un 1 i un 3% a la població general (Balayan, 1997).

Els objectius d'aquest capítol de la tesi van ser:

- * Determinar la presència o absència del VHE a la població d'una regió considerada no endèmica pel virus (Barcelona)
- * Caracteritzar les soques circulants a aquesta població
- * Estudiar la variabilitat present simultàniament a l'ambient
- * Determinar la presència o absència del VHE a altres poblacions de regions considerades no endèmiques pel virus
- * Estudiar els nivells de bioacumulació del VHE per part de mol·luscs bivalves

2.2. MATERIALS I MÈTODES

2.2.1. SOQUES DEL VHE EXCRETADES PER POBLACIONS CONSIDERADES NO ENDÈMIQUES

2.2.1.1. Mostres d'aigua residual urbana

S'analitzaren 51 mostres d'aigua residual urbana de l'àrea de Barcelona. Les mostres es recolliren a l'entrada de l'estació depuradora d'aigua residual (EDAR) de Sant Adrià del Besòs, situada a prop de la desembocadura d'aquest riu. Aquesta planta va començar a funcionar l'any 1979 i en l'actualitat rep un cabdal d'uns 670.000 m³/dia, que equival a 3.100.000 habitants equivalents. En el moment de la presa de les mostres aquesta EDAR aplicava tractaments físico-químics.

Cada mostra va ser recollida en un recipient estèril i mantinguda a 4°C un màxim de 24 h, fins a la concentració de les partícules víriques en tampó PBS.

Trenta-nou de les mostres d'aigua residual van ser recollides entre juny del 2000 i juny del 2002 (ambdós inclosos), completant 2 anys de mostreig sistemàtic. El primer any (juny del 2000 a maig del 2001) el mostreig es realitzà a raó d'una mostra cada dues setmanes. Durant el segon any (juny del 2001 a juny del 2002) el mostreig es va fer mensualment.

Les 12 mostres restants havien estat recollides entre 1994 i 1999: 2 mostres eren de 1994, 2 de 1995, 2 de 1996, 3 de 1997, 1 de 1998 i 2 de 1999. Els concentrats vírics es van conservar a -80°C. Aquestes mostres havien estat estudiades prèviament, determinant la presència o absència del VHE mitjançant l'ús d'encebadors dissenyats a partir de seqüències de soques aïllades a les regions tradicionalment endèmiques (Taula 2.2.). En aquestes primeres anàlisis no es va detectar l'ARN del VHE a cap d'elles.

S'analitzaren mostres d'aigua residual urbana d'altres zones geogràfiques tradicionalment considerades també no endèmiques pel VHE. S'analitzaren 5 mostres recollides a Patras (Grècia) durant juny i juliol de 1999; 5 mostres més procedents de Washington D.C. (E.U.A.) de desembre de 1999; 4 mostres recollides a Nancy (França) durant març de 1998; i 4 mostres recollides a Umeå (Suècia) entre setembre i octubre de 1997. Les mostres van ser recollides i enviades congelades, a Espanya, on es concentraren

les partícules víriques en tampó PBS. Els concentrats vírics es conservaren a -80°C fins el moment de l'anàlisi.

2.2.1.2. Mostres de mol·luscs bivalves

Els mol·luscs bivalves són uns organismes que pel seu sistema d'alimentació (són filtradors) retenen i acumulen material que es troba en suspensió en l'aigua de la que obtenen l'aliment. Quan l'aigua en la que es troben rep una aportació de material fecal els virus presents poden acumular-se en l'organisme dels mol·luscs i convertir-los en un risc per la salut dels consumidors.

S'analitzaren un total de 10 mostres de mol·luscs bivalves. Sis mostres provenien del Delta de l'Ebre, una mostra (J) de Galícia i tres del Delta del Llobregat (A, B i C). Aquestes 3 van ser recollides a una zona a on estava prohibida la seva recol·lecció degut als alts nivells de contaminació del medi, i va ser necessari l'obtenció d'un permís especial. Aquesta zona correspondria a una zona C. Les altres 6 mostres provenien d'una zona classificada com a zona B. La mostra de Galícia (mostra J) va ser recollida a una zona sense classificar.

Quatre mostres corresponien a musclos (*Mytilus galloprovincialis*), 5 a ostrons (*Crassostrea gigas*) i 1 a ostres (*Ostrea edulis*). Van ser seleccionades per presentar uns alts nivells de contaminació fecal segons alguns indicadors bacterians (*E.coli*) i vírics (adenovirus humans –AdH-, enterovirus –EV- i norovirus –NoV-) estudiats. En la Taula 2.1. es mostren les característiques de les mostres. El seu processament i l'anàlisi de la presència d'*E.coli* i d'aquest virus humans de transmissió fecal-oral (AdH, EV i Norovirus) van ser realitzat prèviament per membres del laboratori (M. Formiga, G. Tofiño i I. Muniain).

Taula 2.1. Mostres de mol·luscs bivalves analitzades. Presència d'altres virus de contaminació fecal humana. += positiu per (RT)-PCR; -= negatiu per (RT)-PCR.

| Mostra | Mostra | zona | <i>E.coli</i> | AdH | EV | NoV |
|--------|----------------------------------|------|------------------|-----|----|------|
| A | <i>Mytilus galloprovincialis</i> | C | 160 ^a | + | + | n.a. |
| B | <i>Mytilus galloprovincialis</i> | C | 35 ^a | + | + | n.a. |
| C | <i>Mytilus galloprovincialis</i> | C | 6 ^a | + | - | n.a. |
| D | <i>Mytilus galloprovincialis</i> | B | <20 ^b | + | + | + |
| E | <i>Crassostrea gigas</i> | B | <20 ^b | + | + | + |
| F | <i>Crassostrea gigas</i> | B | <20 ^b | + | + | + |
| G | <i>Crassostrea gigas</i> | B | 500 ^b | + | + | + |
| H | <i>Crassostrea gigas</i> | B | <20 ^b | + | - | + |
| I | <i>Crassostrea gigas</i> | B | <20 ^b | + | + | + |
| J | <i>Ostrea edulis</i> | - | 40 ^b | + | + | + |

^a UFC /g de carn

^b NMP /100 g de carn

n.a.= no analitzat

2.2.1.3. Recuperació de les partícules víriques

2.2.1.3.1. Concentració de les partícules víriques presents a les mostres d'aigua residual

La quantitat de partícules víriques presents en les mostres ambientals és baixa, fet que dificulta la seva detecció, requerint l'anàlisi de grans quantitats de mostra. En molts casos això només és factible si es concentren les partícules víriques presents en un volum molt petit.

Diferents mètodes de concentració havien estat assajats en estudis previs (Puig i col., 1994). Per la concentració de les partícules víriques presents en mostres d'aigua residual es va seleccionar el mètode basat en una ultracentrifugació que permetia recuperar tot el material en suspensió, una elució del pellet amb tampó glicina a pH alcalí per tal de separar les partícules víriques del material groller, que s'eliminava per centrifugació i una posterior concentració dels virus per ultracentrifugació. Les mostres d'aigua residual es mantenien a 4°C fins el moment de la concentració. El protocol realitzat era el següent:

- Ultracentrifugar 84 ml d'aigua residual a 110.000xg durant 1 h a 4°C (rotor Beckman 70.1 Ti) per fer sedimentar tota la matèria en suspensió (ultracentrífuga Beckman L8-60M).
- Eluir el pellet obtingut amb 7 ml de tampó glicina 0,25 N pH 9,5.
- Mantenir en gel durant 30 min agitant de tant en tant.
- Afegir 7 ml de tampó PBS 2x.
- Eliminar el material groller mitjançant una centrifugació a unes 5.000 rpm durant 20 min a 4°C.
- Concentrar les partícules víriques presents al sobrenedant amb una segona ultracentrifugació a 110.000 xg durant 1 h a 4°C (rotor 70.1 Ti).
- Descartar el sobrenedant i eluir el pellet obtingut amb 210 µl de PBS 1x.
- Conservar el concentrat víric a -80°C.

2.2.1.3.2. Concentració de les partícules víriques presents a mostres de mol·luscs bivalves

En el cas de les mostres A, B i C es va processar tot l'organisme. El procés va ser el següent:

- Rentar els mol·luscs amb aigua corrent i netejar la superfície amb un raspall de filaments durs.
- Obrir assèpticament amb un ganivet estèril.
- Recollir tot l'organisme i posar-lo en un vas de precipitats mantingut, prèviament, sota radiació U.V.
- Pesar 50 g de cos sencer i afegir tampó glicina 0.25 N pH 10 (1:5 p/v).
- Triturar-ho tot en una batedora fent polsos de 10 seg.
- Homogeneïtzar la barreja mitjançant agitació magnètica durant 15 min a temperatura ambient.
- Ajustar el pH a 7±0.2.
- Centrifugar l'homogenat a 2.170xg durant 15 min a 4°C.
- Centrifugar 225 ml del sobrenedant a 39.800xg durant 45 min a 4°C.
- Ultracentrifugar 50 ml del sobrenedant resultant a 229.600xg durant 1 h a 4°C per tal de concentrar les partícules víriques.
- Ressuspendre el pellet amb 50 µl PBS 1x.

De les altres mostres (D a J) s'analitzà únicament l'hepatopàncrees. El processament era similar a l'anterior però amb algunes modificacions:

- Rentar els mol·luscs amb aigua corrent i netejar la superfície amb un raspall de filaments durs.
- Obrir assèpticament amb un ganivet estèril.
- Pesar 30 g d'hepatopàncrees i afegir tampó glicina 0,25 N pH 10 (1:5 p/v).
- Triturar-ho tot amb una batedora fent uns 3 pulsos de 10 seg cadascun.
- Homogeneïtzar la barreja mitjançant agitació magnètica durant 15 min a temperatura ambient.
- Ajustar el pH a 7 ± 0.2 .
- Centrifugar l'homogenat a $2.170 \times g$ durant 15 min a 4°C .
- Centrifugar el sobrenedant a $39.800 \times g$ durant 45 min a 4°C .
- Ultracentrifugar 42 ml del sobrenedant a $81.584 \times g$ durant 1 h a 4°C per tal de concentrar les partícules víriques.
- Ressuspendre el pellet amb 200-400 μl de PBS 1x obtenint un volum final màxim de 500 μl .
- Mantenir a -80°C fins el moment de l'anàlisi.

