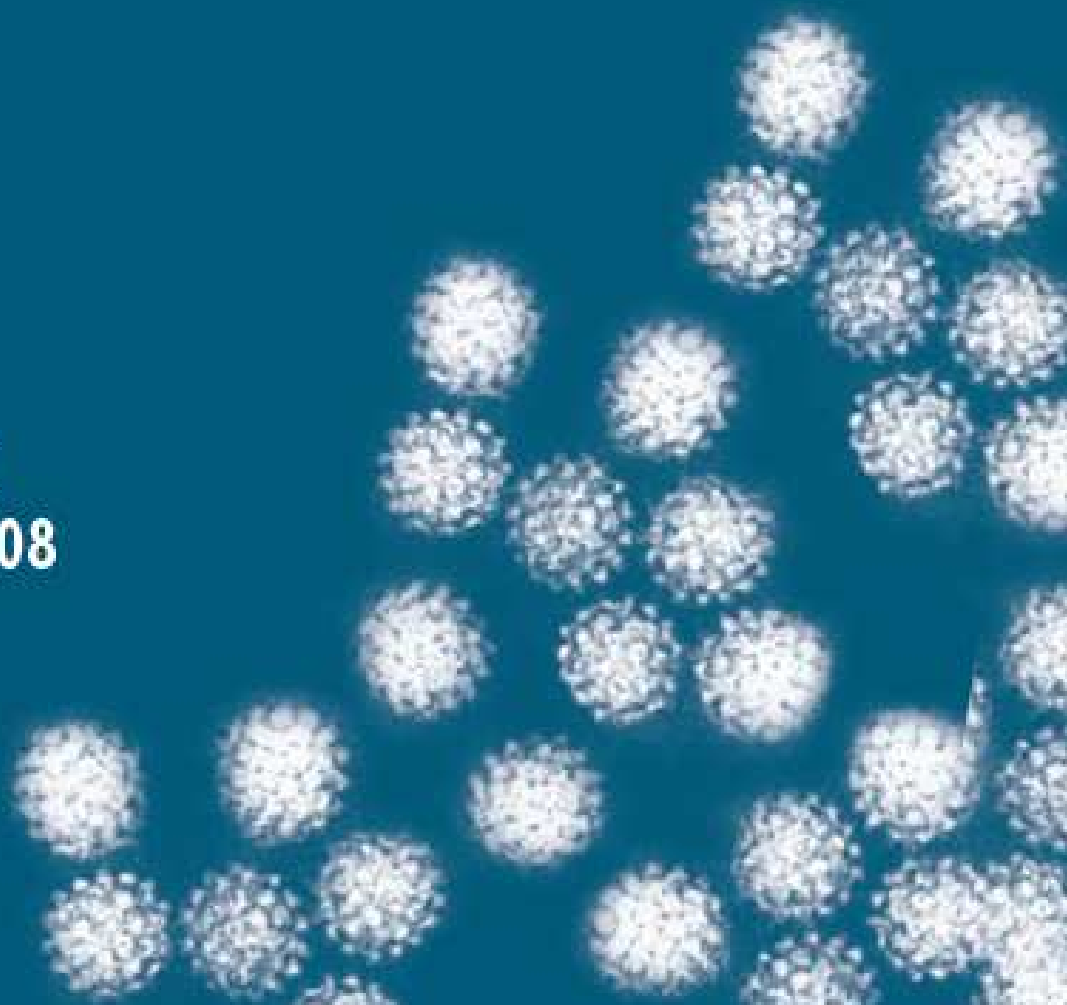


ANÀLISI DE POLIOMAVIRUS I ADENOVIRUS HUMANS COM A INDICADORS DE LA CONTAMINACIÓ VÍRICA D'ORIGEN HUMÀ EN AIGUA

Néstor Albiñana Giménez

**Tesi Doctoral
Setembre 2008**



**ANÀLISI DE POLIOMAVIRUS I ADENOVIRUS HUMANS COM A
INDICADORS DE LA CONTAMINACIÓ VÍRICA D'ORIGEN HUMÀ EN
AIGUA**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia Universitat de Barcelona

Memòria presentada per

Néstor Albiñana Giménez

per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental y Biotecnologia

Bienni: 2002-2004

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Rosina Gironés, al departament de
Microbiologia de la Universitat de Barcelona.

