

***Capítol 3. Estudis de la infecció del
VHE.***



3.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

El virus de l'Hepatitis E és un dels principals causants d'hepatitis agudes no-A no-B de transmissió entèrica a països en vies de desenvolupament (Worm i Wirnsberger, 2004). En alguns d'aquests països se'l considera causant de més del 50% dels casos i s'han descrit nombrosos brots epidèmics d'hepatitis agudes que han afectat a milers d'afectats. En aquestes regions, a on les condicions higiènic-sanitàries acostumen a ser deficientes, la principal causa de la infecció és el contacte amb aigua amb contaminació fecal.

Tradicionalment, els països desenvolupats s'han considerat lliures del VHE. La majoria de casos clínics causats pel VHE detectats en aquestes zones s'associaven a casos importats durant viatges a regions a on el virus era endèmic. Paradoxalment, estudis serològics realitzats a països europeus i als EUA mostraven unes seroprevalències d'entre un 1 i un 5% entre la població de donants de sang (Paul i col., 1994). Aquests valors poden considerar-se alts si s'accepta la hipòtesis de la no-endemicitat del VHE en aquestes regions.

Des de mitjans de la dècada dels 90, començaren a detectar-se casos d'hepatitis agudes a regions no-endèmiques causades per soques del VHE, l'estudi de la seqüència de les quals mostrava diferències significatives amb els aïllats de les zones clàssicament endèmiques (Kwo i col., 1997; Zanetti i col., 1999; Pina i col., 2000). Aquests casos eren molt puntuals, però es podia descartar la influència del principal factor de risc fins el moment: el viatge a regions endèmiques. Els estudis filogenètics de les seqüències obtingudes va permetre l'agrupació de la majoria d'aquestes noves soques en un únic gran genotip, el 3, clarament diferenciat dels genotips amb soques de regions endèmiques (Schlauder i Mushahwar, 2001).

El VHE causa una hepatitis aguda auto-limitada de característiques simptomàtiques gairebé indistingibles de les causades pel virus de l'hepatitis A. La idea generalitzada de què a regions industrialitzades la infecció per VHE és gairebé inexistente fa que als centres hospitalaris d'aquestes regions no es realitzin anàlisis rutinaris destinats a la detecció del virus en els casos d'hepatitis agudes no-A no-B. A més, els sistemes de diagnòstic rutinari disponibles estan

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

basats en tècniques immunològiques amb components antigènics derivats de soques endèmiques (soques de Mèxic i Birmània, principalment) que podrien resultar poc sensibles per a la detecció de les soques de regions no endèmiques (Mast i Krawczynski, 1996).

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

- * Identificar casos clínics relacionats amb el VHE en una població (Barcelona) d'una regió considerada no endèmica pel VHE
- * Estudiar la presència de marcadors d'infecció aguda pel VHE: IgM anti-VHE i ARN viral
- * Estudiar la durabilitat de la resposta serològica generada contra el VHE
- * Caracteritzar de les soques del VHE causants d'hepatitis agudes a la població
- * Determinar de la seroprevalença del VHE en una possible població de risc: veterinaris
- * Realitzar un estudi preliminar, en un model animal, de la infectivitat i patogenicitat d'una soca del VHE autòctona d'una regió considerada no-endèmica

3.2. MATERIALS I MÈTODES

3.2.1. EL VHE COM A AGENT CAUSANT D'HEPATITIS

Els estudis clínics sobre el VHE es van realitzar en col·laboració amb el Dr. Rosend Jardí (Departament de Bioquímica) i la Dra. Maria Buti (Unitat d'Hepatologia) de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron. Col·laboradors seus van dur a terme la caracterització serològica de les mostres dels pacients.

3.2.1.1. Mostres de pacients amb possibles hepatitis agudes i/o nivells elevats d'ALT

Es va realitzar un estudi preliminar per determinar si existien casos d'hepatitis agudes causades pel VHE a l'àrea de Barcelona. Per això es van analitzar mostres de sèrum de pacients atesos al Servei d'Urgències de l'Hospital de la Vall d'Hebron i que presentaven símptomes d'hepatitis agudes i/o alts nivells d'ALT.

S'analitzaren 62 mostres de sèrum de pacients atesos durant el període comprès entre l'abril del 2000 i el març del 2001, estudiant la presència o absència d'IgG anti-VHE i de l'ARN del virus de l'hepatitis E (Taula 3.1.). Majoritàriament els pacients seleccionats havien estat diagnosticats d'hepatitis aguda. Les altres mostres pertanyien a pacients dels quals no es coneixia el diagnòstic però que presentaven alts nivells d'ALT. Les mostres es van conservar a -80°C.

Totes aquestes mostres havien estat caracteritzades prèviament a l'Hospital Vall d'Hebron. S'havia estudiat la presència d'IgG anti-VHE per ELISA (Abbott, North Chicago, IL, USA) i d'altres marcadors d'hepatitis agudes com presència d'IgM anti-VHA, de l'antigen de superfície del VHB i IgM anti-HBc, anticossos anti-VHC i la presència de l'ARN del VHC per RT-PCR (Liaison HAV IgM, Liaison HBeAg/anti-HBe i Liaison HBc IgM, Diasorin, Vercelly, Italy; Vitros HBsAg i Vitros anti-HCV, Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA; Amplicor HCV, Monitor Test Version 2.0, Roche Laboratories, New Jersey, USA).

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

Taula 3.1. Característiques de les mostres clíniques recollides entre el 2000 i el 2001 per l'estudi preliminar.

Pacient	ALT	Data	Diagnostic inicial	IgG VHE	IgM VHA	IgM VHB
1	/	Juny 2000	Hep. aguda	-	-	-
2	1614	Abril 2000	Hep. aguda	-	+	-
3	519	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
4	60	Abril 2000	Hep. aguda	-	+	-
5	452	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
6	571	Abril 2000	Hep. aguda	-	-	-
7	4236	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
8	846	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
9	19	Maig 2000	Hep. aguda	-	+	-
10	511	Abril 2000	Hep. aguda	-	-	-
11	/	juny 2000	Hep. aguda	-	-	+
12	961	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
13	1244	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	+
14	989	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
15	432	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
16	1324	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
17	2495	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
18	420	Maig 2000	Hep. aguda	+	-	-
19	436	Abril 2000	Hep. aguda	-	-	-
20	1438	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
21	134	Setembre 2000	Hep. aguda	-	+	-
22	466	Abril 2000	Hep. aguda	-	-	-
23	317	Abril 2000	Hep. aguda	-	+	+
24	483	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
25	1387	Abril 2000	Hep. aguda	-	-	-
26	452	Maig 2000	Hep. aguda	-	-	-
27	499	Abril 2000	Hep. aguda	-	-	-
28	608	Octubre 2000	Hep. aguda	-	+	-
29	170	Novembre 2000	Hep. aguda	-	+	-
30	542	Novembre 2000	Hep. aguda	-	+	-
31	7997	Novembre 2000	Hep. aguda	-	+	-

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

Taula 3.1. Característiques de les mostres clíniques recollides entre el 2000 i el 2001 per l'estudi preliminar (continuació). D.d.= diagnòstic desconegut.

Pacient	ALT	Data	Diagnostic	IgG VHE	IgM VHA	IgM VHB
32	391	Desembre 2000	Hep. aguda	-	-	-
33	364	Desembre 2000	Hep. aguda	-	+	-
34	363	Desembre 2000	D.d.	-	-	-
35	179	Desembre 2000	D.d.	-	-	+
36	247	Desembre 2000	D.d.	-	-	-
37	453	Desembre 2000	D.d.	-	+	-
38	257	Desembre 2000	D.d.	-	-	-
39	443	Desembre 2000	D.d.	+	-	-
40	745	Desembre 2000	D.d.	-	-	-
41	24	Desembre 2000	D.d.	+	-	-
42	1037	Octubre 2000	D.d.	-	-	-
43	1736	Desembre 2000	D.d.	-	-	-
44	222	Gener 2001	D.d.	-	-	-
45	229	Gener 2001	D.d.	-	-	-
46	286	Gener 2001	D.d.	-	-	-
47	536	Gener 2001	Hep. aguda	-	-	-
48	114	Gener 2001	D.d.	-	-	-
49	264	Febrer 2001	D.d.	+	-	-
50	305	Febrer 2001	D.d.	-	-	-
51	366	Febrer 2001	D.d.	-	-	-
52	413	Febrer 2001	D.d.	-	-	-
53	355	Febrer 2001	D.d.	-	-	-
54	501	Febrer 2001	D.d.	-	-	-
55	1186	Febrer 2001	D.d.	-	-	-
56	263	Febrer 2001	D.d.	-	-	-
57	551	Febrer 2001	D.d.	-	-	-
58	920	Març 2001	D.d.	-	-	-
59	572	Març 2001	D.d.	-	-	-
60	570	Març 2001	D.d.	-	-	-
61	340	Març 2001	D.d.	+	-	-
62	480	Març 2001	D.d.	-	-	-

3.2.1.2. Mostres de pacients amb hepatitis agudes i IgG anti-VHE

Es van seleccionar 11 mostres de sèrum de pacients amb els nivells d'enzims hepàtics (aminotransferases) elevats i símptomes d'hepatitis agudes als que se'ls hi havia detectat IgG anti-VHE per la tècnica EIA (enzyme immunoassay) durant la fase aguda de la malaltia (Bioelisa HEV IgG, Biokit, Barcelona, Espanya) (Taula 3.2.). S'analitzà la presència o absència del genoma del VHE per RT-PCR, així com la presència d'IgM anti-VHE com a marcador de l'hepatitis aguda (Bioelisa HEV IgM, Biokit, Barcelona, Espanya). La detecció d'IgM anti-VHE de les mostres la van dur a terme membres de l'empresa Biokit.

Aquestes mostres havien estat recollides entre gener i juny del 2003. Deu dels pacients van ser tractats a l'Hospital General de la Vall d'Hebron, mentre que un provenia d'un altre hospital de l'àrea de Barcelona (Hospital Clínic). Se'ls hi va fer un qüestionari per determinar si pertanyien a algun grup de risc pel VHE: viatge a regions endèmiques pel virus, ingestió habitual d'aliments que poguessin estar contaminats pel VHE (fruites, verdures, carn...).

Taula 3.2. Característiques dels pacients amb hepatitis agudes i IgG anti-VHE estudiats.