2.2.1.4. Detecció dels àcids nucleics

Una de les tècniques més utilitzades en l'actualitat per a la detecció de certs patògens a una mostra és la reacció en cadena de la polimerasa (o PCR), que permet detectar la presència del genoma per amplificació d'un fragment d'aquest. En el cas de virus amb genoma ARN l'amplificació requereix un pas previ de retrotranscripció de l'ARN a ADNc. És la RT-PCR. La baixa concentració de partícules víriques presents en les mostres ambientals fa necessari, en molts casos, un segon procés d'amplificació sobre el resultat d'aquesta primera PCR. És la PCR niada, que consisteix en realitzar un segon procés d'amplificació a partir del producte de la primera amplificació. En aquest cas els encebadors utilitzats estan compresos entre els de la primera PCR, és a dir, han de trobar-se al fragment ja amplificat. Aquesta PCR niada, a més d'incrementar la sensibilitat de la tècnica, actua com a prova confirmativa. L'aplicació d'aquesta tècnica per la detecció de virus ha d'anar precedida d'una extracció dels àcids nucleics vírics, que es troben protegits per la càpside.

2.2.1.4.1. Extracció dels àcids nucleics dels concentrats vírics

L'extracció dels àcids nucleics d'una mostra d'aigua residual o de mol·luscs es feia a partir del concentrat de partícules víriques obtingut després del procés de concentració per ultracentrifugació. El mètode seleccionat per l'extracció dels àcids nucleics està basat en l'ús de l'isotiocianat de guanidina i l'adsorció dels àcids nucleics a partícules de sílice (Boom i col., 1990). Aquest mètode permet obtenir els àcids nucleics nets per estudis moleculars.

El protocol seguit era el següent:

- Afegir 25 µl de partícules víriques a una barreja de 25 µl de partícules de sílice i 450 µl de tampó de lisi.
- Barrejar i deixar a temperatura ambient durant 10 min.
- Centrifugació a 20800 *xg* durant 15 seg a una centrífuga Eppendorf 5417C.
- Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pellet amb 500 µl de tampó de rentat.
- Centrifugar durant 15 min a 20800 *xg*.
- Eliminar el sobrenedant.
- Fer un segon rentat amb tampó de rentat.
- Fer 2 rentats més amb etanol 70%.
- Fer un rentat amb acetona.
- Incubar els tubs amb el tap obert a 55°C durant 10 min (fins aconseguir l'evaporació total de l'acetona).
- Afegir 25 µl de tampó d'elució a cada tub, eluint les partícules de sílice amb els àcids nucleics adherits.
- Incubar els tubs novament a 55°C durant 10 min, aquest cop amb el tap tancat.
- Centrifugar a 20800 *xg* durant 2 min.
- Passar el sobrenedant amb els àcids nucleics a tubs nets. És important no agafar partícules de sílice perquè inhibeixen el procés d'amplificació dels àcids nucleics.
- Conservar els àcids nucleics a -20°C durant un màxim de 3 setmanes.

La fase inicial de l'extracció (la lisi de les partícules víriques) es realitzava a una vitrina de seguretat II. Durant l'extracció també es preparaven dilucions 1:10 de cada mostra en el mateix tampó d'elució. Cada sèrie de mostres processada s'acompanyava d'un control negatiu i un control positiu.

2.2.1.4.2. Amplificació enzimàtica

2.2.1.4.2.1. Selecció dels encebadors per la detecció del VHE

En el moment d'inici d'aquest estudi, havien estat detectades a l'àrea de Barcelona un total de 4 soques del VHE. La primera soca va ser aïllada a partir d'una mostra d'aigua residual urbana. Aquest nou aïllat (BCN) va ser considerat una soca importada d'alguna regió endèmica. Dues soques eren d'origen humà aïllades a partir de sèrum (VH1 i VH2) i una d'origen animal (E11), molt probablement porcí. Aquestes 3 soques van ser considerades autòctones. Durant aquests estudis previs, l'amplificació d'una regió de l'ORF2 a totes les mostres es realitzà amb encebadors degenerats (Meng i col., 1997). La regió ORF1 va ser analitzada amb encebadors no degenerats dissenyats a partir de la comparació únicament de soques de regions endèmiques (Meng i col., 1997) per les mostres d'aigua residual i amb encebadors degenerats (Meng i col., 1998b i Schlauder i col., 1999) en el cas de les mostres clíniques i animals (Taula 2.2.). L'any 1999 es va publicar una combinació d'iniciadors degenerats universals per la detecció del VHE dissenyats a partir de la comparació de les seqüències de soques de Birmània, Mèxic i els Estats Units (Taula 2.3.) (Erker i col., 1999b).

Taula 2.2. Encebadors utilitzats per la identificació de les primeres soques de VHE a Espanya.

| Regió | Encebador | Reacció | Posició ^a | Mida (pb) | Seqüència (5'→3') ^b |
|-------------------|-----------|-----------|----------------------|-----------|--|
| ORF1 ^c | 560Rd | RT | 541-560 | 548 | CATVGCYTCBGCACATCAG ^d |
| | 12 | 1a PCR | 12-33 | | ATATGTGGTCGATGCCATGGAG |
| | 56d | PCR niada | 56-79 | 417 | CTGGCATYACTACTGCIYATTGAGC ^e |
| | 473Rd | | 451-473 | | CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC ^e |
| ORF1 ^f | 51 | RT | 51-70 | 422 | GGCTCCTGGCATCACTACTG |
| | 473R | 1a PCR | 451-473 | | CCTCGAAGCAGTAAGTGCGGTC |
| | 101 | PCR niada | 101-120 | 282 | ACTCTGCCCTTGCGAATGCT |
| | 383R | | 364-383 | | TACCAACGCTGAACATCACG |
| ORF2 ^g | 5687d | RT | 5687-5708 | 730 | AAYTATGCMCAGTACCGGGTTG |
| | 6417R | 1a PCR | 6395-6417 | | CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC |
| | 5972d | PCR niada | 5972-5993 | 347 | GTATGYTYTGCATACATGGCT |
| | 6319Rd | | 6298-6319 | | AGCCGACGAAATYAATTCTGTC |

^a La posició fa referència a la soca Birmana (Tam i col., 1991).

^b V= G, A o C; Y= C o T; B= G, T o C; R= A o G; M= A o C.

^c Encebadors utilitzats en estudis previs per analitzar mostres clíniques i d'origen animal.

^d De Meng i col., 1998b.

^e De Schlauder i col., 1999.

^f De Pina i col., 1998b. Encebadors utilitzats anteriorment per amplificar l'ORF1 del VHE a mostres d'aigua residual.

^g De Meng i col., 1997. Encebadors utilitzats anteriorment per amplificar l'ORF2 del VHE a totes les mostres.

Es va comparar la sensibilitat dels encebadors degenerats amb els quals s'havien detectat les primeres soques clíniques a l'àrea de Barcelona (encebadors 'antics') amb els publicats per Erker i col., (1999b) (encebadors 'nous'), mitjançant l'anàlisi d'una sèrie de dilucions d'una mateixa extracció d'àcids nucleics d'un control positiu (soca BCN). Després d'analitzar els resultats obtinguts es seleccionaren els nous encebadors (Taula 2.3.). Els dissenyats per amplificar la regió de l'ORF2 van ser escollits per l'anàlisi inicial de les mostres, mentre que els de l'ORF1 es reservaren per a la confirmació de les mostres positives per l'ORF2.

Taula 2.3. Encebadors utilitzats en aquest estudi per detectar la presència del VHE en les diferents mostres analitzades (d'Erker i col., 1999b).

| Regió | Encebador | Reacció | Posició ^a | Mida (pb) | Seqüència (5'→3') ^b |
|-------|---------------|---------------|----------------------|-----------|--------------------------------|
| ORF1 | HEVORF1con-a1 | RT | 397-419 | 417 | CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC |
| | HEVORF1con-s1 | 1a PCR | 2-25 | | CTGGCATYACTACTGCYATTGAGC |
| | HEVORF1con-a2 | PCR niada | 313-336 | 287 | GCIGAITACCAGCGCTGIACG |
| | HEVORF1con-s2 | | 50-70 | | GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC |
| ORF2 | HEVORF2con-a1 | RT | 6454-6479 | 198 | CTTGTTCRTGYTGGTTRTCATAATC |
| | HEVORF2con-s1 | 1a PCR | 6283-6306 | | GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG |
| | HEVORF2con-a1 | PCR Seminiada | 6454-6479 | 148 | CTTGTTCRTGYTGGTTRTCATAATC |
| | HEVORF2con-s2 | | 6332-6353 | | GTYGTCTCRGCCAATGGCGAGC |

^a La posició fa referència a la soca US1 (Schlauder i col., 1998)

^b R= A o G; Y= C o T; I= A, T, G o C; W= A o T

2.2.1.4.2.2. Anàlisi per RT-PCR de les mostres

L'anàlisi de la presència del VHE als diferents tipus de mostres es va fer mitjançant l'amplificació de 2 regions presents al genoma del virus: l'ORF1 i l'ORF2. La detecció sistemàtica de l'ARN viral es feia mitjançant l'anàlisi de la regió de l'ORF2. Si el resultat d'aquesta primera anàlisi era positiu, es procedia a analitzar la regió de l'ORF1. Cada grup de mostres era analitzat conjuntament amb els controls positius i negatiu de la seva extracció, així com amb un control negatiu de PCR cada 2 mostres per assegurar l'absència de contaminació.

La síntesi de l'ADNc i la seva amplificació requerien la preparació de 4 barreges diferents:

- Barreja RT1 (Taula 2.4.): barreja utilitzada en el primer pas de la retrotranscripció, consistent en desnaturalitzar el genoma víric a una alta temperatura.

Taula 2.4. Components de la barreja RT1.

| RT1 | Quantitat | Concentració final (10µl) |
|---|------------------|----------------------------------|
| 10x <i>PCR Gold Buffer</i> (Applied Biosystems) | 1 µl | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 0,6 µl | 1,5 mM |
| dNTPs (25 mM de cada) | 0,4 µl | 1 mM (de cada dNTP) |
| Encebador revers extern 25 µM | 1 µl | 2,5 µM |

- Barreja RT2 (Taula 2.5.): Barreja utilitzada en el segon pas de la retrotranscripció, consistent en la síntesi de l'ADNc.