VP de la directora,

El doctorand,

Dra. Rosina Gironés Llop

Néstor Albiñana Giménez

Barcelona, Setembre 2008

INTRODUCCIÓ

1. Els virus com a contaminants ambientals

El medi aquàtic presenta concentracions molt variables de virus que constitueixen part de la comunitat planctònica microbiana. En zones properes a nuclis urbans el medi aquàtic rep aportacions amb elevades càrregues víriques excretades per l'home i els animals en la femta i l'orina d'individus que pateixen infeccions, de vegades asimptomàtiques. Depenent del tipus de virus, la seva supervivència pot ser més o menys llarga, segons els processos d'inactivació natural i els tractaments artificials que pateixi. Les vies de transmissió de virus presents en el medi hídic són molt diverses i es troben esquematitzades en la figura 1.

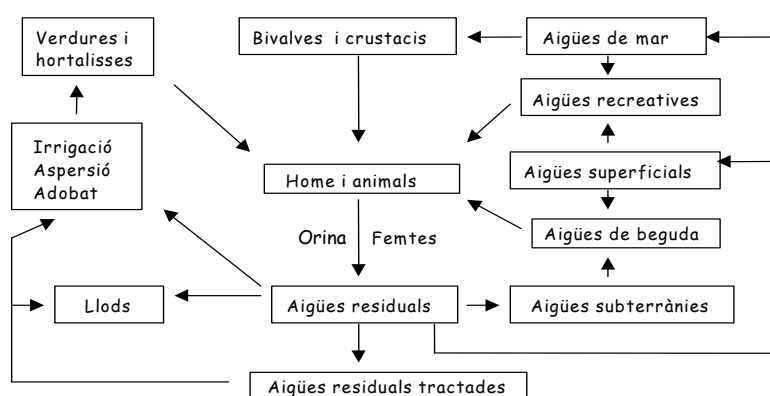


Fig. 1. Cicle de contaminació del medi hídic (Schwartzbrod, 1991).

La qualitat de l'aigua i per tant, la salut de la població es veu significativament afectada per la presència de microorganismes patògens presents a l'aigua residual crua o tractada que s'aboca a les aigües superficials. El coneixement que es té del rol de l'aigua en la transmissió d'aquests agents en el medi ambient varia; la part que es refereix a virus és menys coneguda que la de bacteries i protozous, degut sobretot a les dificultats associades a detectar aquests agents en el medi aquàtic.

Les malalties infeccioses relacionades amb l'aigua no només són una causa important de mortalitat i morbilitat a tot el món sinó que també l'espectre i la incidència d'algunes d'aquestes malalties està augmentant (WHO, 2003). La llista de microorganismes potencialment patògens transmesos per l'aigua s'incrementa cada any (AAM Report, 1996).

2. Els poliomavirus

2.1. Característiques generals

La família *Polyomaviridae* està formada per virus nus, amb càpside icosaèdrica i DNA circular de doble cadena. Els virus d'aquesta família han estat aïllats de diverses espècies, incloent humans, micos, conills, rosegadors i aus. El primer que va ser identificat fou el Poliomavirus de ratolí (PyV), al 1953 per Gross (revisat a Imperiale i Major, 2007), que amb el Virus de Simi 40 (SV40) han estat els més intensament estudiats. El nom *poliomavirus* deriva del fet que el virus de ratolí causa un espectre variat de tumors quan és inoculat en cries de ratolí. Els genomes d'alguns poliomavirus van ser els primers genomes de DNA completament seqüenciats (Friers i col. 1978).

Tots els membres de la família es caracteritzen per presentar genomes d'aproximadament 5000 pb i una organització genòmica similar. Les càpsides estan formades per una proteïna majoritària i dues altres proteïnes en menor proporció. Els diferents membres de la família comparteixen una gran part del seu genoma, cosa que demostra que descendeixen d'un ancestre comú. Fins ara se n'han identificat tretze membres.

De poliomavirus humans només se n'han identificat i caracteritzat dos: JC i BK. Ambdós van ser aïllats per primera vegada al 1971 i deuen el seu nom a les inicials dels pacients d'on es van aïllar. BK va ser identificat en l'orina d'un pacient al qual feia poc li havien fet un trasplantament de ronyó (Gardner i col. 1971). JC va ser trobat en teixit cerebral d'un pacient amb Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML) que és una enfermetat neurodegenerativa (Padgett i col. 1971).

Recentment s'han descrit diversos poliomavirus que encara no han estat classificats: el poliomavirus de Chimpanzè (Johne i col. 2005), els poliomavirus de corb i de pinsà (Johne i col. 2006), el poliomavirus d'oca (Guerin i col. 2000), el poliomavirus de mico esquiol (Verschoor i col. 2008) i el poliomavirus de cèl·lules Merkel (humà), un tipus de cèl·lula tumoral d'un tipus agressiu de càncer de pell (Feng i col. 2008). També s'han identificat dos putatius poliomavirus humans nous, ambdós aïllats del tracte respiratori, el poliomavirus KI (KIPyV) (Allander i col. 2007) i el

poliomavirus WU (WUPyV) (Gaynor i col. 2007) encara que les seves característiques patogèniques no estan encara ben definides (Norja i col. 2007).