Pacient	Sexe	Edat (anys)	ALT (IU/ml)	Factor de risc	Hepatitis associada
63	M	44	3088	-	-
64	M	65	457	Viatge a Colòmbia	-
65	M	71	968	-	-
66	M	28	1936	-	Hepatitis A
67	F	75	1089	-	-
68	M	69	260	-	-
69	M	60	1162	Consum de carn de porc senglar	Hepatitis C
70	F	49	305	-	Hepatitis A
71	F	43	284	-	-
72	M	57	973	-	Hepatitis B
73	F	29	3675	Viatge a Etiòpia	-

M=Mascle
F= Femella

Aquestes mostres també havien estat caracteritzades pel grup del Dr. Jardí mitjançant

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

l'estudi d'altres marcadors d'hepatitis agudes, tal i com es descriu a l'apartat 3.2.1.1. Les mostres de deu d'aquests pacients van ser incorporades a l'estudi de la durada de la resposta humoral.

3.2.1.3. Mostres de sèrum d'individus d'un grup de risc: veterinaris

S'analitzaren 33 mostres de sèrum de veterinaris. Aquestes mostres van ser recollides per una infermera de l'hospital Vall d'Hebron que es va traslladar fins a la facultat de veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona aprofitant una reunió de veterinaris. Els veterinaris van signar un full de consentiment informat i van omplir una enquesta epidemiològica. Les mostres es conservaren a -80°C . A l'Hospital General Universitari Vall d'Hebron es determinà la presència o absència d'IgG anti-VHE.

3.2.1.4. Caracterització serològica de les mostres

La caracterització serològica de les mostres de sèrum va ser realitzada a l'Hospital Vall d'Hebró per col·laboradors del Dr. Rosend Jardí i la Dra. Maria Buti.

3.2.1.4.1. Detecció d'IgG anti-VHE

Inicialment es realitzà un estudi per determinar la presència d'IgG anti-VHE en mostres de sèrum de pacients amb possibles hepatitis agudes i/o elevats nivells d'ALT. La presència d'IgG anti-VHE és un marcador d'infeccions passades. També es pot considerar un marcador d'infecció aguda si va acompanyada de la presència d'IgM anti-VHE o, en cas d'absència d'aquestes, si es detecta un increment de les IgG amb disminució immediatament posterior.

La detecció de les IgG anti-VHE es va realitzar mitjançant l'ús de 2 kits immunoenzimàtics comercials: Abbott i Bioelisa HEV IgG de Biokit.

3.2.1.4.1.1. Kit Abbott HEV EIA (Abbott)

Amb aquest kit comercial es va analitzar les 62 mostres de sèrum de l'estudi preliminar per determinar la presència o absència d'anticossos IgG anti-VHE a l'àrea de Barcelona. També es va utilitzar per determinar la presència d'IgG anti-VHE a les mostres de sèrum de veterinaris,

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

que van ser analitzades 2 cops: una primera amb la dilució de mostra indicada pel proveïdor (1:400), i una segona amb una dilució inferior (1:20).

El kit Abbott HEV EIA es basa en l'ús de boles que presenten a la seva superfície l'antigen derivat de les regions ORF2 i ORF3 d'una soca del VHE d'origen birmà. L'anticòs secundari utilitzat és anti-IgG humanes conjugat amb l'enzim peroxidasa, que reacciona amb el substrat ODP. El procediment és el següent:

- Posar 10 µl de mostra o de control positiu o negatiu a un tub de 1,5 ml al que prèviament s'ha afegit 200 µl de diluent.
- Passar 10 µl d'aquesta primera dilució a la placa d'incubació i afegir 200 µl més de diluent.
- Afegir una bola (amb l'antigen adherit a la superfície) a cada pouet de la placa.
- Tapar la placa amb una làmina adhesiva i incubar 1 h a 40°C.
- Preparar el conjugat de treball diluint 1:1000 el conjugat amb el diluent del kit.
- Rentar 3 cops amb aigua destil·lada estèril.
- Afegir 100 µl del conjugat diluït.
- Tapar amb una làmina adhesiva i incubar 1 h a 40°C.
- Rentar 3 cops amb aigua destil·lada estèril.
- Passar la bola a un tub de vidre i afegir 300 µl de substrat-ODP.
- Incubar 30 min a TA.
- Parar la reacció amb 1 ml de H₂SO₄ 1 N.
- Fer la lectura de la densitat òptica a 492 nm.

Una mostra es considerava positiva si l'absorbància era superior a un valor de tall (*cut-off*) i negatives si era inferior. Aquest *cut-off* era la mitja dels valors dels controls negatius sumada a la mitja dels controls positius multiplicada per 0,45.

→ Els reactius s'havien de mantenir a 4°C i utilitzar-los a TA.

→ L'assaig es podia considerar vàlid si la diferència entre la mitja dels valors dels controls positius i la dels controls negatius era superior o igual a 0,150.

3.2.1.4.1.2. Kit Bioelisa HEV IgG (Biokit)

Amb aquest kit comercial es va estudiar la presència o absència d'anticossos IgG anti-VHE a les 11 mostres de sèrum de pacients amb nivells alts d'enzims hepàtics i hepatitis aguda

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

(pacients 63 a 73), així com a les mostres de sèrum dels veterinaris.

El kit Bioelisa HEV IgG es basa en l'ús de plaques de microtitolació recobertes amb pèptids que constitueixen epítops recombinants derivats d'una soca birmana i de la mexicana del VHE. Aquests pèptids són els mateixos que s'utilitzen a d'altres kits comercials com Genelabs. L'anticòs secundari utilitzat és anti-IgG humana conjugat amb l'enzim peroxidasa. El procediment és el següent:

- Afegir 200 µl de diluïent als pouets.
- Afegir 10 µl de control negatiu en 2 pouets, 10 µl del control positiu en 3 pouets i 10 µl de mostra en els pouets corresponents. Barrejar suaument.
- Cobrir la placa amb una làmina adhesiva i incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 30 min.
- Preparar el conjugat de treball diluint 1:1000 el conjugat amb el diluïent del kit.
- Eliminar la làmina adhesiva i aspirar el líquid dels pouets.
- Afegir 300 µl de solució de rentat diluïda. Repetir el rentat 6 cops.
- Afegir 100 µl de conjugat a cada pouet.
- Cobrir la placa i incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 30 min.
- Preparar la solució de substrat-OPD.
- Eliminar la làmina adhesiva i rentar els pouets com s'ha descrit anteriorment.
- Afegir 100 µl de substrat-OPD a cada pouet.
- Incubar durant 15 min a temperatura ambient (20-25°C).
- Afegir 50 µl d'àcid sulfúric 4N a cada pouet i barrejar suaument.
- Llegir l'absorbància a 490 nm com a màxim 30 min després d'haver parat la reacció amb l'àcid sulfúric.

Una mostra es considerava positiva si l'absorbància era superior a un valor de tall (*cut-off*), i negativa si era inferior. Aquest *cut-off* era la mitja dels valors dels controls negatius més 0,500.

- Prèviament a l'assaig calia homogeneïtzar bé els reactius i diluir la solució de rentat concentrada 1:20 amb aigua destil·lada.
- L'assaig es podia considerar vàlid si la diferència entre la mitja dels valors dels controls positius i la dels controls negatius era superior a 0,600.

3.2.1.4.2. Detecció d'IgM anti-VHE

La detecció d'IgM anti-VHE a mostres de sèrum de pacients amb hepatitis agudes la van realitzar membres del propi proveïdor Biokit seguint les especificacions del kit. Es va utilitzar el kit Bioelisa HEV IgM (Biokit, Barcelona, Espanya) que es basava en l'ús d'una proteïna recombinant dissenyada a partir de les seqüències de l'ORF2 i l'ORF3 de les soques birmana i mexicana. Les mostres analitzades van ser la dels pacients amb hepatitis agudes visitats l'any 2003 a l'hospital Universitari de la Vall d'Hebron als quals se'ls hi va detectar IgG anti-VHE (pacients 63 a 73 descrits a la Taula 3.2.).

3.2.1.5. Presència del VHE en mostres de sèrum de pacients

Els anàlisis moleculars de les mostres de sèrum es van realitzar com es descriu al capítol 2 per a les mostres ambientals. Primer es feia una extracció dels àcids nucleics presents a les mostres i una amplificació per RT-PCR niada amb encebadors específics. Les mostres que eren positives eren seqüenciades i es realitzaven estudis filogenètics amb les soques aïllades.

3.2.1.5.1. Detecció de l'ARN del VHE

3.2.1.5.1.1. Extracció dels àcids nucleics de les mostres de sèrum

El mètode seleccionat per l'extracció del àcids nucleics és el mateix que es va utilitzar per l'extracció dels àcids nucleics de les mostres ambientals, i que es descriu a l'apartat 2.2.1.4.1.

L'extracció dels àcids nucleics de les mostres de sèrum es feia directament a partir de la mostra sense necessitat de concentració prèvia. Es partia de 25 µl de sèrum i els àcids nucleics finals s'eluien en 25 µl de tampó d'elució. La fase de lisi de l'extracció de les mostres de sèrum es duia a terme a una cabina de fluxe vertical de seguretat biològica II, ja que es tractava de fluids humans.

Amb cada grup de mostres s'analitzaven un control negatiu (només partícules de sílice i tampó de lisi) i un control positiu (25 µl d'una suspensió fecal en PBS de mico *rhesus* infectat amb la soca BCN). Al final del procés es preparaven dilucions 1:10 de cada mostra amb el tampó d'elució. Aquests àcids nucleics es mantenien a -20°C fins el moment de l'anàlisi per RT-PCR.

3.2.1.5.1.2. Amplificació enzimàtica

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'aquest primer anàlisi era positiu, es procedia a analitzar una regió de l'ORF1.

Tal i com es descriu al capítol 2 (apartat 2.2.1.4.2.2.) totes les mostres van ser analitzades amb una RT-PCR seminiada per amplificar un fragment de la regió de l'ORF2. A la barreja de components s'afegien 5µl de l'extracció d'àcids nucleics, corresponent a 5 µl i 0,5 µl (extracció directa i dilució 1:10, respectivament) de sèrum. S'afegien 25 pmols dels encebadors (Taula 2.3.) i la temperatura d'anellament era de 55°C. El procés es repetia per amplificar un fragment de la regió de l'ORF1.