Taula 2.5. Components de la RT2.

| RT2 | Quantitat | Concentració final (10µl) |
|--|------------------|----------------------------------|
| DTT 0,02 M | 0,5 µl | 1 mM |
| Inhibidor RNasas 20 U/µl (Applied Biosystems) | 0,5 µl | 10 U |
| Retrotranscriptasa MMLV 50 U/µl (Applied Biosystems) | 1 µl | 50 U |

- Barreja PCR1 (Taula 2.6.): barreja utilitzada en el primer grup de cicles d'amplificació (primera PCR).

Taula 2.6. Components de la PCR1.

| PCR1 | Quantitat | Concentració final (50µl) |
|--|---------------------|----------------------------------|
| 10x <i>PCR Gold Buffer</i> | 4 µl | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 2,4 µl | 1,5 mM |
| Encebador directe extern 25 µM | 1 µl | 0,5 µM |
| AmpliAq Gold 5 U/µl (Applied Biosystems) | 0,4 µl | 2 U |
| H ₂ O destil·lada estèril | fins a 50 µl finals | - |

- Barreja PCR2 (Taula 2.7.): barreja utilitzada en el segon grup de cicles d'amplificació (PCR niada).

Taula 2.7. Components de la PCR2.

| PCR2 | Quantitat | Concentració final (50µl) |
|---|---------------------|---------------------------|
| 10 x <i>PCR Gold Buffer</i> | 5 µl | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 3 µl | 1,5 mM |
| dNTP (25 mM de cada) | 0,5 µl | 0,25 mM (de cada dNTP) |
| Encebador directe intern 25 µM | 1 µl | 0,5 µM |
| Encebador revers extern 25 µM | 1 µl | 0,5 µM |
| AmpliTaq Gold 5 U/µl (Applied Biosystems) | 0,4 µl | 2 U |
| H ₂ O destil·lada estèril | fins a 50 µl finals | - |

Les condicions d'amplificació depenien dels encebadors utilitzats i de la longitud dels fragments que s'havien d'amplificar. En el cas dels encebadors seleccionats, la temperatura d'anellament va ser de 55°C i el temps d'elongació de 30 seg. A més, a les PCRs es va afegir un pas inicial de 5 min a 95°C perquè l'enzim utilitzat (Taq Gold polimerasa) no presenta activitat fins a la seva activació a 95°C.

El protocol per l'obtenció de l'ADNc era el següent:

- Preparar les barreges RT1, RT2 i PCR1 i PCR2 a una cabina de flux horitzontal.
- Distribuir 3 µl de la barreja RT1 a tubs de 0,2 ml adequadament marcats.
- Afegir els 5 µl d'àcids nucleics al tub de 0,2 ml corresponent.
- Centrifugar uns segons per baixar tot al fins del tub.
- Incubar a 95°C durant 5 min.
- Afegir 2 µl de la barreja RT2 a cada tub.
- Tornar a centrifugar uns segons.
- Incubar a 42°C durant 30 min i després a 95°C durant 5 min més.

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

Un cop s'obtenia l'ADNc es podia passar a amplificar-lo per PCR immediatament després del procés de retrotranscripció o mantenir el producte a 4°C. L'amplificació consistia en una primera PCR seguida d'una PCR niada. Els encebadors utilitzats eren específics per detectar el VHE.

- Afegir 40 µl de la barreja PCR1 als 10 µl de ADNc.
- Centrifugar uns segons.
- Incubar a un termociclador programable (Gene Amp PCR System 2400; Perkin Elmer):

- 5 min a 95°C
 - 20 seg a 94°C
 - 30 seg a 55°C
 - 20 seg a 72°C
 - 10 min a 72°C
 - 4°C
- } 35 cicles

Després del primer procés d'amplificació, es procedia a realitzar una segona amplificació amb nous reactius i els encebadors corresponents.

- Descongelar la barreja PCR2 i afegir l'ampliTaq Gold Polimerasa.
- Distribuir 49 µl en tubs de 0,2 ml adequadament marcats.
- Afegir 1 µl del producte de la primera PCR a cada tub corresponent.
- Centrifugar uns segons
- Incubar al termociclador, realitzant els mateixos cicles que a la primera PCR.
- Analitzar en un gel d'agarosa amb tinció de bromur d'etidi.

L'observació es va fer amb el sistema ImageMaster®VDS (Pharmacia-Biotech).

Es va analitzar 5 µl i 0,5 µl de cada extracció d'àcids nucleics, corresponent a 2 i 0,2 ml de mostra d'aigua residual, a 5 i 0,5 g de carn de mol·lusc sencer i 0,1-0,2 g i 0,01- 0,02 g de digestiu de mol·lusc.

2.2.1.5. Estudi de la seqüència dels fragments amplificats

Per confirmar els positius obtinguts per PCR es procedia a seqüenciar els fragments amplificats. La seqüenciació requeria una purificació prèvia del producte de PCR, una PCR de seqüenciació, una precipitació del producte d'aquesta PCR, una anàlisi del resultat de la PCR de seqüenciació (als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona) i, finalment, la realització dels estudis filogenètics.

2.2.1.5.1. Purificació dels productes de PCR

El procés de purificació es realitzava habitualment amb el kit *QIAquick PCR Purification* Kit de QIAGEN. Aquest kit s'utilitzava quan el producte de PCR era una única banda sense aparició de bandes inespecífiques. Si s'observaven bandes inespecífiques el kit utilitzat era el *QIAquick gel extraction Kit*.

2.2.1.5.1.1. Purificació directa dels productes de la PCR

Es basa en la unió de l'ADN a un gel de sílice. Seguint les instruccions del fabricant:

- Afegir 5 volums de tampó PB al producte de PCR.
- Barrejar i passar la barreja a una columna col·locada en un tub de 2 ml.
- Centrifugar durant 1 min a 17.900 xg (centrífuga Eppendorf 5417C) .
- Eliminar el filtrat.
- Afegir 750 μl de tampó PE.
- Centrifugar durant 1 min a 17.900 xg .
- Eliminar el filtrat.
- Tornar a centrifugar 1 min a 17.900 xg .
- Passar la columna a un tub de 1,5 ml nou.
- Afegir 30 μl de tampó EB i incubar a TA durant 1 min.
- Centrifugar a 17.900 xg .
- Conservar l'ADN purificat a $-20^{\circ}C$.

2.2.1.5.1.2. Purificació a partir de gel

Permet purificar una banda de PCR determinada mitjançant un pas inicial de càrrega del producte de PCR en un gel d'agarosa per tal de separar-la de les bandes que no interessin. El protocol era el següent:

- Córrer un gel al 2% d'agarosa amb el màxim de producte de PCR possible.
- Tenyir amb bromur d'etidi.
- Fer servir un transil·luminador i un cutter per tallar la banda adequada. Alternativament fer servir l'ImageMaster®VDS per visualitzar les bandes.
- Pesar el fragment de gel i passar-lo a un tub de 1,5 ml.
- Afegir 3 volums de tampó QG.
- Incubar a 50°C durant 10 min, barrejant cada 2-3 min.
- Afegir 1 volum d'isopropanol i barrejar.
- Passar el contingut a una columna i centrifugar durant 1 min a 17.900 $\times g$.
- Descartat el filtrat i afegir 500 μl més de tampó QG per eliminar les restes d'agarosa.
- Centrifugar 1 min i descartar el filtrat.
- Afegir 750 μl de tampó PE. Deixar reposar 2-5 min i centrifugar durant 1 min.
- Descartar el filtrat i tornar a centrifugar durant 1 min.
- Passar la columna a un tub de 1,5 ml sense tap i afegir 30 μl de tampó d'elució.
- Deixar reposar 2-3 min i centrifugar a 1 min a màxima velocitat.
- Passar el purificat a un tub net i conservar-lo a -20°C.

2.2.1.5.2. PCR de seqüenciació

Es seqüenciaven les 2 cadenes complementàries dels productes de PCR obtinguts. Es va utilitzar el kit *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin-Elmer, Applied Biosystems), amb AmpliTaq ADN polimerasa FS. La quantitat de purificat que s'afegia a la reacció de seqüenciació depenia de la intensitat de la banda obtinguda, habitualment entre 2 i 3 μl .

- Preparar la barreja necessària per la seqüenciació en una vitrina de flux horitzontal, contenint entre 1 i 4 μl de terminador segons la quantitat aproximada d'ADN afegit a la reacció, 0,5 μl de l'encebador corresponent (stock de treball de concentració 3,2 μM) i aigua destil·lada fins a 10 μl totals.
- Repartir la quantitat corresponent de barreja en tubs de 0,2 ml.

- Afegir l'ADN purificat.
- Centrifugar uns segons.
- Incubar a un termociclador programable.
 - 10 seg a 96°C
 - 5 seg a 50°C
 - 4 min 60°C
 - 4°C

} 25 cicles

2.2.1.5.3. Precipitació del producte de la PCR de seqüenciació

L'ADN del producte de la reacció de seqüenciació es precipitava mitjançant l'ús d'etanol a diferents concentracions.

- Afegir 64 µl d'etanol al 95% i 26 µl d'aigua bidestil·lada a cada tub amb reacció de seqüenciació.
- Vortejar durant uns segons.
- Precipitar a TA durant 10 min.
- Centrifugar durant 20 min a 20.800 *xg* (centrífuga Eppendorf 5417C).
- Eliminar el sobrenedant.
- Afegir 200 µl d'etanol 70%.
- Centrifugar 5 min a 20.800 *xg*.
- Eliminar el sobrenedant.
- Assecar l'ADN amb una Speed-Vac o a l'aire.

2.2.1.5.4. Anàlisi de les seqüències

L'anàlisi del resultat de la PCR de seqüenciació es va fer amb un seqüenciador automàtic (ABI PRISM™ 377, ABI PRISM™ 3100 o ABI PRISM™ 3700) als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

2.2.1.5.5. Anàlisis filogenètics

Les seqüències obtingudes van ser comparades a les existents al GenBank i EMBL (Taula 2.8.) utilitzant el programa BLAST del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) i l'alineament amb els fragments de seqüències corresponents amb el programa CLUSTALW de l'EBI (European Bioinformatics

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

Institute of the EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). L'anàlisi filogenètica de les regions seqüenciades es realitzà amb els programes Seqboot, Dnadist, Neighbour i Consense del software PHYLIP i la visualització de l'arbre va ser creada amb el programa TREEVIEW 1.5.