Taula 1. Membres de la família Polyomaviridae i hostes als quals infecten. Els noms oficials de les espècies apareixen en negreta, a diferència dels noms d'espècies proposades, noms alternatius, soques o serotips (Virus Taxonomy, ICTV).

Virus	Hoste
Poliomavirus JC (JCPyV)	Humans
Poliomavirus BK (BKPyV)	Humans
Virus de la malaltia de <i>Budgerigar fledgling</i> (BFDV)	Periquito
Poliomavirus boví (BPyV)	Bovins
Poliomavirus murí neurotròpic (MPTV)	Ratolí
Poliomavirus de Kilham (KPyV)	Ratolí
Poliomavirus murí (MPyV)	Ratolí
Poliomavirus de rata atímic (ARPyV)	Rata
Poliomavirus vacuolant de ronyó de conill (RKV)	Conill
Poliomavirus de hámster (HaPV)	Hámster
Poliomavirus de mico verd africà (AGMPyV)	Mico verd africà
Poliomavirus limfotròpic B (LPyV)	Mico verd africà
Poliomavirus de mandril 2 (BPyV-2)	Mandril
Virus de simi 12 (SV-12)	Mandril
Virus de simi 40 (SV-40)	Micos <i>rhesus</i>
Virus de macac "Stump-tailed"	Micos <i>rhesus</i>
Virus fetal de ronyó de rhesus	Micos <i>rhesus</i>

2.2. Estructura

El poliomavirus presenten virions no embolcallats de 42-45 nm de diàmetre. La càpside icosaèdrica està formada per tres proteïnes estructurals: VP1, VP2 i VP3. VP1 té

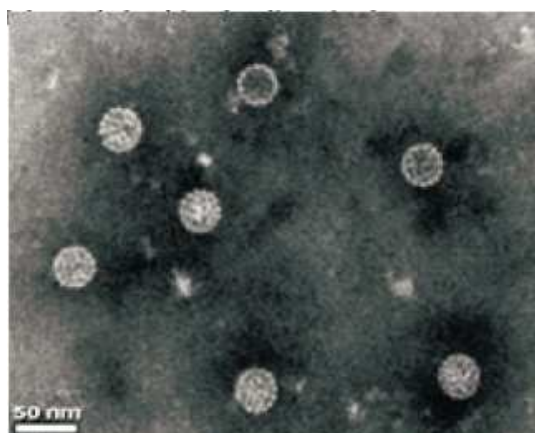


Fig. 2 Micrografia electrònica on s'observen virions del poliomavirus JC en sobrenedant de cultiu de cèl·lules SVG. Extret de Bofill-Mas i col. 2003.

un pes molecular de 70 kDa; és la majoritària, amb 360 còpies per càpside i constitueix el 70% de la massa del virió. VP2 i VP3 contribueixen amb 30-60 còpies cadascuna. L'icosaèdre és format per 72 capsòmers, cadascun format per 5 molècules de VP1 i una de VP2 o VP3. Seixanta estan coordinats hexagonalment i 12 pentagonalment (fig. 2). El fet que no tinguin embolcall fa que siguin relativament més resistents als àcids i a tractaments de calor (Imperiale, 2001). També s'ha

constatat que les partícules víriques dels poliomavirus humans són estables en aigua

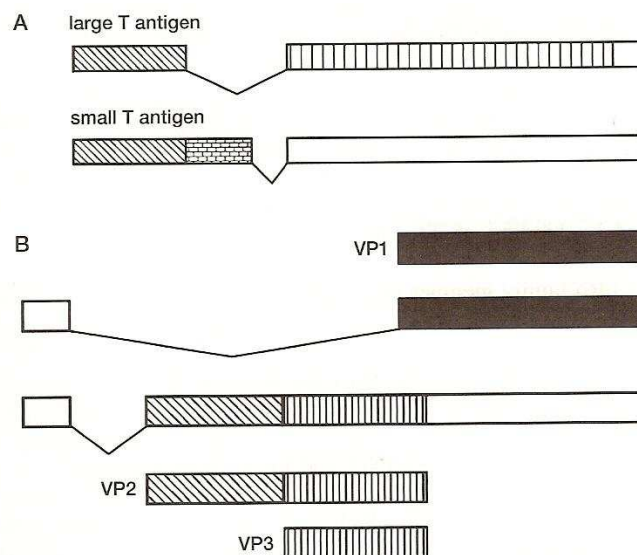
residual amb una t_{90} de 26,7 dies i una t_{99} de 61,5 dies per JCPyV i una t_{90} de 53,6 dies i una t_{99} de 96,8 dies per BKPyV a 20°C i analitzat per PCR (Bofill-Mas i col. 2001).