Cada grup de mostres s'analitzava conjuntament amb els controls negatiu i positiu de la seva extracció, així com amb un control negatiu de PCR per cada dues mostres analitzades.

Per amplificar la regió de l'ORF1 d'una de les mostres (mostra del pacient 67 amb hepatitis aguda i IgG anti-VHE) es va utilitzar una combinació d'encebadors i condicions de RT-PCR i PCR niada diferents als habituals, ja que aquests no funcionaven. En aquest cas es va utilitzar els encebadors externs habituals (HEVORF1con-a1 i HEVORF1con-s1) com a iniciadors interns (de la PCR niada) i es van seleccionar uns nous encebadors externs (Taula 3.3.). Es va partir de 10 µl d'extracció d'àcids nucleics i es van afegir 5 µl de la primera PCR a la PCR niada. La temperatura d'anellament dels 2 processos d'amplificació es va fixar en 50°C i s'incrementà el número de cicles a 40.

Taula 3.3. Encebadors utilitzats per amplificar una regió de l'ORF1 de la soca causant d'hepatitis al pacient 67.

Regió	Encebador	Reacció	Posició ^a	Mida (pb)	Seqüència (5'→3')
ORF1	546R	RT	525-546	522	GCCTCYGCRACATCRGCTGGCC
	25	1a PCR	25-44		GCCATGGAGGCCCATCAGTT
	HEVORF1con-a1	PCR niada	451-473	418	CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC ^e
	HEVORF1con-s1		56-79		CTGGCATYACTACTGCYATTGAGC ^e

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

^b R=A o G; Y= C o T

3.2.1.5.2. Seqüenciació dels fragments amplificats

Per confirmar els positius obtinguts per PCR es va procedir a seqüenciar els fragments amplificats. Tot el procés es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 2.2.1.5.

Tots els productes de PCR van ser purificats amb el kit *QIAquick PCR Purification Kit* de QIAGEN, eluint tot el purificat en 30 µl de tampó d'elució (tampó BE). A la PCR de seqüenciació s'afegiren entre 2,5 i 3 µl de purificat i 3,2 pmols de l'encebador corresponent. Per la seqüenciació dels fragments de l'ORF2 s'afegí HEVORF2con-a1 o HEVORF2con-s2 i per l'ORF1 s'afegí HEVORF1con-a2 o HEVORF1con-s2. El producte de la mostra amplificada en condicions especials va ser seqüenciat amb els encebadors HEVORF1con-a1 i HEVORF2con-s1. En aquest cas la temperatura d'anellament es fixà a 42°C.

Un cop precipitades, les seqüències van ser portades als Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona a on es procedia a l'anàlisi amb el seqüenciador automàtic ABI PRISM™ 377.

3.2.1.5.3. Anàlisi de les seqüències

Les seqüències obtingudes van ser comparades a les existents al GenBank utilitzant els mateixos programes (BLAST, CLUSTALW, Phylip i TREEVIEW 1.5) que s'havien utilitzat al capítol 2. També es van comparar amb les soques descrites a partir de mostres d'aigua residual urbana (BCN2 a BCN20).

3.2.2. ESTABILITAT DE LA RESPOSTA HUMORAL (IgG ANTI-VHE) AMB EL TEMPS

Per tal d'estudiar la durabilitat de la resposta humoral originada pel contacte amb el VHE es van analitzar mostres de seguiment de pacients amb diagnòstic d'hepatitis aguda i als quals se'ls havien detectat IgG anti-VHE. Aquests pacients van ser cridats al servei d'Urgències de l'hospital i se'ls hi va demanar una segona mostra per estudiar la durabilitat de la resposta immune generada contra el VHE.

3.2.2.1. Mostres de sèrum de seguiment

Es van estudiar 2 sèries de mostres de seguiment. Al primer grup constava de 7 mostres i el període entre la mostra inicial i la de seguiment era superior a 10 anys. Variava entre 145 mesos (12 anys i un mes) i 124 mesos (10 anys i 4 mesos). Al segon grup constava de 15 mostres i el període intermostral era d'un màxim de 3 anys i un mínim de 2 mesos. Totes les mostres provenien de pacients que havien estat visitats inicialment a l'hospital per una hepatitis aguda i als que en el seu moment se'ls hi van detectar IgG contra el VHE. Alguns d'aquests pacients es van detectar durant l'estudi preliminar i d'altres són els estudiats a l'apartat 3.2.1.2.

3.2.2.2. Detecció d'IgG anti-VHE

La determinació d'IgG anti-VHE es va fer com es descriu a l'apartat 3.2.1.4.1. Les mostres inicials i de seguiment de dels casos clínics 1 a 12 van ser analitzades mitjançant el kit HEV EIA (Abbott, North Chicago, IL, USA). Les mostres inicials i de seguiment dels casos 13 a 22 van ser analitzades amb el kit Bioelisa HEV IgG (Biokit, Barcelona, Espanya). El període intermostral i els nivells d'ALT d'aquestes mostres es recullen a la Taula 3.9.

3.2.2.3. Detecció de l'ARN del VHE a les mostres de seguiment

Totes les mostres de seguiment van ser analitzades per RT-PCR per descartar la presència del VHE. El mètode d'extracció i amplificació seleccionat per aquestes mostres de sèrum va ser el mateix que s'havia utilitzat per les mostres de sèrum descrites anteriorment (apartat 2.2.1.4). Es van extreure els àcids nucleics continguts en 25 µl de sèrum i s'analitzaren 5 µl dels àcids nucleics extrets de la dilució directa i 1:10 de cada mostra a la RT-PCR. La PCR seminiada es va fer amb 1 µl del producte de la RT-PCR. Els iniciadors utilitzats van ser els descrits a la Taula 2.3. que permetien l'amplificació d'un regió de l'ORF2. L'observació dels resultats es va fer per visualització en un gel d'agarosa amb tinció de bromur d'etidi.

3.2.3. ESTUDI DE LA INFECTIVITAT D'UNA SOCA DEL VHE AÏLLADA A BARCELONA

Es desconeixen les característiques de les infeccions causades per les soques del VHE d'origen europeu. En col·laboració amb el Dr. Purcell i la Dra. Emerson del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) dels National Institutes of Health (NIH) s'estan

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

realitzant estudis d'infectivitat d'una de les soques del VHE aïllades a Barcelona a partir d'una mostra de sèrum d'un pacient amb hepatitis aguda, la soca VH4. Els objectius inicials, i que es descriuen en aquest capítol, van ser determinar si la soca infectava micos *rhesus* i obtenir femta amb alts nivells de VHE per poder realitzar una titulació de dosi infecciosa per futurs estudis comparatius de la patogènia causada per aquesta soca respecte a soques d'altres orígens geogràfics.

3.2.3.1. Animals inoculats i inòcul

L'espècie inoculada va ser *Macaca mulatta* (micos *rhesus*). Aquesta és la espècie que es considera la més adequada com a model del VHE. Es va disposar de 2 animals: animal A i animal B. Aquests animals van ser inoculats per via intravenosa amb 500 µl de sèrum d'un pacient en fase aguda de la malaltia que contenia la soca VH4. Aquest inòcul s'havia mantingut congelat a -80°C.

3.2.3.2. Seguiment de la infecció: anàlisis bioquímics, serològics i virològics

La soca del VHE va ser inoculada per via intravenosa als 2 animals. El seguiment consistia en estudis bioquímics, serològics i moleculars:

- quantificació dels nivells de 3 enzims hepàtics (alanina aminotransferasa –ALT-, isocitrat deshidrogenasa –ICD- i γ -glutamil transferasa –GGTP-) mitjançant proves bioquímiques,
- quantificació dels nivells d'IgG antiVHE mitjançant ELISA,
- Estudis de la presència del genoma del virus a la sang i a femta mitjançant RT-PCR.

Cada animal va ser observat durant un total de 15 setmanes. Es van recollir 16 mostres de sèrum, començant pel dia 0 (inoculació) i fins a la setmana 15 post-inoculació. Les mostres de femta recollides van ser 13, començant el dia 20 post-inoculació i continuant fins a la setmana 15. Les mostres eren recollides cada 7 dies i cada setmana la mostra de femta era recollida el dia abans de l'extracció de la mostra de sèrum.

3.2.3.2.1. Anàlisis bioquímics i serològics

El seguiment serològic i bioquímic de la infecció es va fer al LID (NIH) per membres del laboratori del Dr. Purcell i la Dra. Emerson. La detecció d'IgG antiVHE es va realitzar mitjançant tècniques ELISA, amb una proteïna truncada de 55 kDa derivada de la soca pakistaní Sar55 expressada en cèl·lules d'insecte. No es va estudiar la presència d'IgM perquè la tècnica estava optimitzada per sèrum humà, disminuint la sensibilitat en sèrum animal.

3.2.3.2.2. Anàlisis virològics

Es va estudiar la presència del virus en femta i sèrum dels animals.

3.2.3.2.2.1. Mostres de sèrum

S'analitzaren 7 mostres de sèrum de cada animal, les corresponents a les setmanes 0 (inoculació) a 6. L'anàlisi es feia sense processament previ de les mostres tal i com es descriu per les mostres de sèrum humà (apartat 3.2.1.5.1.).

3.2.3.2.2.2. Mostres de femta

S'analitzaren les 13 mostres de femta de cada animal. Inicialment es prepararen suspensions de femta al 10% en PBS pH 7,3 de les 6 primeres mostres, que s'analitzaren per RT-PCR. En funció dels resultats algunes de les mostres es concentraren més mitjançant l'elució amb glicina.

3.2.3.2.2.2.1. Suspensions fecals al 10% amb PBS pH 7,3

Es van preparar suspensions fecal al 10% en PBS pH 7,3 de les 6 primeres mostres de femta (setmanes 3 a 8 post-inoculació) de cada animal.

- Posar 0,15 g de femta en un criovial de 2 ml.
- Afegir 1,5 ml de PBS 1x pH 7,3 i barrejar bé amb l'ajuda d'un vòrtex.
- Centrifugar a 2700 $\times g$ durant 3 min.
- Recollir el sobrenedant i passar-lo a un criovial net.
- Conservar a -80°C.

3.2.3.2.2.2.2. Concentració de les partícules víriques presents a les mostres de femta

Un cop analitzats els resultats de les suspensions fecals al 10% en PBS es va decidir concentrar amb glicina algunes de les mostres. Es concentraren les mostres de femta corresponents a les setmanes 5 a 16.