Taula 2.8. Nombre d'accés al GENBANK de les seqüències del VHE utilitzades per realitzar les comparacions i els estudis filogenètics.

| Lloc, soca | | ORF1 | ORF2 |
|---------------|----------|----------|----------|
| Grècia, | Grècia1 | AF110388 | AF110391 |
| | Grècia2 | AF110389 | AF110392 |
| Itàlia, | Itàlia | AF110387 | AF110390 |
| Àustria, | Àustria | AF279122 | AF279123 |
| Estats Units, | USA1 | AF060668 | |
| | USA2 | AF060669 | |
| | Sw USA | AF082843 | |
| Japó, | Japó 1 | AB074918 | |
| | Japó 2 | AB089824 | |
| Pakistan, | Pakistan | M80581 | |
| Birmània, | Birmània | M73218 | |
| Índia, | Índia | X98292 | |
| Egipte, | Egipte | n.d. | AF051352 |
| Txad, | Txad | AY204877 | |
| Marroc, | Marroc | AY230202 | |
| Xina, | Xina1 | D11092 | |
| | Xina2 | AJ272108 | |
| | Xina3 | AF082093 | AF082094 |
| Mèxic, | Mèxic | M74506 | |

n.d.= no disponible.

2.2.1.6. Suspensions control

Com a control positiu dels processos d'extracció i amplificació per RT-PCR es va utilitzar suspensions fecals al 10% en PBS creades a partir de mostres fecals de micos *rhesus* infectats amb la soca BCN. Aquestes suspensions es van mantenir conservades a -80°C.

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

La soca BCN havia estat aïllada al nostre laboratori d'una mostra d'aigua residual de Barcelona. La seqüenciació del genoma va mostrar que era molt similar a soques detectades a l'Índia. Es va considerar una soca importada (Pina i col., 1998b).

2.2.1.7. Detecció del VHA

Es va comparar la presència del VHE amb la del VHA en les mostres d'aigua residual de Washington DC, Nancy, Patras i Umeå. Aquestes anàlisis van ser realitzats per un membre del laboratori (Dra S. Pina).

Els concentrats vírics utilitzats van ser els mateixos que els utilitzats per l'estudi de la presència del VHE. Després de l'extracció dels àcids nucleics es va realitzar l'amplificació de l'ARN viral mitjançant RT-PCR niada. Es van utilitzar encebadors que permetien l'amplificació de fragments del 5'NTR i de la regió d'unió VP1/A2 (Taula 2.9.).

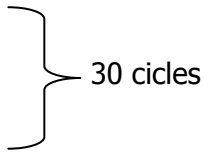
Taula 2.9. Encebadors utilitzats per l'anàlisi de la presència del VHA.

| Regió | Encebador | Reacció | Posició ^a | Mida (pb) | Seqüència (5'→3') ^b |
|--------|-----------|-----------|----------------------|-----------|--------------------------------|
| 5'NTR | VHA2 | RT | 680-700 | 368 | CTGAGTACCTCAGAGGCAAAC |
| | VHA1 | 1a PCR | 332-352 | | TTGGAACGTCACCTTGCACTG |
| | neVHA1 | PCR niada | 371-391 | 290 | ATCTCTTTGATCTTCCACAAG |
| | neVHA2 | | 641-661 | | GAACAGTCCAGCTGTCAATGG |
| VP1/2A | HHA2 | RT | 2906-2929 | 376 | TGCAAATTAYAAYCAYTCTGATGA |
| | HHA1 | 1a PCR | 3416-3438 | | TTTCTGTCCATTTYTCATCATTC |
| | HHA3 | PCR niada | 2940-2960 | 290 | TTYAGTTGYTAYTTGTCTGT |
| | HHA4 | | 3357-3376 | | TCAAGAGTCCACACACTTC |

^a La posició fa referència a la soca HM-175 (Cohen i col., 1987).

^b Y= C o T

La reacció d'amplificació es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 2.2.1.4.2.2. amb algunes modificacions. La DNA polimerasa utilitzada va ser AmpliTaq[®] ADN polimerasa (Perkin-Elmer) amb el seu tampó (tampó II 10x, Perkin Elmer). Els cicles de la primera PCR i la PCR niada van ser:

- 3 min a 95°C
 - 1 min a 95°C
 - 1 min a 55°C o 42°C
 - 1 min a 72°C
 - 5 min a 72°C
 - 4°C
- 

Les mostres positives van ser seqüenciades seguint el procediment descrit a l'apartat 2.2.1.5. i comparades amb seqüències present als bancs de dades.

2.2.2. DIVERSITAT DEL VHE A MOSTRES D'AIGUA RESIDUAL

2.2.2.1. Mostres d'aigua residual seleccionades

Es va seleccionar quatre mostres d'aigua residual que presentaven el VHE per clonar els productes de PCR obtinguts. L'objectiu era determinar si la seqüència obtinguda per seqüenciació directe del purificat del producte de la PCR era l'única present o si hi havia una barreja de soques, i per tant, aquesta seqüència obtinguda era la majoritària o la consens. Les mostres clonades s'havien recollit a l'entrada de la planta depuradora de Sant Adrià del Besòs a l'abril i maig del 2001 i al març i maig del 2003.

La mostra d'abril del 2001 va ser seleccionada perquè la seqüència resultant de la seqüenciació directa del producte de PCR obtingut a l'analitzar la mostra d'aigua mostrava posicions a on semblava haver barreja de nucleòtids. Una segona seqüenciació del mateix purificat va resultar en una nova seqüència diferent a l'obtinguda en la primera anàlisi. La mostra corresponent a maig del 2001 va ser seleccionada a l'atzar. Les 2 últimes mostres corresponien a 2 mesos durant els quals s'havien recollit 2 de les mostres de sèrum a les quals s'havia detectat la presència del VHE. L'objectiu d'analitzar aquestes mostres del 2003 era comprovar si entre els genomes amplificats estaven els 2 causants dels casos clínics detectats en aquells mesos.

2.2.2.2. Clonació del producte de la PCR

La seqüenciació directa a partir del producte de PCR permet l'obtenció de la seqüència majoritària obtinguda en el procés d'amplificació, però segons l'origen de la mostra, aquesta seqüència no necessàriament ha de ser l'única present. La clonació d'aquest producte i

l'anàlisi de la seqüència de diferents clons permet determinar si inicialment a la mostra hi havia un únic genoma del VHE o pel contrari hi havia diversitat. Cada clon obtingut prové de la incorporació d'un fragment d'ADN generat durant la PCR a una molècula de vector.

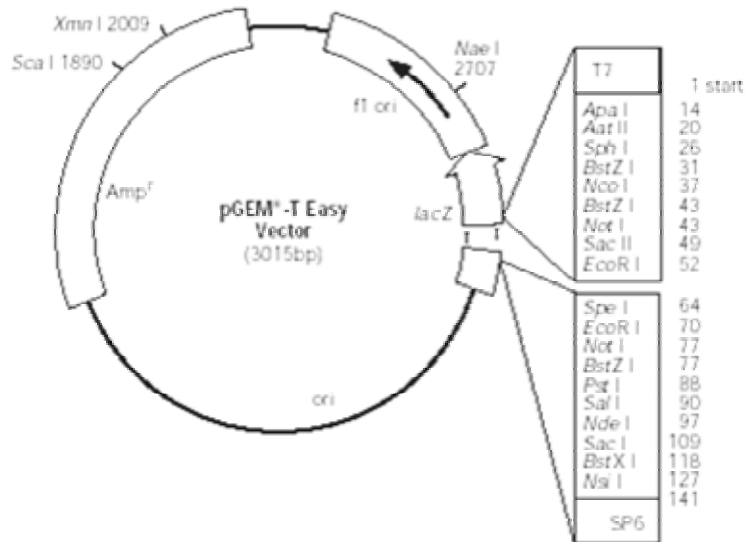


Figura 2.1. Estructura del vector pGEM-T easy (Promega).

2.2.2.2.1. Lligació

Es va utilitzar el kit *pGEM-T Easy Vector System II* (Promega). El vector pGEM-T Easy permet obtenir un gran nombre de còpies del fragment clonat. Presenta una timidina a cada extrem per afavorir la clonació de productes de PCR generats a partir de polimerases que afegeixin una adenina a l'extrem de la cadena generada. Aquest era el cas dels productes de PCR que es volia clonar. L'AmpliTaQ Gold és un enzim amb capacitat per incorporar una A als extrems de les molècules d'ADN que genera.

Es van utilitzar entre 1 i 3 µl del producte de PCR purificat que es volia clonar (segons l'apartat 2.2.1.5.1.), en funció de la intensitat de la banda obtinguda a la PCR. La reacció de lligació es va realitzar seguint les instruccions del proveïdor:

- Preparar la barreja necessària i repartir en tubs de 0,2 ml. Per cada reacció es necessita 2 µl de *2x Rapid Buffer*, 1µl de *pGEM-T Easy Vector*, 1 µl de la lligasa T4 i aigua destil·lada fins a un volum final de reacció de 10 µl.
- Afegir el producte de PCR purificat.
- Centrifugar uns segons per baixar-ho tot al fons del tub.
- Incubar durant 2 h a temperatura ambient o ON a 4°C.

→ Es recomana agitar bé (amb vòrtex preferentment) el *2x Rapid Ligation Buffer*.

→ La incubació tota la nit a 4°C permet l'obtenció d'un nombre major de transformants.

2.2.2.2.2. Transformació

Pel procés de transformació es van utilitzar 2 soques d'*E.coli* que permetien la identificació dels clons recombinants pel color (blanc-blau): JM109 i DH5α. El medi utilitzat en placa era medi LB suplementat amb ampicil·lina, isopropil-β-D-tiogalactopiranòsid (IPTG) i 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranòsid (X-gal). Quan una cèl·lula incorpora una molècula de vector amb insert, i per tant amb la seqüència del gen *LacZ* (β-galactosidasa) interrompuda per aquest, la colònia que forma és de color blanc degut a la manca d'activitat de l'enzim sobre el seu substrat, no generant el color blau.

El producte de PCR de la mostra SA 4/2001 es va transformar utilitzant la soca JM109, mentre que la soca utilitzada per les altres 3 mostres va ser la soca DH5α.

2.2.2.2.2.1. JM109

La soca JM109 (Promega Corp., Md., Wis) és una soca que s'adquireix ja en estat competent, és a dir, preparada per ser transformada. El seu fenotip és *recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15]*. Es mantenia congelada a -80°C fins el moment de la transformació.

La transformació es va realitzar seguint les instruccions del proveïdor:

- Preparar plaques de medi LB amb Amp (100 µg/ml), IPTG (0,5mM) i X-gal (80 µl/ml), medi LB líquid i medi SOC.
- Descongelar cèl·lules JM109 mantenint-les en tot moment en gel.
- Passar 2 µl de la lligació a un tub de 1,5 ml.
- Afegir 50 µl de cèl·lules a cada tub.

- Barrejar suaument i incubar 20-30 min en gel.
- Sotmetre les cèl·lules a un xoc tèrmic a 42°C durant 50 seg en un bany.
- Passar-les ràpidament a gel i incubar 2 min.
- Afegir 950 µl de medi SOC.
- Barrejar i incubar durant 1 h 30 min a 37°C en un agitador a unes 250 rpm.
- Plaquejar cada lligació per duplicat afegint 100 µl a cada placa i estendre amb una nansa de vidre.
- Incubar ON a 37°C.

→ Es recomanable atemperar les plaques prèviament a 37°C.

→ Si es vol obtenir un gran nombre de colònies es recomana centrifugar les cèl·lules crescudes en el medi SOC a 1.000 *xg* durant 10 min i ressuspèndre el pellet amb 200 µl de medi SOC. Plaquejar 100 µl per placa.

La lectura de les plaques era directa, ja que els clons amb l'ínsert eren de color blanc, mentre que els que no en tenien eren de color blau. La majoria dels clons blancs amb el centre blau també presentaven l'ínsert.

→ Per una millor diferenciació de les colònies es recomana incubar-les una estona a 4°C abans de la lectura.

2.2.2.2.2.2. DH5α

El fenotip de la soca DH5α és *supE44 Δlac U169 (Φ80 lacZΔM15) hscR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*. Es mantenia congelada a -80°C i requeria un processament previ a la transformació mitjançant el qual les bactèries entraven en estat competent.

2.2.2.2.2.2.1. Obtenció de cèl·lules competents

L'obtenció de cèl·lules competents es feia un dia abans de la transformació. Les cèl·lules competents obtingudes podien mantenir-se en aquest estat congelades a -80°C durant un màxim de 4 setmanes.

El protocol següent era el següent:

- Preparar una placa d'agar LB sense antibiòtic i realitzar una estria en escocès a partir d'un stock congelat de cèl·lules *E.coli* DH5α.
- Incubar ON a 37°C.

- Inocular una colònia en un tub amb 10 ml de medi LB sense antibiòtic.
- Incubar a 37°C en agitació ON.
- Inocular 2 ml del cultiu ON en 100 ml de medi LB sense antibiòtic (dilució 1:50).
- Incubar a 37°C en agitació durant unes 3 h fins que la densitat òptica mesurada a 600 nm estigui entre 0,4 i 0,6.
- Passar 10 ml del creixement a un tub i incubar durant 10 min en gel.
- Centrifugar 10 min a unes 3.000 $\times g$ a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant i ressuspendre el pellet amb 5 ml de CaCl₂ 50 mM fred.
- Incubar en gel durant 20 min en estàtic.
- Centrifugar 3 min a 3.000 $\times g$ a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant i ressuspendre el pellet amb 666 μ l de CaCl₂ 50 mM-15% glicerol i passar a un tub de 1,5 ml estèril.
- Deixar el concentrat bacterià en gel entre 1 h i ON.
- Transformar durant les pròximes 24 o 48 h o bé congelar a -80°C en alíquotes de 100 μ l.

2.2.2.2.2.2. Transformació

La transformació de la soca d'*E.coli* DH5 α es va fer amb un protocol lleugerament diferent a l'utilitzat amb la soca JM109. El protocol utilitzat era el següent:

- Preparar plaques de medi LB amb Amp (100 μ g/ml), IPTG (0,5 mM) i X-gal (80 μ l/ml) i medi LB líquid.
- Descongelar 100 μ l de cèl·lules competents.
- Afegir a les cèl·lules 2 μ l del producte de la lligació.
- Barrejar suaument i incubar 1 h en gel.
- Sotmetre les cèl·lules a un xoc tèrmic a 42°C durant 2 min.
- Passar-ho ràpidament a gel i incubar 2 min.
- Afegir 1 ml de medi LB.
- Barrejar i incubar durant 1 h 30 min a 37°C en un agitador a unes 250 rpm.
- Plaquejar en plaques LB/Amp/IPTG/X-gal 400 μ l (per duplicat), 200 μ l i 100 μ l de les cèl·lules transformades i estendre amb una nansa de vidre.
- Incubar ON a 37°C.

Al igual que amb les cèl·lules JM109 transformades, les colònies de la soca DH5 α d'*E.coli* amb insert eren de color blanc o blanc amb el centre blau.

2.2.2.2.3. Aïllament dels clons

Aquells clons que presumptament presentaven l'insert van ser aïllats de la resta de clons mitjançant la formació d'estries a plaques de medi LB amb Amp/IPTG/X-Gal amb l'ajuda d'escuradents estèrils. Les plaques s'incubaven ON a 37°C.

2.2.2.2.4. Comprovació de la presència de l'insert

Per la majoria de clons es va realitzar una PCR directament de les estries aïllades, amb l'ajuda d'escuradents estèrils que s'utilitzaven per agafar creixement i inocular els tubs de PCR. La PCR per la mostra SA4-2001 es va fer utilitzant 25 pmols dels encebadors presents a l'insert (HEVORF2con-a1 i HEVORF2con-s2). La de les mostres SA5-2001, SA3-2003 i SA 5-2003 es va fer amb 10 pmols d'uns encebadors del vector (del promotor SP6 i del T7, disposats a cada extrem de la zona de lligació del vector). Les condicions de la PCR van ser les corresponents a una PCR niada, descrites a l'aparat 2.2.1.4.2.2. Si els encebadors utilitzats eren els de l'insert, la temperatura d'anellament era 55°C. Si els encebadors eren els del vector, la temperatura era 50°C. Els productes de les PCR es van córrer en un gel d'agarosa.

2.2.2.2.5. Obtenció de les seqüències de l'insert

Els productes de PCR dels clons que presentaven insert van ser purificats i seqüenciats tal i com es descriu a l'apartat 2.2.1.5. La PCR de seqüenciació es va realitzar utilitzant els mateixos encebadors que s'havien fet servir per la PCR prèvia però a concentració 3,2 µM. La temperatura d'anellament era 42°C.

2.2.2.2.6. Congelació dels clons

Tots aquells clons amb insert que havien estat seqüenciats van ser congelats a -80°C per conservar-los. Es van congelar en medi LB amb un 15% final de glicerol estèril i ampil·lina 100 µg/ml. El procés seguit va ser:

- Inocular amb un escuradents estèril 5 ml de medi LB amb ampil·lina a partir de l'estria aïllada del clon.
- Incubar ON a 37°C.

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

- Aliquotar 750 µl de medi LB fresc amb un 30% de glicerol i 100 µg/ml d'ampicil·lina en un criovial.
- Afegir 750 µl del creixement ON a cada criovial i barrejar per inversió.
- Congelar a -80°C i conservar els clons a aquesta temperatura.

2.3. RESULTATS

2.3.1. EXCRECIÓ DEL VHE PER POBLACIONS DE ZONES CONSIDERADES NO ENDÈMIQUES PEL VIRUS

2.3.1.1. Selecció dels encebadors

Es va realitzar una amplificació de diferents dilucions d'un control positiu (soca BCN) amb els iniciadors utilitzats prèviament per detectar soques clíniques a la mateixa àrea (Taula 2.2.) i els publicats posteriorment per Erker i col., (1999b) (Taula 2.3.). Es va analitzar fins a la dilució 1:10000 de la mateixa extracció d'un control positiu. Mentre que els 2 sets d'encebadors degenerats per l'ORF1 amplificaven el control positiu fins a la dilució 1:10, els de la regió ORF2 tenien sensibilitat clarament diferent (Figura 2.2.). El set antic amplificava únicament la dilució directa de la mostra i en canvi els nous ho feien fins a la dilució 1:100.

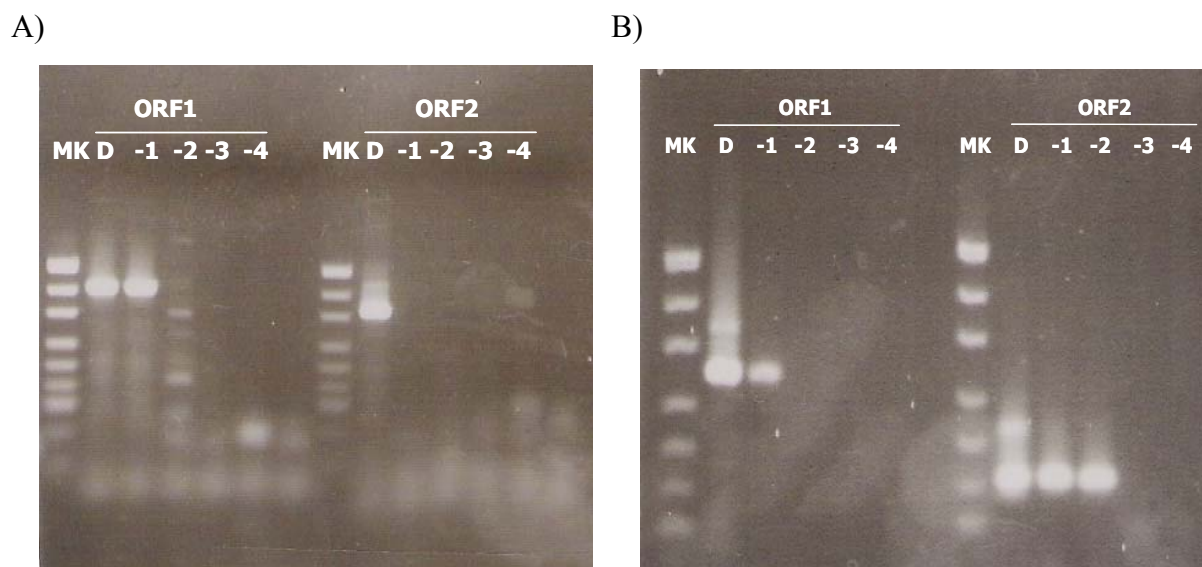


Figura 2.2. Amplificació per RT-PCR niada amb diferents iniciadors de la soca BCN utilitzada com a control positiu. A) Amplificació amb els iniciadors utilitzats prèviament per detectar soques clíniques. B) Amplificació amb els iniciadors publicats per Erker i col., (1999b).