El mètode emprat es basa en el mètode utilitzat per concentrar les partícules víriques de les mostres d'aigua residual, però amb algunes modificacions. Aquest procés permet obtenir suspensions fecals 100 vegades més concentrades que les suspensions al 10% en PBS.

El procediment és el següent:

- Afegir 3,5 ml de glicina 0,25 N pH 9,5 a 1 g de femta i agitar amb l'ajuda d'un vòrtex durant 5 min.
- Incubar 20-30 min en gel. Agitar ocasionalment.
- Afegir 3,5 ml de PBS 2x pH 7,3.
- Centrifugar a unes 10.000 xg durant 15 min a 4°C per eliminar matèria en suspensió.
- Recuperar el sobrenedant amb les partícules víriques i concentrar-les amb una ultracentrifugació a 110000 xg durant 1 h a 4 °C.
- Eluir el pellet en 100 μ l de PBS 1x pH 7,3.
- Conservar el concentrat de partícules víriques a -80°C.

3.2.3.2.2.3. Extracció i amplificació del àcids nucleics de les mostres dels animals

Els processos d'extracció i amplificació van ser els mateixos que s'havien seguit amb les mostres d'aigua residual (apartat 2.2.1.4.). Cinc μ l de les extraccions de les dilucions directa i 1:10 de les mostres, corresponents a $5 \cdot 10^{-4}$ i $5 \cdot 10^{-5}$ g de femta per les suspensions al 10% en PBS, $5 \cdot 10^{-2}$ i $5 \cdot 10^{-3}$ g de femta pels concentrats virals i 5 μ l i 0,5 μ l de sèrum, s'analitzaren per RT-PCR. Un μ l del producte d'aquesta primera PCR es va afegir a la barreja de la PCR seminiada.

Les suspensions fecals al 10% corresponents a la setmana 4 s'analitzen fins a la dilució 1:1000. La mostra de l'animal A s'analitzà també amb els iniciadors descrits a la Taula 2.3. que permetien l'amplificació d'una regió de l'ORF1.

3.2.3.2.2.4. Seqüenciació del VHE aïllat dels animals

Per tal de confirmar que els amplicons obtinguts per RT-PCR corresponien al genoma del VHE, i més concretament a la soca inoculada VH4, es van seqüenciar 4 dels productes, 2 per cada animal (1 obtingut a partir de femta i 1 a partir de sèrum). També es van seqüenciar aquells productes de PCR obtinguts amb tamanys similars als esperats per descartar falsos negatius.

La seqüenciació es va dur a terme tal i com es va descriure anteriorment (apartat 2.2.1.5.). S'afegiren 2 µl de cada purificat a les reaccions de seqüenciació. Es van afegir els iniciadors utilitzats a la PCR seminiada a una concentració de 3,2 pmol/µl.

3.3. RESULTATS

3.3.1. EL VHE COM A CAUSANT D'HEPATITIS AGUDES

3.3.1.1. Incidència de la infecció per VHE a una població d'una zona considerada no endèmica

Inicialment es va estudiar la presència del VHE en 62 mostres de pacients visitats entre abril del 2000 i març del 2001 a l'Hospital General de la Vall d'Hebron. Aquestes mostres havien estat analitzades a l'hospital per determinar la presència d'IgG anti-VHE mitjançant l'ús del kit Abbott HEV EIA. Només 5 (8,1%) dels pacients eren seropositius pel VHE. Totes les mostres van resultar negatives per RT-PCR, descartant la presència del virus al sèrum.

Posteriorment es van seleccionar 11 pacients d'entre els visitats al mateix hospital entre gener i juny del 2003. Tots aquests pacients presentaven hepatitis aguda en el moment de la consulta, i els anàlisis serològics de les mostres de sèrum havien revelat la presència, a tots ells, d'IgG anti-VHE. En aquest cas el kit utilitzat va ser el Bioelisa HEV IgG. Dos dels pacients presentaven una hepatitis A associada, 1 presentava hepatitis B i 1 hepatitis C. Es procedí a determinar si el VHE era la causa de les diferents hepatitis agudes mitjançant l'estudi de la presència del genoma del virus a les mostres de sèrum. L'anàlisi amb els encebadors que amplificaven la regió de l'ORF2 del virus va resultar positiu en 3 de les mostres estudiades (pacients 63, 67 i 73). Quan es van utilitzar els encebadors de l'ORF1, el resultat va ser el mateix, malgrat que per l'amplificació d'una de les mostres es van haver d'utilitzar encebadors i condicions diferents a les habituals. Les altres 8 mostres van ser negatives als 2 anàlisis. La seqüenciació dels amplicons va mostrar 3 seqüències diferents del VHE.

Segons l'enquesta que se'ls hi va fer als pacients, només 3 presentaven algun factor de risc associat al VHE: un havia viatjat a Colòmbia, un altre a Etiòpia i un tercer havia consumit carn de porc senglar. El pacient que havia viatjat a Etiòpia era un dels identificats com a infectats pel VHE, ja que s'havia detectat el genoma del virus en una de les seves mostres de sèrum. Els altres 2 pacients amb hepatitis aguda per VHE no tenien cap factor de risc.

3.3.1.2. Detecció d'IgM anti-VHE en pacients amb hepatitis agudes

Es va determinar la presència d'IgM en les mostres de sèrum dels 11 pacients amb hepatitis agudes visitats al 2003 amb el kit Bioelisa HEV IgM. Només 3 de les mostres resultaren positives (pacients 63, 67 i 73). D'aquestes 3 mostres s'havia aïllat l'ARN del VHE.

3.3.1.3. Caracterització genètica de les soques aïllades

En total s'aïllaren 3 soques clíniques que van ser anomenades VH3, VH4 i VH5. L'anàlisi filogenètic d'aquestes soques es va fer comparant 101 nt del fragment amplificat de la regió ORF2 i 242 nt del fragment de la regió de l'ORF1. La comparació es va fer amb les seqüències aïllades a partir d'aigua residual de Barcelona i altres seqüències presents al GenBank. La petita longitud del fragment comparat de l'ORF2 (101 nt) no fa possible l'obtenció d'un estudi filogenètic definitiu, malgrat que la topologia dels arbres obtinguts és molt similar a l'obtinguda amb fragments més llargs. L'anàlisi del fragment de la regió de l'ORF1 (242 nt) permet uns resultats més fiables, però no s'han pogut comparar amb els aïllats ambientals.

3.3.1.3.1. ORF2

VH3 i VH4 compartien 96 dels 101 nt (95,05%) de la regió amplificada a l'ORF2, mentre que amb VH5 només compartien 80 nt (79,21%) i 85 (84,16%), respectivament (Taula 3.4.). Quan es comparaven amb d'altres soques, s'observava una agrupació diferenciada entre les 2 primeres i VH5.

Taula 3.4. Identitat entre les soques clíniques aïllades. Els valors corresponents a l'ORF1 es troben sobre la diagonal. Els de l'ORF2 es troben sota la diagonal (nt iguals (% identitat)).

Soques	VH3	VH4	VH5
VH3	-	234 (96,7)	189 (78,1)
VH4	96 (95,0)	-	186 (75,8)
VH5	85 (84,1)	80 (79,2)	-

VH3 i VH4 eren soques clarament similars a d'altres soques descrites a països desenvolupats. VH3 presentava una màxima identitat nucleotídica (100%) amb l'aïllat BCN5/13,

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

procedent de l'aigua residual de Barcelona i 97,0% amb d'altres aïllats com BCN14, BCN18 i BCN7 (Taula 3.5.). Respecte a les 2 soques clíniques detectades prèviament a Barcelona, la identitat era 95,05% amb VH1 i 93,07% amb VH2. La màxima identitat nucleotídica amb un aïllat d'altres regions va ser d'un 96,04% amb una soca grega (Grècia1) aïllada també a partir d'una mostra clínica (Taula 3.6.). VH4 era molt similar a BCN20 i BCN3 (98,0%) i a BCN18 (96,0%). Amb la soca Grècia1 compartia un 95,05% dels 101 nt, i amb VH1 i VH2 un 92,08%. Amb el control positiu utilitzat, soca BCN aïllada prèviament a Barcelona a partir d'aigua residual i molt similar a soques de la Índia, VH3 tenia un 81,19% i VH4 un 78,22%. La comparació amb altres soques està recollida a les Taules 3.5 i 3.6.

Taula 3.5. Comparació de VH3, VH4 i VH5 amb els aïllats a partir de mostres d'aigua residual de Barcelona. En gris se senyala la màxima identitat. (nt iguals (% d'identitat)).

Soques	VH3	VH4	VH5
BCN2	94 (93,1)	93 (92,1)	84 (83,2)
BCN3	97 (96,0)	98 (97,0)	83 (82,2)
BCN4	93 (92,1)	92 (91,1)	83 (82,2)
BCN5/13	101 (100)	96 (95,1)	85 (84,1)
BCN6	95 (94,0)	96 (95,1)	83 (82,2)
BCN7	98 (97,0)	93 (92,1)	82 (81,2)
BCN8	96 (95,0)	93 (92,1)	84 (83,2)
BCN9	96 (95,0)	95 (94,0)	82 (81,1)
BCN10	83 (82,2)	82 (81,2)	89 (88,1)
BCN11	97 (96,0)	96 (95,0)	81 (80,2)
BCN12	96 (95,0)	93 (92,1)	83 (82,2)
BCN14	98 (97,0)	95 (94,0)	83 (82,2)
BCN15	87 (86,1)	88 (87,1)	79 (78,2)
BCN16	95 (94,0)	92 (91,1)	81 (80,2)
BCN17	95 (94,0)	92 (91,1)	84 (83,2)
BCN18	98 (97,0)	97 (96,0)	83 (82,2)
BCN19	92 (91,1)	95 (94,0)	81 (80,2)
BCN20	97 (96,0)	98 (97,0)	82 (81,2)

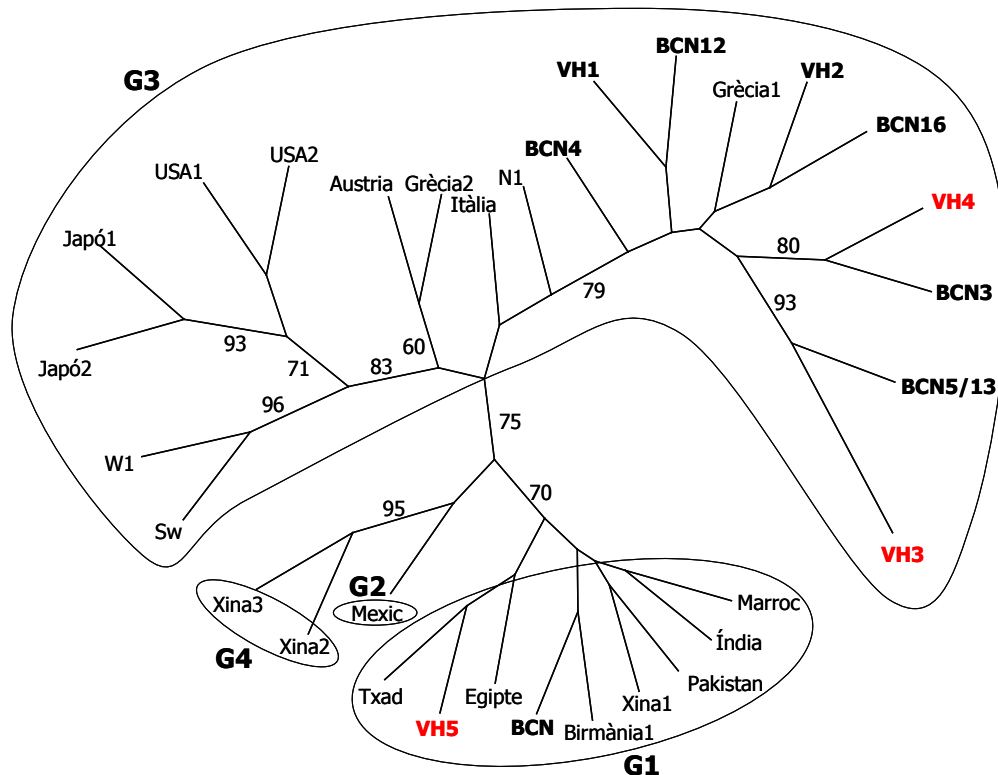
Taula 3.6. Comparació de la regió de 101 nt de l'ORF2 de les soques VH3, VH4 i VH5 amb altres soques presents als bancs de dades. En gris se senyala la màxima identitat. En cursiva es mostren les seqüències d'origen animal. (nt iguals (% d'identitat)).

Soques	VH3	VH4	VH5
VH1	96 (95,0)	93 (92,1)	85 (84,1)
VH2	94 (93,1)	93 (92,1)	83 (82,2)
Grècia1	97 (96,0)	96 (95,0)	83 (82,2)
Grècia2	87 (86,1)	82 (81,2)	84 (83,2)
Italia	85 (84,2)	83 (82,2)	79 (78,2)
Austria	84 (83,2)	80 (79,2)	86 (85,1)
N1	90 (89,1)	87 (86,1)	84 (83,2)
W1	86 (85,1)	81 (80,2)	85 (84,2)
USA1	84 (83,2)	83 (82,2)	79 (78,2)
USA2	82 (81,2)	81 (80,2)	84 (83,2)
Sw USA	87 (86,1)	82 (81,2)	86 (85,1)
Japó1	83 (82,2)	84 (83,2)	81 (80,2)
Japó2	82 (81,2)	83 (82,2)	82 (81,2)
Mèxic	79 (78,2)	80 (79,2)	84 (83,2)
Xina2	81 (80,2)	76 (75,2)	80 (79,2)
Xina3	82 (81,2)	77 (76,2)	82 (81,2)
BCN	82 (81,2)	79 (78,2)	89 (88,1)
Txad	85 (84,1)	80 (79,2)	98 (97,0)
Egipte	85 (84,1)	80 (79,2)	96 (95,0)
Birmània	83 (82,2)	80 (79,2)	89 (88,1)
Índia	82 (81,2)	81 (80,2)	91 (90,1)
Xina1	82 (81,2)	79 (78,2)	92 (91,1)
Pakistan	83 (82,2)	80 (79,2)	95 (94,0)
Marroc	81 (80,2)	80 (79,2)	89 (88,1)

VH5 s'agrupava amb soques de regions considerades endèmiques. Presentava altes identitats nucleotídiques amb una soca aïllada al Txad (soca Txad) i una d'Egipte (soca Egipte), amb un 97,03% i 95,05%, respectivament. Amb la soca Grècia1 només tenia un 82,18%, igual que amb VH2 i un 84,16% amb VH1. Amb el control positiu (soca BCN), VH5 coincidia en 89 nt (88,12%).

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

L'arbre generat al comparar les seqüències trobades amb les de la Taula 3.6. apareix a la Figura 3.1. S'observa l'agrupació de les soques VH3 i VH4 amb les altres soques d'origen clínic aïllades prèviament a Barcelona (VH1 i VH2), així com amb altres soques de regions considerades no-endèmiques pel VHE. Formen part del genotip 3. L'aïllat VH5, en canvi, s'agrupa amb soques de regions endèmiques pertanyents al genotip 1.



_10

Figura 3.1. Arbre creat pel mètode *Neighbor Joining* representant les relacions filogenètiques segons el fragment de 101 nt amplificat de la regió de l'ORF2 entre les soques causants d'hepatitis agudes a Barcelona i altres soques representants dels diferents genotips. Només es recullen els valors de bootstrap superiors a 60. En vermell apareixen les soques aïllades a Barcelona en aquest estudi.

L'obtenció de la seqüència d'aminoàcids va mostrar que VH3 i VH4 presentaven la mateixa seqüència en el fragment amplificat que VH1, VH2 i les altres soques detectades a Europa, a excepció de 4 aïllats obtinguts a partir d'aigua residual de Barcelona amb 1 aa diferent cadascun. VH5 presentava la seqüència d'aa típica de les soques del genotip 1.

	*	20	*	
VH2	:	TVKLYTSVENAQQDKGIAIPHDIDLGDSRVVIQ	:	33
VH1	:	:	33
VH3	:	:	33
VH4	:	:	33
BCN2	:	:	33
N1	:	:	33
Grècia1	:	:	33
Grècia2	:	:	33
Itàlia	:	:	33
Àustria	:	:	33
BCN9	:N.....	:	33
BCN14	:G.....	:	33
seq5/03-1	:S.....	:	33
BCN17	:E.....	:	33
W1	:T.....	:	33
Sw USA	:T.....	:	33
USA1	:T.....	:	33
USA2	:T.....	:	33
Japó1	:T.....	:	33
Japó2	:T.....	:	33
BCN15	:T.....	:	33
Xina2	:V.....E.....	:	33
Xina3	:E.....	:	33
Mèxic	:V.....	:	33
VH5	:E.....	:	33
Txad	:E.....	:	33
Egipte	:E.....	:	33
Índia	:E.....	:	33
Xina1	:E.....	:	33
Pakistan	:E.....	:	33
Marroc	:E.....	:	33
Birmània	:E.....	:	33
BCN	:E.....	:	33

Figura 3.2. Comparació de les seqüències d'aminoàcids del fragment de la regió de l'ORF2 amplificat de les soques aïllades a Barcelona i altres presents als bancs de dades i representants dels 4 grans genotips. Només s'ha afegit BCN2 en representació de tots els aïllats obtinguts a partir d'aigua residual de Barcelona i que tenen idèntica seqüència aminoacídica, a excepció de BCN9, BCN14, BCN17 i seq5/03-1. Els punts representen nucleòtid idèntic al de la primera seqüència.

3.3.1.3.2. ORF1

L'anàlisi de la seqüència del fragment de l'ORF1 va donar resultats similars als obtinguts amb la regió de l'ORF2, confirmant aquestes primeres dades (Taula 3.8.). En aquest cas es compararen 242 nt. VH3 i VH4 compartien 234 nt dels 242 comparats (96,69%), mentre que amb VH5 compartien 189 (78,10%) i 186 (76,86%), respectivament. Respecte a les altres

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

soques presents al GenBank, la màxima identitat nucleotídica de VH3 i VH4 era amb Grècia1, VH1 i VH2. VH3 presentava una identitat de 224 nt (92,56%) amb Grècia1 i VH1 i de 218 nt (90,08%) amb VH2. Per la seva banda, la seqüència de VH4 coincidia en 227 nt (93,80%) amb Grècia1, en 225 nt (92,97%) amb VH1 i en 223 nt (92,15%) amb VH2. Amb el control positiu utilitzat (soca BCN) només compartien 186 nt (76,86%) VH3 i 185 nt (76,45) VH4.

VH5 continuava essent més similar a soques de regions endèmiques, que a les europees o americanes. La màxima identitat nucleotídica la tenia amb la soca del Txad, amb 231 nt iguals (95,45%), seguit d'una soca del Marroc i una birmana amb 229 nt iguals (94,63%). Amb VH1 i VH2 només coincidia en 186 nt (76,86%) i 189 nt (78,10%) respectivament. En aquest cas la seqüència del control positiu era bastant més similar que amb VH3 o VH4, amb 228 nt (94,21%) iguals. La comparació amb altres soques està resumida a la Taula 3.8.

No va ser possible comparar la regió de l'ORF1 de les soques del VHE clíniques amb cap de les soques autòctones aïllades a partir de mostres d'aigua residual de Barcelona ja que no es va poder disposar de les seqüències d'aquestes últimes.

Taula 3.7. Intervals d'identitats nucleotídiques entre VH3, VH4 i VH5 i els diferents genotips representats per les soques seleccionades per fer els estudis filogenètics.

Genotip	VH3		VH4		VH5	
	ORF1	ORF2	ORF1	ORF2	ORF1	ORF2
Genotip I	74,8-78,1	80,2-84,2	75,2-77,7	78,2-80,2	90,5-95,4	88,1-97,0
Genotip II	74,8	78,2	76,4	79,2	80,2	83,2
Genotip III	79,7-92,6	81,2-100	80,6-93,8	79,2-97,0	71,1-78,1	78,2-85,1
Genotip IV	77,7-78,1	79,2-80,2	78,1-79,7	75,2-76,2	75,2-76,4	79,2-81,2

Taula 3.8. Comparació de la regió de 242 nt de l'ORF1 de VH3, VH4 i VH5 amb altres soques presents a les bases de dades. En gris se senyala la màxima identitat. En cursiva es mostren les seqüències d'origen animal. (nt idèntics (% identitat)).