Aquests resultats, el fet de que els encebadors dissenyats per Erker i col. (1999b) fossin degenerats i derivessin de l'alineament de seqüències de soques de 3 genotips

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

diferents (1, 2 i 3) i el seu èxit en la detecció d'altres soques europees del VHE (la soca italiana i les 2 gregues), van fer que es consideressin els encebadors més adequats per l'estudi de la presència del VHE en una zona industrialitzada i que s'utilitzessin en els anàlisis descrits en aquest estudi.

2.3.1.2. Presència del VHE a la població de Barcelona

Es van analitzar un total de 39 mostres d'aigua residual procedent de l'entrada de la planta depuradora de Sant Adrià del Besòs durant un període de 2 anys (2000-2002). En una primera fase inicial de 12 mesos (de juny del 2000 a maig del 2001) es recolliren 26 mostres a raó de 1 mostra cada 2 setmanes. Posteriorment es continuà el seguiment amb una mostra mensual durant 13 mesos més (de juny 2001 a juny del 2002). Totes les mostres es van analitzar amb els encebadors degenerats dissenyats per amplificar una regió de l'ORF2 descrits per Erker i col. (1999b).

S'amplificà un fragment del genoma del VHE a partir de vint-i-dos de les 39 mostres analitzades (56,4%) (Taula 2.10.). Les primeres 13 mostres analitzades, de juny a novembre del 2000, no presentaven el genoma del virus o els seus nivells estaven per sota dels nivells mínims de detecció de la tècnica. El resultat va ser positiu a totes les estudiades posteriorment menys a 4: la segona de maig del 2001, les de setembre i octubre del 2001 i la d'abril del 2002.

Taula 2.10. Resum dels resultats de les mostres d'aigua residual de l'àrea de Barcelona.

| | Gener | Feb. | Març | Abril | Maig | Juny | Juliol | Agost | Set. | Oct. | Nov. | Des. |
|-------------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2000 | | | | | | - - | - - | - - | - - | - - | - - | + + |
| 2001 | + + | + + + | + + | + + | + - | + | + | + | - | - | + | + |
| 2002 | + | + | + | - | + | + | | | | | | |

+ = detecció del genoma del VHE a la mostra.

- = no detecció del genoma del VHE a la mostra (absència o nivells inferiors als nivells de detecció).

També s'analitzaren 12 mostres recollides entre 1994 i 1999 que havien donat negatives al ser analitzades amb els encebadors publicats per Meng i col. (1997) encebadors diferents. Es detectà l'ARN del VHE a dues d'elles, les corresponents a abril de 1996 i a abril de 1999.

2.3.1.3. Presència del virus a d'altres regions considerades no endèmiques

S'analitzaren mostres d'aigua residual recollides a 4 zones geogràfiques prèviament considerades no endèmiques pel VHE: Nancy (França), Patras (Grècia), Umeå (Suècia) i Washington D.C. (EUA). Les mostres que donaren positiu per la regió de l'ORF2 van ser analitzades amb els encebadors que amplificaven la regió de l'ORF1.

Taula 2.11. Presència del VHE i del VHA en mostres d'aigua residual d'altres distribucions geogràfiques.

| Lloc | Període de mostreig | VHE | VHA |
|-----------------------|----------------------------|------------|------------|
| Nancy (França) | Març 1998 | 1/4 | 3/4 |
| Umeå (Suècia) | Setembre-October 1997 | 0/4 | 1/4 |
| Patras (Grècia) | Juny-Juliol 1999 | 0/5 | 1/4 |
| Washington D.C. (EUA) | Desembre 1999 | 1/5 | 5/5 |

Es detectà amplificació de la regió de l'ORF2 a dues de les mostres, una corresponent a Washington i l'altra a Nancy (Taula 2.11.). Només s'amplificaren a la dilució directa. L'anàlisi amb els iniciadors de l'ORF1 va permetre l'amplificació només de la mostra de Washington. Les altres mostres recollides a aquestes mateixes localitzacions, així com les 5 de Grècia i les 4 de Suècia resultaren negatives.

També s'analitzà la presència del virus de l'hepatitis A en aquestes mostres estrangeres. En aquest cas, les mostres positives van ser més que no pas pel VHE amb un total de 10 mostres positives de 17 analitzades. Aquelles localitzacions amb més mostres positives pel VHA eren les que presentaven alguna mostra positiva pel VHE: Washington D.C. (EUA) i Nancy (França).

2.3.1.4. Caracterització genètica de les soques detectades

Inicialment es determinà el nombre d'aïllats del VHE identificats a partir de mostres d'aigua residual de Barcelona recollides entre 1994 i 2002 comparant la seqüència de 148 pb obtinguda a l'amplificar el fragment de l'ORF2. Aquest fragment de 148 pb incloïa la

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

seqüència dels encebadors. Aquelles posicions degenerades dels encebadors que al cromatograma apareixien com a barreja de pics s'anotaren com a degeneracions. Si s'observava un pic clar d'un dels nucleòtids, s'anotava el nucleòtid corresponent, considerant que per probabilitat el nucleòtid més abundant era el que apareixia originàriament a la seqüència de l'aïllat estudiat, o en el seu defecte, en la soca més abundant a la mostra. En aquest cas s'identificaren 19 aïllats diferents del VHE (de BCN2 a BCN20). Si només es consideraven 101 pb, excloent la regió dels encebadors, s'identificaven 18 aïllats. BCN5 i BCN13 presentaven la mateixa seqüència, que es va anomenar BCN5/13. L'anàlisi filogenètic es va realitzar amb aquests 101 pb.

La majoria dels aïllats identificats presentaven alts nivells de similitud al comparar les seves seqüències. Quinze dels aïllats (BCN2 a BCN9, BCN11 a BCN14, BCN16 a BCN18, BCN20 i BCN5/13) presentaven unes identitats nucleotídiques entre ells que variaven entre 99,0% (100 nt iguals) i 89,1% (90 nt iguals). Analitzada cada seqüència individualment, s'observava que totes aquestes 15 presentaven més d'un 95% d'homologia amb algun altre aïllat, oscil·lant majoritàriament entre un 91,1% (92 nt) i un 95,0% (96 nt). La soca BCN19 era similar a les anteriors, però acumulava més diferències, entre un 91,1% (92 nt) i un 85,1% (86 nt). BCN15 presentava identitats nucleotídiques d'entre un 88,1% (89 nt) i un 81,2% (82 nt) amb les soques anteriors, incloent BCN19. BCN10, era l'aïllat més diferent de tots, coincidint només en un 84,1%-80,2%. Dues soques (BCN5 i BCN7) van ser aïllades de més d'una mostra diferent.

Respecte a les 2 soques aïllades prèviament a Barcelona a partir de sèrum de pacients amb hepatitis agudes, s'observa que tots els aïllats obtinguts presenten una alta homologia (entre 88,1% i 95,0% amb VH1 i 86,1% i 95,0% amb VH2), a excepció de BCN10 i BCN15 (Taula 2.12.).

Comparant les seqüències obtingudes amb les presents als bancs de dades, s'observava que totes elles, a excepció de BCN10 i BCN15 presentaven una alta homologia amb la soca grega Grecia1, aïllada a partir d'una mostra de sèrum d'un pacient amb hepatitis aguda. El número de nucleòtids idèntics oscil·lava entre 90 nt (89,1% d'identitat nucleotídica) i 97 nt (96,0%), essent per a la majoria de 96 o 97 nt. BCN10 presentava màxima homologia amb la soca austríaca i amb la soca porcina Sw USA dels Estats Units, amb 89 nt (88,1%). BCN15, en canvi, era molt similar a les soques japoneses Japó1 amb un 95,0% (96 nt) i Japó2 amb un 94,0% (95 nt). A la Taula 2.12. es comparen algunes seqüències representatives de la majoria dels aïllats trobats a l'aigua residual de Barcelona (BCN3, BCN4, BCN5/13, BCN12 i BCN16) i les que presenten característiques diferents

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

respecte a aquesta majoria (BCN10, BCN15 i BCN19) amb altres soques presents al GenBank i utilitzades per realitzar els estudis filogenètics.

Taula 2.12. Comparació dels 101 nt de la regió amplificada de l'ORF2 d'alguns dels aïllats obtinguts a partir d'aigua residual de Barcelona i altres soques pertanyents als diferents genotips descrits. En gris s'indica la màxima identitat. En cursiva es mostra una soca d'origen porcí. (nt iguals (% d'identitat)).