Soques	VH3	VH4	VH5
VH1	224 (92,6)	225 (93,0)	186 (76,8)
VH2	218 (90,1)	223 (92,1)	189 (78,1)
Grècia1	224 (92,6)	227 (93,8)	188 (77,7)
Grècia2	193 (79,7)	199 (82,2)	181 (74,8)
Italia	195 (80,6)	195 (80,6)	178 (73,5)
Austria	205 (84,7)	206 (85,1)	178 (73,5)
W1	195 (80,6)	200 (82,6)	177 (73,1)
USA1	194 (80,2)	195 (80,6)	175 (72,3)
USA2	195 (80,6)	196 (81,0)	175 (72,3)
Sw USA	199 (82,2)	203 (83,9)	172 (71,1)
Japó1	199 (82,2)	202 (83,5)	182 (75,2)
Japó2	193 (79,7)	197 (81,4)	175 (72,3)
Mèxic	182 (75,2)	185 (76,4)	194 (80,2)
Xina2	189 (78,1)	193 (79,7)	182 (75,2)
Xina3	188 (77,7)	189 (78,1)	185 (76,4)
BCN	186 (76,8)	185 (76,4)	228 (94,2)
Txad	187 (77,3)	184 (76,0)	231 (95,4)
Birmània	189 (78,1)	188 (77,7)	229 (94,6)
Índia	181 (74,8)	182 (75,2)	224 (92,6)
Xina1	183 (75,6)	184 (76,0)	223 (92,1)
Pakistan	182 (75,2)	183 (75,6)	219 (90,5)
Màrroc	186 (76,8)	186 (76,8)	229 (94,6)

L'arbre obtingut al comparar les seqüències del fragment amplificat de l'ORF1 (242 nt) corroborava el generat pel fragment de l'ORF2 (101 nt), malgrat la petita longitud del segon. VH3 i VH4 s'agrupaven amb les soques de les regions industrialitzades formant el genotip 3, mentre que VH5 s'agrupava amb el genotip 1 (Figura 3.2.).

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

	*	20	*	40	*	60	*	80	
VH3	:	VRPFLSRVQTDILINLMQPRQLVFRPEVLWNHPIQRV	:	IHN	:	LEQYCRARAGRCLEVG	:	AHPRSINDNPNVLHRCFLRPVGR	: 80
VH4	:	:	:	:	: 80
Grècia1	:	:	:	:	: 80
VH1	:	:	:	:	: 80
VH2	:I.....	:	:	:	: 80
Grècia2	:T.....	:	:	:	: 80
USA1	:E.....	:	:	:	: 80
SwUSA	:E.....	:A.....	:C.....	:F.....	: 80
Japó2	:E.....	:	:	:	: 80
W1	:E.....	:	:	:	: 80
Japó1	:E.....	:	:	:	: 80
USA2	:E.....	:	:	:	: 80
Itàlia	:L.....	:E.....	:F.....	:I.....	: 80
Àustria	:E.....	:	:	:	: 80
Xina2	:L.....	:E.....	:W.....	:E.....	: 80
Xina3	:L.....	:E.....	:I.....	:	: 80
VH5	:HQ.IE.....	:F.....	:L.....	:S.....	: 80
Txad	:HQ.IE.....	:F.....	:L.....	:S.....	: 80
Marroc	:HQ.IE.....	:F.....	:L.....	:S.....	: 80
Pakistan	:HQ.IE.....	:F.....	:L.....	:S.....	: 80
Xina1	:HQ.IE.....	:F.....	:L.....	:S.....	: 80
Birmània	:HQ.IE.....	:F.....	:L.....	:S.....	: 80
BCN	:HQ.IE.....	:F.....	:L.....	:S.....	: 80
Índia	:HQ.IE.....	:F.....	:L.....	:S.....	: 80
Mèxic	:HQ.VE.....	:F.....	:L.....	:S.....	: 80

Figura 3.3. Comparació de les seqüències d'aminoàcids de les soques clíniques aïllades a Barcelona i altres presents als bancs de dades i representants dels 4 grans genotips. Els punts representen aminoàcid idèntic al de la primera seqüència.

3.3.1.4. El col·lectiu de veterinaris com a possible grup de risc

Es va estudiar la presència d'IgG anti-VHE en 33 mostres de sèrum de veterinaris. Totes les mostres van donar negatiu a l'anàlisi inicial amb una dilució de la mostra 1/400 amb el kit de Abbott. Quan la dilució es va reduir a 1/20, 2 de les mostres que abans havien resultat negatives passaren a ser positives. La seroprevalença, per tant, era d'un 6%.

Totes les mostres van ser negatives quan es van analitzar amb el kit de Biokit.

3.3.2. DURADA DE LA RESPOSTA HUMORAL CONTRA EL VHE

S'analitzaren mostres de seguiment de 7 pacients que havien estat visitats a l'hospital de la Vall d'Hebron per hepatitis agudes. Aquestes mostres de seguiment van ser recollides entre 10 i 12 anys després del diagnòstic de les hepatitis. Tant les mostres inicials com les de seguiment van ser analitzades amb el kit de la casa comercial Abbott. Cap de les mostres presentava el genoma del VHE. Només una de les mostres de seguiment, recollida 143 mesos (11 anys i 11 mesos) després de l'hepatitis aguda continuava amb nivells detectables d'IgG anti-VHE. Els altres 6 pacients presentaven nivells indetectables (Taula 3.9.).

També s'analitzaren 15 mostres de sèrum de seguiment de pacients amb hepatitis agudes visitats a l'hospital de la Vall d'Hebró entre 2 i 33 mesos (2 anys i 9 mesos) abans de la presa d'aquesta mostra. Les mostres inicial i de seguiment dels 5 primers pacients (casos clínics 8 al 12) van ser analitzades amb el kit per detectar IgG de la casa comercial Abbott. Les mostres dels altres 10 pacients van ser analitzades amb el kit Bioelisa HEV IgG. Nou d'aquests 15 pacients continuaven amb nivells d'IgG anti-VHE detectables entre 5 i 20 mesos després de l'hepatitis aguda. Els altres 6 pacients (40%) presentaven nivells d'IgG anti-VHE indetectables entre 2 i 8 mesos després de la malaltia. Cap de les mostres de seguiment presentava el genoma del VHE.

Taula 3.9. Presència d'IgG anti-VHE en mostres de sèrum de seguiment de pacients amb hepatitis agudes i IgG anti-VHE en la mostra inicial.

Cas clínic	Període intermostral	ALT		Resultat mostra de seguiment
		M. inicial	M. seguiment	
1	12 anys + 1 mes	n.d.	32	-
2	11 anys + 11 mesos	300	33	+
3	11 anys + 8 mesos	15	30	-
4	11 anys + 6 mesos	n.d.	23	-
5	10 anys + 7 mesos	806	16	-
6	10 anys + 5 mesos	1537	51	-
7	10 anys + 4 mesos	34	17	-
8	2 anys + 9 mesos	n.d.	67	-
9	1 any + 8 mesos	420	17	+
10	1 any + 1 mes	443	25	+
11	11 mesos	264	96	+
12	10 mesos	340	19	+
13	10 mesos	3088	18	+
14	10 mesos	1089	44	+
15	9 mesos	1936	20	+
16	8 mesos	260	44	-
17	8 mesos	305	17	-
18	8 mesos	3675	n.d.	+
19	5 mesos	1162	27	+
20	4 mesos	973	19	-
21	2 mesos	457	40	-
22	2 mesos	284	19	-

n.d.= no disponible.

3.3.3. ESTUDI DE LA INFECTIVITAT D'UNA SOCA DEL VHE AÏLLADA A BARCELONA

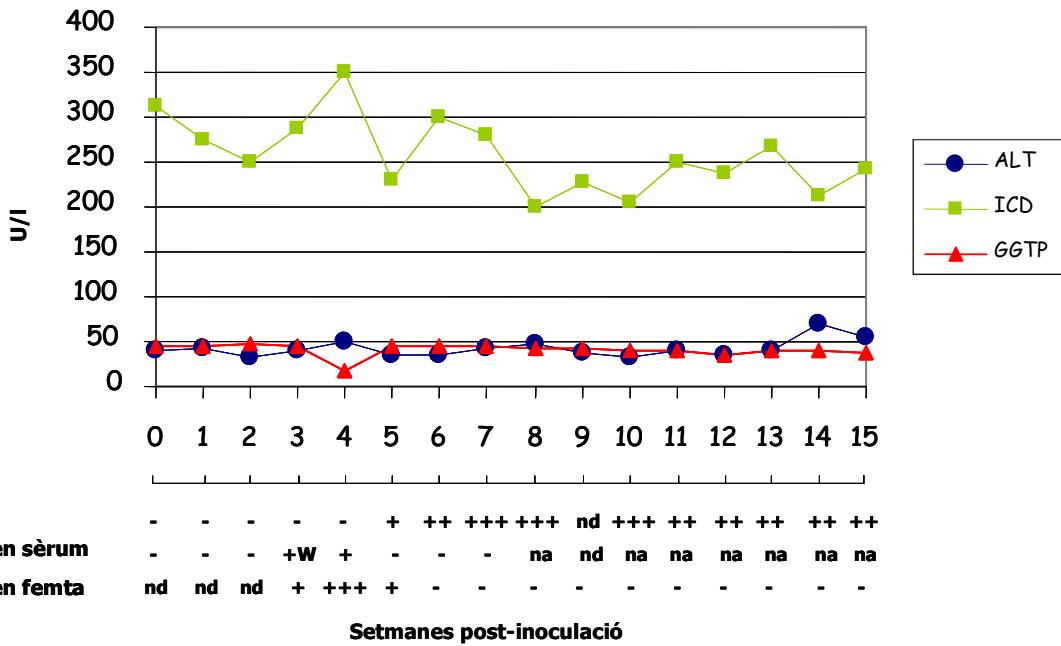
Els estudis d'infectivitat de la soca VH4 es van fer en col·laboració amb el Dr. Purcell i la Dra. Emerson del NIAID dels NIH. Ells van aportar els resultats dels anàlisis bioquímics i serològics de les mostres dels animals.

3.3.3.1. Anàlisis bioquímics, serològics i virològics

Els resultats obtinguts per cada animal es mostren a la Figura 3.4. (A i B). Breument, no s'observaren variacions en els nivells dels enzims alanina aminotransferasa i gamma glutamil transferasa. Els nivells d'isocitrat deshidrogenasa van ser molt oscil·lants durant tot el període de seguiment, amb nivells lleugerament més elevats durant les 7 o 8 primeres setmanes post-infecció. La virèmia començà a detectar-se molt lleument 2 setmanes abans de la seroconversió a l'animal A, però bàsicament es localitzà a tots dos animals durant la setmana anterior a la seroconversió, que corresponia a la setmana 5 de l'animal A i 4 del B.

L'inici de l'excreció del virus en femta no es va poder avaluar degut a la manca de mostra de les 2 primeres setmanes. Aquesta excreció es va prolongar fins el moment de la seroconversió, codetectant-se durant una setmana. Les IgG anti-VHE es van mantenir a nivells detectables durant el període de seguiment.

A)



B)

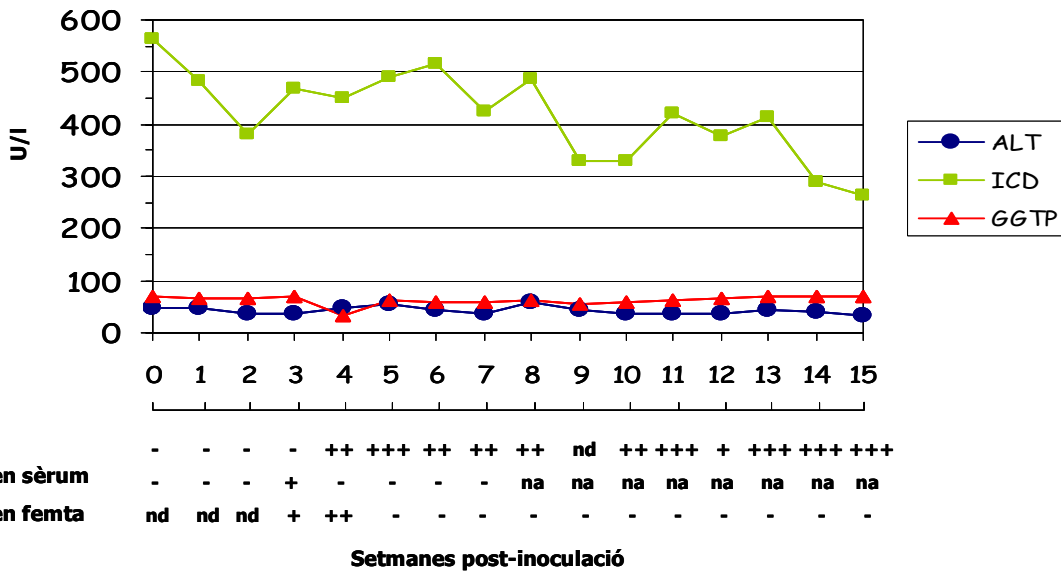


Figura 3.4. Seguiment bioquímic (ALT, ICD i GGTP), serològic (IgG anti-VHE) i virològic (ARN del VHE) de la infecció produïda per la soca clínica VH4 en 2 micos *rhesus* inoculats (A) i (B). na= no analitzat; nd= no disponible; +W= positiu feble.

3.3.3.2. Seqüenciació del VHE aïllat dels animals

Es van seqüenciar 5 productes de PCR per comprovar que la seqüència detectada corresponia a la seqüència de la soca VH4. Les mostres seqüenciades van ser: les de l'animal A corresponents a la setmana 1 i 3 de femta i 2 de sèrum, i les de l'animal B corresponents a la setmana 1 de sèrum i femta. La comparació dels fragments demostrà que les seqüències detectades en tots els casos eren idèntiques entre elles i idèntiques a VH4.

També es van seqüenciar algunes mostres que havien generat bandes de tamany similar als esperats, però cap d'elles era VHE. La seqüenciació va mostrar que eren bandes inespecífiques que no corresponien a res, o en algun cas en que la seqüenciació va donar una seqüència definida, aquesta no coincidia amb res present als bancs de dades, excepte en el fragment d'encebador.

3.4. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha estudiat la infecció del VHE en una població tradicionalment considerada lliure del virus: Barcelona. S'han obtingut dades relacionades amb la resposta immune del VHE i s'han identificat 3 casos d'hepatitis agudes causades pel VHE. S'han realitzat estudis sobre les característiques de la infecció d'una d'elles en un model animal (micòs *rhesus*).

Els països industrialitzats s'han considerat tradicionalment lliures del VHE, a on els casos detectats esporàdicament s'associaven a soques importades de regions endèmiques. Aquesta situació contrasta amb els valors de seroprevalença d'entre un 1 i un 5% obtinguts en aquests països, valors relativament alts si els individus només entren esporàdicament en contacte amb el virus (Balayan, 1997; Worm i col., 2002). Per estudiar la possibilitat de què el contacte amb soques del VHE a regions considerades no-endèmiques (com Barcelona) no fos únicament esporàdic i confirmar l'existència d'infeccions per soques del VHE autòctones, es van realitzar una sèrie d'estudis amb mostres de pacients amb afeccions hepàtiques, principalment hepatitis agudes, començant per l'estudi de la presència d'IgG anti-VHE en pacients visitats a l'Unitat d'Urgències d'un dels principals hospitals de l'àrea de Barcelona. La seroprevalença obtinguda va ser d'un 8,1%, superior a la trobada entre individus sans (5,5%) i donants de sang (2,8%) en estudis previs realitzats a Espanya (Buti i col., 1995; Mateos i col., 1999). La detecció d'anticossos tipus IgG informa de l'entrada en contacte de l'organisme amb l'antigen, en aquest cas el VHE, en algun moment però no és necessàriament indicació d'una infecció actual o recent.

Tal i com es descriu al capítol anterior, el VHE és excretat per la població de Barcelona. El nivell d'excreció observat (es va aïllar el genoma del VHE del 56,4% de les mostres d'aigua residual recollides entre juny del 2000 i juny del 2002) indica una freqüència d'infeccions a la població, probablement subclíniques, superior a la que reflexen les dades de seroprevalença. Una de les possibles causes de la baixa seroprevalença observada en regions industrialitzades, i inclús en les endèmiques, podria ser la disminució dels nivells d'IgG amb el temps. La majoria d'estudis a on s'ha realitzat el seguiment d'IgG anti-VHE al llarg del temps coincideixen en la llarga durabilitat de la resposta (alguns de fins a 14 anys). Però això no sembla ser un fet universal, ja que s'han descrit casos a on els nivells d'IgG anti-VHE han disminuït poc temps després de la infecció o fins i tot a on no hi ha hagut producció IgG contra el virus. Goldsmith i col. (1992), van observar que la meitat d'un grup de nens convalescents d'una infecció per VHE passava a presentar nivells indetectables d'IgG anti-VHE en menys de 6 mesos. Coursaget i col

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

(1994) van obtenir resultats similars fent un seguiment de pacients de 2 brots epidèmics diferents (Txad i Algèria). Tres mesos després de l'inici dels símptomes només un 44% dels individus estudiats en aquell moment (8 de 18) continuaven essent seropositius. Cal tenir en compte que en aquest cas els pèptids utilitzats en l'estudi estaven localitzats en la regió 3' de l'ORF3 de genoma del VHE. Està descrit que els tests basats en l'ús d'epítops localitzats a l'ORF3 mostren prevalències més baixes perquè els anticossos contra aquests tenen una vida mitja inferior a la dels anticossos generats contra epítops de la regió ORF2 (Ghabrah i col., 1998). Dels 22 pacients amb hepatitis agudes i IgG anti-VHE que es van seguir amb l'anàlisi d'una mostra de sèrum posterior, només 10 (45,4%) presentaven nivells d'IgG detectables en aquesta segona mostra. Tots els pacients reanaltzats més enllà de 2 anys i 9 mesos (33 mesos) després de l'hepatitis aguda presentaven nivells per sota del límit de detecció, a excepció d'un pacient que continuava amb nivells d'IgG detectables gairebé 12 anys després de la infecció. Es va observar que 5 pacients havien disminuït els nivells d'IgG anti-VHE molt ràpidament: 2 abans dels 8 mesos post-infecció, 1 abans dels 4 i 2 després de només 2 mesos. Aquestes dades confirmen que alguns dels individus que han patit infecció pel VHE poden serorevertir pocs mesos després d'aquesta, essent una de les causes de la baixa seroprevalença observada.

Una altra causa de la baixa seroprevalença obtinguda pot ser l'ús de kits de diagnòstic poc sensibles. La majoria de kits disponibles, com són els utilitzats durant aquest estudi (casa comercial Abbott i casa comercial Biokit), utilitzen antigens derivats de soques de regions endèmiques. El kit de la casa Abbott utilitza antigens procedent de les regions ORF2 i ORF3 d'una soca birmana, mentre que el kit de Biokit utilitza antigens recombinants derivats de les regions ORF2 i ORF3 d'una soca birmana i de la mexicana. Aquestes són soques responsables d'epidèmies a 2 regions considerades endèmiques pel VHE, i malgrat que no s'observen gran diferències a les seqüències d'aa respecte a les aïlades fins al moment a regions industrialitzades, de fet només es reconeix un serotip, aquestes diferències podrien disminuir la sensibilitat del diagnòstic davant les segones. També el tipus d'antigen utilitzat i la tècnica utilitzada per obtenir-lo podria ser important (Ghabrah i col., 1998). Un estudi comparatiu de 12 tests diferents realitzat amb un panell de sèrums amb mostres seropositives pel VHE, seronegatives, de primats inoculats amb soques humanes del virus, amb dilucions seriades de sèrums positius i altres tipus de mostres de sèrum va mostrar que la sensibilitat per detectar anticossos anti-VHE dels tests comparats era en general irregular i es podia considerar baixa, oscil·lant entre un 17% i un 100% (Mast i col, 1998).