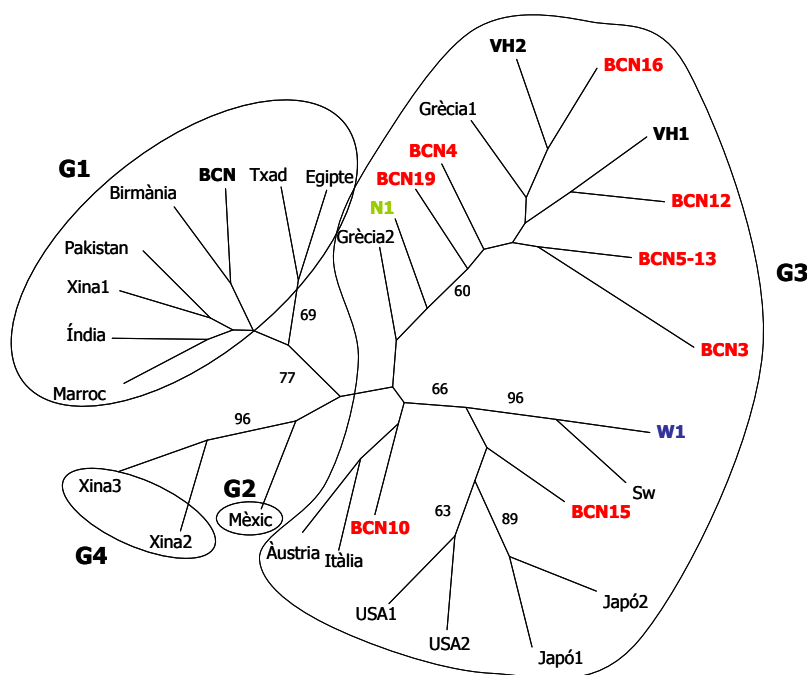
| Soques | BCN3 | BCN4 | BCN5/13 | BCN10 | BCN12 | BCN15 | BCN16 | BCN19 |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| VH1 | 94 (93,1) | 94 (93,1) | 96 (95,0) | 84 (83,2) | 99 (98,0) | 84 (83,2) | 96 (95,0) | 89 (88,1) |
| VH2 | 92 (91,1) | 90 (89,1) | 94 (93,1) | 82 (81,2) | 95 (94,0) | 84 (83,2) | 96 (95,0) | 87 (86,1) |
| Grècia1 | 97 (96,0) | 93 (92,1) | 97 (96,0) | 83 (82,2) | 96 (95,0) | 87 (86,1) | 97 (96,0) | 90 (89,1) |
| Grècia2 | 85 (84,1) | 86 (85,1) | 87 (86,1) | 84 (83,2) | 88 (87,1) | 83 (82,2) | 87 (86,1) | 83 (82,2) |
| Itàlia | 83 (82,2) | 82 (81,2) | 85 (84,1) | 86 (85,1) | 84 (83,2) | 84 (83,2) | 84 (83,2) | 80 (79,2) |
| Àustria | 82 (81,2) | 82 (81,2) | 84 (83,2) | 89 (88,1) | 85 (84,1) | 83 (82,2) | 81 (80,2) | 79 (78,2) |
| USA1 | 82 (81,2) | 79 (78,2) | 84 (83,2) | 84 (83,2) | 84 (83,2) | 91 (90,1) | 82 (81,2) | 81 (80,2) |
| USA2 | 82 (81,2) | 81 (80,2) | 82 (81,2) | 88 (87,1) | 84 (83,2) | 89 (88,1) | 80 (79,2) | 81 (80,2) |
| <i>Sw USA</i> | 85 (84,1) | 83 (82,2) | 87 (86,1) | 88 (87,1) | 87 (86,1) | 92 (91,1) | 83 (82,2) | 83 (82,2) |
| Japó1 | 83 (82,2) | 81 (80,2) | 83 (82,2) | 87 (86,1) | 85 (84,1) | 96 (95,0) | 79 (78,2) | 85 (84,1) |
| Japó2 | 84 (83,2) | 80 (79,2) | 82 (81,2) | 88 (87,1) | 84 (83,2) | 95 (94,0) | 78 (77,2) | 84 (83,2) |
| Mèxic | 81 (80,2) | 79 (78,2) | 79 (78,2) | 82 (81,2) | 77 (76,2) | 84 (83,2) | 73 (72,3) | 83 (82,2) |
| Xina2 | 77 (76,2) | 81 (80,2) | 81 (80,2) | 76 (75,2) | 80 (79,2) | 79 (78,2) | 77 (76,2) | 78 (77,2) |
| Xina3 | 78 (77,2) | 81 (80,2) | 80 (79,2) | 77 (76,2) | 79 (78,2) | 79 (78,2) | 77 (76,2) | 77 (76,2) |
| BCN | 82 (81,2) | 82 (81,2) | 82 (81,2) | 85 (84,1) | 82 (81,2) | 79 (78,2) | 78 (77,2) | 79 (78,2) |
| Txad | 83 (82,2) | 85 (84,1) | 85 (84,1) | 87 (86,1) | 83 (82,2) | 79 (78,2) | 81 (80,2) | 81 (80,2) |
| Egipte | 83 (82,2) | 83 (82,2) | 85 (84,1) | 87 (86,1) | 83 (82,2) | 78 (77,2) | 84 (83,2) | 79 (78,2) |
| Birmània | 83 (82,2) | 83 (82,2) | 83 (82,2) | 88 (87,1) | 83 (82,2) | 80 (79,2) | 81 (80,2) | 80 (79,2) |
| Índia | 82 (81,2) | 84 (83,2) | 82 (81,2) | 88 (87,1) | 80 (79,2) | 78 (77,2) | 80 (79,2) | 81 (80,2) |
| Xina1 | 82 (81,2) | 82 (81,2) | 82 (81,2) | 86 (85,1) | 80 (79,2) | 78 (77,2) | 80 (79,2) | 79 (78,2) |
| Pakistan | 83 (82,2) | 84 (83,2) | 83 (82,2) | 87 (86,1) | 81 (80,2) | 79 (78,2) | 81 (80,2) | 80 (79,2) |
| Marroc | 81 (80,2) | 82 (81,2) | 81 (80,2) | 85 (84,1) | 79 (78,2) | 77 (76,2) | 77 (76,2) | 79 (78,2) |

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

També es van aïllar 2 soques a partir de mostres d'aigua d'altres regions considerades no endèmiques pel VHE: la soca N1, aïllada a partir d'aigua residual de Nancy (França) i la soca W1, a partir d'aigua de Washington DC (E.U.A.). La soca N1 presentava la màxima identitat amb la soca VH1 (93 nt, 92,1%) i amb Grècia1 (92 nt, 91,1%). W1 només presentava un nucleòtid de diferència (99,1% d'identitat) amb la soca Sw USA, aïllada als Estats Units a partir de mostres d'origen porcí. Respecte a les soques d'origen humà W1 era més semblant a les soques Japó1 i Japó2 (92,1% i 93,1%, respectivament) que amb USA1 i USA2 (89,1% i 91,1%, respectivament).

Totes les soques del VHA detectades en les mostres d'aigua residual de Washington DC (EUA), Nancy (França) i Patras (Grècia) pertanyien al genotip IA. En canvi, la soca aïllada a Umeå (Suècia) formava part del genotip IB.

A la Figura 2.3. s'observen les relacions filogenètiques entre les soques del VHE aïllades Barcelona i d'altres representatives dels 4 grans genotips. Els aïllats de Barcelona, Washington DC i Nancy pertanyien al genotip 3.



.10

Figura 2.3. Arbre obtingut pel mètode *Neighbor Joining* representant les relacions filogenètiques segons el fragment de 101 nt amplificat de la regió de l'ORF2 entre alguns dels aïllats identificats a partir d'aigua residual en aquest estudi i altres soques representants dels diferents genotips. En colors apareixen les soques aïllades durant aquest estudi. Només es recullen els valors de bootstrap superiors a 60.

2.3.2. ESTUDI DE LA DIVERSITAT PRESENT A MOSTRES D'AIGUA RESIDUAL

Es van clonar 4 mostres d'aigua residual procedents de la planta depuradora de Sant Adrià del Besòs. Totes 4 mostres van ser clonades amb èxit i per PCR s'identificaren clons que contenien l'insert. Es van seleccionar 10 clons de cada mostra que van ser seqüenciats. La comparació es va fer en un fragment de 101 pb, descartant la regió dels encebadors.

- mostra SA 4/01: Es trobaren 3 seqüències diferents (Figura 2.4.). Una primera (seq4/01-1), que es pot considerar majoritària, s'aïllà de 6 del 10 clons. Una segona (seq4/01-2) es detectà a 3 dels clons. I finalment es trobà una tercera seqüència (seq4/01-3) que es detectà a un únic clon. Totes 3 seqüències presentaven diferències respecte a les obtingudes per seqüenciació directa del producte de PCR de l'anàlisi inicial de la mostra, BCN8 i BCN9. BCN8 semblava ser la seqüència consens de les anteriors, mentre que BCN9 presentava nucleòtids diferents a certes posicions amb idèntic nucleòtid a les seqüències dels clons.

```

                *           20           *           40           *           60
seq4/01-1 : CGACTGTAAAGTTATACACCTCCGTCGAGAATGCGCAGCAGGACAAGGGTATTGCTATAC : 60
BCN8      : .....T..... : 60
seq4/01-3 : .....C.....T.....A..C..... : 60
seq4/01-2 : .....C.....T.....A.....A..C..... : 60
BCN9      : .....T.....T.....A.....T..... : 60

                *           80           *           100
seq4/01-1 : CACATGACATAGACTTAGGGGATTCCCGTGTGGTCATTCAA : 101
BCN8      : .....T.....T..... : 101
seq4/01-3 : ....C..T..... : 101
seq4/01-2 : ....C..T.....T..A..G : 101
BCN9      : ....C..T...A...G....C.....T..A... : 101
    
```

Figura 2.4. Alineament de les seqüències aïllades a partir de 10 clons de la mostra SA 4/01 i de les 2 seqüències obtingudes a partir de la seqüenciació directa del producte d'amplificació de la mostra.

La traducció a proteïna de les seqüències de nucleòtids generava una única seqüència d'aminoàcids idèntica a la de BCN8, però amb una diferència respecte a la de BCN9.

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

- mostra SA 5/01: Es trobà una única seqüència present als 10 clons estudiats. Aquesta seqüència era idèntica a la identificada per seqüenciació directa del producte de PCR obtingut a l'analitzar la mostra d'aigua residual, l'aïllat BCN10.

- mostra SA 3/03: Es trobà una única seqüència en els 10 clons que es van estudiar d'aquesta mostra.

- mostra SA 5/03: Es trobaren 6 seqüències diferents amb 2 orígens diferents (Figura 2.5.). Una seqüència (seq5/03-1) va ser aïllada de tres clons. Dues seqüències (seq5/03-2 i seq5/03-3) s'aïllaren a 2 clons cada una. I tres més (seq5/03-4, seq5/03-5 i seq5/03-6) van ser aïllades d'un únic clon cada una. Les seqüències seq5/03-1 i seq5/03-2 presentaven un únic nucleòtid de diferència. Les altres 4 seqüències eren també molt similars entre elles (entre 1 i 3 diferències).

```

                *           20           *           40           *           60
seq5/03-1 : CGACTGTTAAGTTATATACCTCCGTCGAGAATGCACAGCAGGACAAGAGTATTGCTATACC : 61
seq5/03-2 : .....G..... : 61
seq5/03-3 : .....A.....C.....T.....G..... : 61
seq5/03-6 : .....A.....C.....T.....G..... : 61
seq5/03-4 : .....A.....C.....T.....G..... : 61
seq5/03-5 : .....A.....C.....T.....G..... : 61

                *           80           *           100
seq5/03-1 : ACACGATATAGACTTAGGGGATTCCCGTGTGGTTATTCAG : 101
seq5/03-2 : ..... : 101
seq5/03-3 : .....C.....C.....A : 101
seq5/03-6 : .....A : 101
seq5/03-4 : .....C..... : 101
seq5/03-5 : ..... : 101
```

Figura 2.5. Alineament de les seqüències aïllades a partir dels 10 clons de la mostra SA 5/03.