El diagnòstic de la infecció pel VHE és complicat. Actualment es consideren 2 marcadors clars d'infecció aguda per VHE: presència d'IgM anti-VHE i de l'ARN del virus. Hi ha una tercera

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

circumstància que també es pot considerar com a marcador d'infecció aguda: l'increment d'IgG anti-VHE amb disminució posterior. Es van estudiar 11 mostres de pacients amb hepatitis agudes i IgG anti-VHE. Dos van ser diagnosticats d'hepatitis aguda A, 1 de B i un de hepatitis C. Els altres 7 no presentaven cap marcador d'hepatitis aguda no E. A 3 se'ls hi van detectar simultàniament IgM anti-VHE i el virus en sang, generant un diagnòstic clar d'infecció per VHE. A d'altres 3 es va observar una disminució de les IgG anti-VHE a la mostra de seguiment, indicant possibles infeccions agudes pel VHE amb increment d'IgG en la fase aguda i disminució posterior. En els casos de les infeccions tipus A, B i C no es pot descartar la coinfecció amb el VHE, ja que aquesta coinfecció pot incrementar la possibilitat de desenvolupament de la malaltia i l'aparició de complicacions (Balayan, 1997, Worm i Wirnsberger, 2004), però les IgG anti-VHE també podrien ser indicadores d'infeccions passades. La detecció simultània d'IgM anti-VHE i l'ARN del virus en 3 de les mostres suggereix que el valor diagnòstic dels dos marcadors és equivalent si la mostra és presa durant els primers dies dels símptomes. Si la mostra és recollida després de la desaparició de les alteracions bioquímiques la possibilitat de detectar virèmia és molt baixa, ja que una setmana després de l'aparició de símptomes més de la meitat dels pacients no presenten virèmia detectable i gairebé cap si els nivells enzimàtics han tornat als valors normals (Aggarwal i Krawczynski, 2000). Els nivells d'IgM són detectables en la meitat de casos un mes després de l'aparició dels símptomes (Koshy i col., 1996, Clayson i col., 1995). Com sembla ser el cas de 3 dels pacients estudiats, s'han descrit casos a on la infecció aguda ha generat un increment de les IgG durant la fase aguda amb una disminució posterior (Goldsmith i col. 1992; Worm i col., 2002b; Worm i Wirnsberger, 2004; Coursaget i col., 1994; Lok i col. 1994, Widdowson i col., 2003), essent de vegades aquest l'únic signe d'infecció aguda.

L'estudi de la seqüència de les 3 soques identificades es va dur a terme en 2 regions del genoma: ORF1 i ORF2. La tècnica d'amplificació utilitzada permetia l'obtenció d'un fragment de 101 pb de l'ORF2 i d'un de 242 pb de l'ORF1 un cop eliminades les seqüències dels encebadors. La comparació del fragment petit va mostrar que VH3 i VH4 eren molt similars entre elles i als aïllats identificats a la mateixa regió de Barcelona, com VH1 o VH2. També presentaven una alta identitat nucleotídica amb la majoria de les soques aïllades a partir d'aigua residual urbana de Barcelona, arribant al 100% en el cas de VH3 i BCN5/13, i amb una soca europea, Grècia1. VH5, pel contrari, semblava ser una soca importada ja que la màxima identitat nucleotídica era amb una soca del Txad, mentre que les soques aïllades a Barcelona més similars eren VH1 i VH3 amb un 84,1% en tots dos casos. Segons la comparació de les seqüències de 101 nt obtingudes, VH3 i VH4 probablement pertanyin al genotip 3 i VH5 al genotip 1, dos dels quatre grans genotips descrits.

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

La comparació d'un fragment més gran (242 nt) de l'ORF1 va corroborar els resultats obtinguts amb l'anàlisi de fragment de l'ORF2. VH3 i VH4 continuaven essent molt similars entre elles i amb Grècia1. VH5 també continuava presentant una alta identitat nucleotídica amb la soca Txad, amb un 95,4%. Segons aquests resultats, es confirmava la pertinença de VH3 i VH4 al genotip 3 i de VH5 al genotip 1. Els arbres filogenètics obtinguts per les 2 regions presentaven una topologia molt similar, com ja s'havia descrit prèviament. En aquest cas no es van poder comparar les soques clíniques amb les trobades a partir d'aigua residual perquè no va ser possible amplificar el fragment de l'ORF1 a partir d'aquestes, probablement pel baix títol víric trobat en aigua residual.

La classificació de les soques del VHE en genotips es fa en funció del percentatge d'identitat nucleotídica entre elles. S'ha proposat incloure seqüències amb més d'un 80% d'identitat dintre del mateix genotip. En aquest cas, i degut al tamany reduït dels fragments obtinguts, la classificació s'ha fet en funció dels 4 grans genotips descrits: genotip 1 (la majoria de soques asiàtiques i africanes), genotip 2 (soca mexicana), genotip 3 (soques americanes, europees i de països industrialitzats en general) i genotip 4 (algunes soques aïllades recentment a Xina i Japó). Existeixen altres propostes de classificació que inclouen fins a 9 genotips diferents, per separació de moltes de les soques europees en genotips diferents. Analitzant els resultats obtinguts al comparar el fragment de l'ORF2, no s'observen diferències significatives entre els valors. En canvi, en el moment en que el fragment comparat és més llarg, com els 242 nt de la regió de l'ORF1, comencen a observar-se diferències més clares entre els valors al comparar les soques de regions industrialitzades. Clarament les soques aïllades a Barcelona podrien agrupar-se en el mateix genotip que Grècia1. En canvi, l'altra soca grega, Grècia2, la italiana, les americanes i les japoneses presenten valors límits (just per sobre o per sota del 80%), indicant una possible classificació en genotips diferents si es disposés de tota la seqüència genòmica.

Existeixen diferents grups de risc pel que fa a l'increment en la possibilitat d'infecció pel VHE o en la severitat d'aquesta. Entre aquests els més freqüentment descrits a la literatura són el format per individus que hagin viatjat a regions endèmiques i dones embarassades, principalment en el tercer trimestre de gestació. També s'han descrit seroprevalències més altes en grups de pacients sotmesos a tractament d'hemodiàlisi. Amb el descobriment de la possibilitat de que alguns animals domèstics poguessin actuar com a reservoris del virus, s'ha perfilat un nou grup de risc, el de veterinaris en contacte amb aquests animals, principalment i fins al moment, amb porcs. En un estudi realitzat als EUA es trobà que els veterinaris dels 8 estats inclosos a l'estudi que treballaven en contacte amb porcs tenien 1,5 vegades més

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

possibilitats de ser seropositius pel VHE que els donants de sang (Meng i col., 2002). També a Taiwan (Hsieh i col., 1999) i a Moldàvia (Drobeniuc i col., 2001) s'obtingueren nivells més elevats d'anticossos contra el VHE entre treballadors en contacte amb porcs que els trobats entre donants (26,7% contra 8% i 51,1% contra 24,5%, respectivament). L'anàlisi de 33 mostres de sèrum de veterinaris en contacte amb porcs de l'àrea de Barcelona va donar resultats negatius: cap dels veterinaris presentava anticossos contra el virus. Només amb l'anàlisi d'una dilució inferior a l'utilitzada a l'assaig (de 1:400 a 1:20), 2 mostres passaven a ser positives. Això podria ser degut a que el *cut-off* dels kits utilitzats és molt alt perquè està dissenyat pel diagnòstic. L'estudi de seroprevalences no requereixen punts de tall tan alts. Sembla, però, que a l'àrea de Barcelona no hi ha un risc incrementat d'infecció pel VHE en el grup de veterinaris en contacte amb porcs, però aquests resultats no es poden considerar definitius, ja que el número de mostres disponibles va ser molt reduït (33 mostres). Un altre grup que també es pot considerar grup de risc pel VHE és el conjunt de treballadors en contacte amb aigua residual. Existeixen pocs estudis fets al respecte, però tenint en compte la prevalença del VHE trobada en aigua residual a Barcelona sembla que el risc d'infecció per aquests treballadors és real. Vaidya i col., (2003) van observar que mentre la seroprevalença pel VHE entre un grup de donants a la India era de 18,9%, la trobada a un grup de treballadors d'una planta de tractament d'aigua residual de la zona era d'un 56,5%.

El VHE no es multiplica eficientment en cultiu cel·lular, dificultant molt l'estudi de la infectivitat de les diferents soques aïllades. Els models utilitzats en aquests casos són animals susceptibles a la infecció per l'agent estudiat. En el cas del VHE, els models més extesament utilitzats són el primats no humans, principalment micos *rhesus* (*Macaca mulatta*) i *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*). La inoculació del virus acostuma a fer-se per via intravenosa, ja que el títol infecció en macacs és 10000 vegades més alt per aquesta via que per la oral (la via natural d'entrada) (Tsarev i col., 1994a). El model animal utilitzat en l'estudi de la soca VH4 va ser *Macaca mulatta*. Es va demostrar que la soca era infecciosa, ja que tots dos animals inoculats van patir seroconversió 4 o 5 setmanes després de l'inòcul, però no s'observaren alteracions bioquímiques. L'aparició de símptomes en aquests animals és dosi-depenent i la producció de malaltia requereix un títol 1000 vegades superior al necessari per provocar infecció (Tsarev i col., 1994b). La infecció va produir en tots 2 animals formació d'IgG anti-VHE, virèmia i excreció del virus en femta. No s'observaren símptomes de malaltia. Sembla que la severitat de la malaltia provocada depèn en certa mesura de la soca inoculada. Per exemple, estudis d'infectivitat van revelar que la soca Mex14 semblava ser més virulenta que la US-2, amb una virulència intermitja de Sar55 (Emerson i Purcell, 2003). Aquestes diferències podrien estar determinades a nivell de genotip. VH4, dintre del mateix genotip que US-2 i segons els

Capítol 3. Estudis de la infecció del VHE.

resultats obtinguts, seria també bastant atenuada. En qualsevol cas, aquests resultats d'infectivitat són totalment preliminars. La comparació entre soques només és possible si es fa un estudi comparatiu de la infectivitat amb inòculs amb els mateixos títols vírics, el que està previst portar a terme en la següent fase de l'estudi.

Són necessaris més estudis per entendre la resposta immune a llarg termini davant del VHE, ja que es desconeix la totalitat d'aquesta i no es pot descartar una resposta tardana contra epítops diferents als utilitzats en els kits actuals de diagnòstic o amb una pobre sensibilitat al fer ús d'aquests kits. Els resultats obtinguts suggereixen que s'ha de considerar l'existència de soques autòctones del VHE a zones industrialitzades causants de casos esporàdics d'hepatitis agudes, fent necessari l'anàlisi de marcadors d'infecció pel VHE a nivell clínic davant casos d'hepatitis no relacionades amb cap altre virus rutinàriament analitzat, incloent pacients sense factors de risc o historial de viatges a zones considerades endèmiques.