La comparació de les seqüències dels diferents clons amb tots els aïllats obtinguts a partir de la seqüenciació directa de les mostres d'aigua residual va revelar que l'aïllat seq4/01-2 era idèntic a la soca BCN7, que havia estat detectada a mostres de febrer, març i maig del 2001, i que seq3/03 coincidia amb la soca BCN6, detectada gairebé 2 anys abans

(febrer 2001). Tots els clons estudiats generaven la mateixa seqüència aminoacídica excepte el seq5/03-1, amb una diferència (Figura 2.6).

| | | | | | |
|-----------|---|-----------------------------------|----|----|--|
| | | * | 20 | * | |
| BCN9 | : | TVKLYTSVENAQQDKGIAIPHDINLGDSRVVIQ | : | 33 | |
| seq4/01-1 | : |D..... | : | 33 | |
| BCN8 | : |D..... | : | 33 | |
| seq4/01-2 | : |D..... | : | 33 | |
| seq4/01-3 | : |D..... | : | 33 | |
| seq3/03 | : |D..... | : | 33 | |
| seq5/03-4 | : |D..... | : | 33 | |
| seq5/03-3 | : |D..... | : | 33 | |
| seq5/03-6 | : |D..... | : | 33 | |
| seq5/03-5 | : |D..... | : | 33 | |
| seq5/03-2 | : |D..... | : | 33 | |
| seq5/03-1 | : |S.....D..... | : | 33 | |
| seq5/01 | : |D..... | : | 33 | |

Figura 2.6. Alineament de les seqüències d'aminoàcids de tots els aïllats obtinguts per clonació, així com les de BCN8 i BCN9, obtingudes per seqüenciació directa de l'amplificat de SA4/01.

2.3.3. ESTUDI DE LA PRESENCIA DEL VHE A MOL·LUSCS BIVALVES

S'analitzaren 10 mostres de mol·luscs bivalves analitzats prèviament per la presència d'adenovirus humans, enterovirus i norovirus. Totes contenien un considerable nivell de contaminació fecal humana. Els encebadors utilitzats van ser els habituals d'Erker i col. (1999b) que permetien l'amplificació de l'ORF2. S'analitzaren 5 i 0,5 µl de les extraccions.

Cap de les 10 mostres analitzades contenia el genoma del virus.

2.4. DISCUSSIÓ

L'estudi dels virus excretats en una població mitjançant l'anàlisi dels virus presents en l'aigua residual urbana que genera ha demostrat que és una eina útil que aporta informació fiable sobre les soques que estan infectant aquesta població, permetent la detecció tant de les soques causants d'infeccions clíniques com de les causants d'infeccions subclíniques (Pina i col., 2001).

En aquest capítol s'ha estudiat la presència del virus de l'hepatitis E en l'aigua residual generada per la població de l'àrea de Barcelona. Aquesta, com a regió desenvolupada, és considerada àrea no-endèmica pel VHE. S'ha fet un seguiment mensual durant un període de 2 anys en el qual s'ha analitzat entre una i dues mostres d'aigua residual urbana cada mes. Els resultats mostren la presència del VHE en més d'un 56% de les mostres analitzades en aquests 2 anys. També s'han estudiat mostres de 5 anys anteriors que ja havien estat analitzades prèviament amb encebadors dissenyats a partir de soques de regions considerades endèmiques i que havien donat negatiu. A dues de les mostres es detectà el VHE amb els nous encebadors, el que indica que la detecció generalitzada del VHE durant el període de mostreig (2000 a 2002) no és degut a un brot puntual sinó que el VHE està essent excretat habitualment per la població. No es pot descartar que el baix percentatge de mostres amb VHE recollides entre 1994 i 1999 fos degut a l'antiguitat d'aquestes, ja que, malgrat que els concentrats vírics es conservaven a -80°C , períodes tan llargs d'emmagatzematge podrien disminuir el títol víric.

Entre juny del 2000 i juny del 2002 s'analitzaren un total de 39 mostres d'aigua residual procedent de la mateixa planta depuradora (Sant Adrià del Besòs). D'aquestes 39, 22 (56,4%) tenien soques del VHE. Sorprenentment, les primeres 13 mostres analitzades eren negatives. A 22 de les següents 26 mostres analitzades (84,6%) es detectà el genoma del VHE. Un total de 18 aïllats van ser identificats. La majoria d'aquests aïllats pertanyerien al genotip 3, un dels 4 grans genotips descrits per Schlauder i Mushahwar (2001), malgrat que els valors obtinguts amb la comparació d'un fragment tan petit (101 nt) no són definitius, ni per tant, concloents. Aquest genotip 3 agruparia a la majoria de soques del VHE descrites a Europa i els EUA, considerats regions no endèmiques pel virus.

També s'estudià la presència del VHE en mostres d'aigua residual recollides puntualment d'altres regions també considerades no-endèmiques pel virus. Malgrat el baix número de mostres analitzades, 5 dels EUA i 4 de França, es va detectar la presència del

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

VHE en 2 d'elles (una per cada país). No es detectà el virus a cap de les mostres de Grècia i Suècia. També es va analitzar la presència del VHA en aquestes mostres. Cal destacar que EUA i França presentaven un elevat nombre de mostres positives pel VHA, 3 de 4 i 5 de 5, respectivament. Mentre que només 1 mostra de Grècia i 1 de Suècia tenien VHA. La soca del VHE detectada a l'aigua de Washington s'agrupava filogenèticament amb les soques detectades als EUA, sobretot amb la soca d'origen porcí aïllada als E.U.A., i amb soques japoneses, mentre que la detectada a Nancy (França) era més similar a les soques aïllades a Europa.

La regió amplificada dels diferents aïllats ha estat seqüenciada i la diversitat observada entre els aïllats permet descartar la presència d'un únic brot. A més, la clonació dels productes de l'amplificació de 4 de les mostres revelà que a 2 d'elles només hi havia present una seqüència (en 10 clons analitzats), mentre que a les altres 2 es trobaven diversos aïllats amb diversitat nucleotídica variable. En el cas de la mostra SA 5/03, les diferents seqüències trobades als clons no semblaven correspondre totes a variacions d'una única soca, sinó que podien provenir de variants de diferents soques que estaven circulant simultàniament a la població.

El fragment amplificat (148 pb) de la regió de l'ORF2 és un fragment petit, però altres estudis filogenètics amb seqüències curtes del VHE han mostrat que els arbres generats a partir d'aquestes presenten una topologia similar als observats amb seqüències més llargues (Wang i col., 1999; Schlauder i col., 1998). Només s'ha pogut amplificar un fragment més llarg (de la regió de l'ORF1) d'una mostra d'aigua residual, la de Washington D.C. (USA), confirmant la tipificació obtinguda amb el fragment de l'ORF2. La impossibilitat d'amplificar l'ORF1 de les soques presents a les altres mostres suggereix que la sensibilitat dels encebadors utilitzats en aquest estudi per amplificar aquesta regió és inferior a la dels de la regió de l'ORF2. De fet, s'ha descrit una eficiència inferior dels primers respecte als segons quan s'han utilitzat per analitzar mostres de sèrum, ja que mostres positives amb els iniciadors de l'ORF2 han donat resultats negatius quan s'analitzaven amb els de la regió ORF1 (Wang i col., 1999). La baixa sensibilitat dels encebadors d'aquesta regió, combinada amb els baixos nivells de VHE trobats en les mostres d'aigua residual, poden ser els responsables dels resultats negatius obtinguts per l'ORF1.

L'anàlisi de les seqüències detectades va mostrar que la majoria pertanyien al genotip 3. Prèviament a aquest estudi s'havien aïllat 2 soques de mostres clíniques causants d'hepatitis agudes a l'àrea de Barcelona (Pina i col., 2000). Les seqüències amplifiades d'aquestes soques coincidien entre un 86,1% i un 95,0% amb les soques excrètades per la

Capítol 2. El VHE a l'ambient.

població de la mateixa àrea. En relació amb soques d'altres regions, la més similar era una soca grega, Grècia¹, també considerada com a soca d'una regió no-endèmica pel VHE.

Gairebé no existeixen estudis que hagin utilitzat l'anàlisi de l'aigua residual generada per una població per estudiar l'excreció del VHE per part d'aquesta. Vaidya i col. (2002) van trobar un 11% de mostres d'aigua residual positives procedents d'una planta de Pune (Índia), regió considerada tradicionalment endèmica pel VHE. Les mateixes mostres van ser analitzades per detectar VHA, trobant un 24,4% de mostres amb el virus. En aquest cas, però, l'anàlisi es va fer sense concentració prèvia de les partícules presents al virus, cosa que explicaria el baix nombre de mostres positives identificades.

També s'ha estudiat l'acumulació del VHE per part de mol·luscs bivalves, que degut al seu sistema d'alimentació (són filtradors) acumulen partícules en suspensió, entre elles partícules víriques. Si l'aigua filtrada està contaminada fecalment, aquests mol·luscs es converteixen en possibles fonts d'infeccions de transmissió fecal-oral, entre elles l'hepatitis aguda pel VHE. Anàlisi de la presència de virus en homogenats de mol·luscs ha permès observar l'acumulació de patògens humans com adenovirus, virus JC, enterovirus, norovirus i VHA (Pina i col., 1998a; Bofill-Mas i col., 2001; Formiga-Cruz i col., 2003). Algunes de les mostres analitzades per aquests patògens i amb alts nivells de contaminació fecal van ser també analitzades per estudiar la presència del VHE. No es detectà el virus en cap d'elles. Això pot ser degut als baixos nivells del VHE detectats en les mostres d'aigua residual en comparació amb d'altres patògens humans més abundants, a l'efecte dilució en l'aigua a on es cultiven els mol·luscs o a que el VHE podria presentar una menor estabilitat en aigua de mar o quan es troba a l'interior dels organismes filtradors.