La càpside envolta el DNA viral de doble cadena, circular, covalentment tancat, superenrotllat d'aproximadament 5200 parells de bases. Al DNA hi ha unides les histones H2A, H2B, H3 i H4 que procedeixen de la cèl·lula hoste. Quan el virus és dins una cèl·lula, H1 també hi està unida.

La organització genòmica també està molt conservada entre els virus d'aquesta família. La informació està condensada per tal d'aprofitar al màxim l'espai. Cadascuna de les dues cadenes codifica aproximadament un 50% de la informació genètica. El genoma es troba dividit en una regió primerenca, que codifica pels antigens tumorals T i t (TAG i tAg) i una regió tardana que codifica per les proteïnes estructurals de la càpside. L'origen de replicació i els promotors primerenc i tardà es troben junts en l'anomenada Regió Reguladora (RR), d'uns 400 pb. La transcripció s'origina en aquesta regió bidireccionalment a partir d'un únic origen de replicació (ori); la regió primerenca es transcriu en sentit contrari al de la regió tardana i a partir de l'altra cadena.

La regió que codifica VP2 conté la seqüència sencera de VP3 en l'extrem C-Terminal. La regió codificant de VP1 es troba solapada a la regió C-Terminal de VP2 i VP3. Els RNAs missatgers s'originen per *splicing* alternatiu d'un únic pre-RNA missatger. La traducció de VP1 té lloc en una pauta de lectura diferent a VP2 i VP3. La seqüència que codifica les tres proteïnes constitueix la regió tardana del genoma (fig. 2).

Fig.3 Principals gens virals. **(A)** Transcrits primerencs. Els dos antigens T principals s'expressen a partir d'un mateix pre-RNA per *splicing* alternatiu. Els angles representen introns eliminats. Les caixes amb diagonals són seqüències comunes als dos antigens. La caixa quadriculada és una seqüència exclusiva del tAg. La caixa amb línies verticals és una seqüència exclusiva del TAG. **(B)** Transcrits tardans. Les tres proteïnes VP1, VP2 i VP3 s'expressen a partir de dos mRNAs. Els angles representen introns eliminats. La caixa negra representa VP1, les caixes amb diagonals són seqüències exclusives de VP2, les caixes amb línies verticals representen seqüències compartides entre VP2 i VP3. Extret de Imperiale (2001).



El TAg i el tAg conformen la regió primerenca del genoma i comparteixen l'extrem N-Terminal. Els RNAs missatgers que codifiquen aquestes proteïnes són resultat també de *splicing* alternatiu d'un únic pre-RNA missatger (fig.3) (extret de Imperiale i Major, 2007). En alguns poliomavirus, com en el murí, el que infecta conills i dos de rosegadors presenten també un antigen T mitjà (TmAg) i un de diminut (t tAg) (Riley i col. 1997).

Els poliomavirus humans i SV40 presenten una sisena proteïna anomenada agnoproteïna. Té 60-70 aminoàcids i s'acumula a la regió perinuclear durant la fase avançada del cicle infectiu. Sembla que regula negativament la transcripció i replicació del DNA viral. També està involucrada en la formació de la càpside (Sabath i Major, 2002).

2.3. Cicle biològic

El desenvolupament de la infecció es diferent segons l'espècie. En hostes permissius normalment es dona infecció lítica, mentre que en hostes no permissius hi ha un bloqueig de la replicació del virus que condueix a una infecció abortiva o a oncogènesi.

La infecció s'inicia quan el virió s'uneix específicament als receptors de la membrana cel·lular, els quals encara no es coneixen bé però hi ha estudis que suggereixen que els oligosacàrids de les glicoproteïnes i glicolípid de la membrana cel·lular actuen de receptors de les partícules víriques (Komagome i col. 2002); altres estudis documenten la unió *in vitro* de *virus like particles* (VLPs) a glicoproteïnes i glicolípid que contenen àcid siàlic (Dugan i col. 2006; Gee i col. 2006). La partícula és internalitzada per endocitosi depenent de clatrina (Pho i col. 2000; Querbes i col. 2006) i és transportada al nucli segons alguns estudis mitjançant importines cel·lulars que s'uneixen a una seqüència de localització nuclear (NLS) (Qu i col. 2004), on el DNA es desembolcalla (fig.4). No està clar el mecanisme pel qual els virions escapen de les vesícules d'endocitosi. Quan el DNA arriba al nucli, comença la transcripció dels gens primerencs.

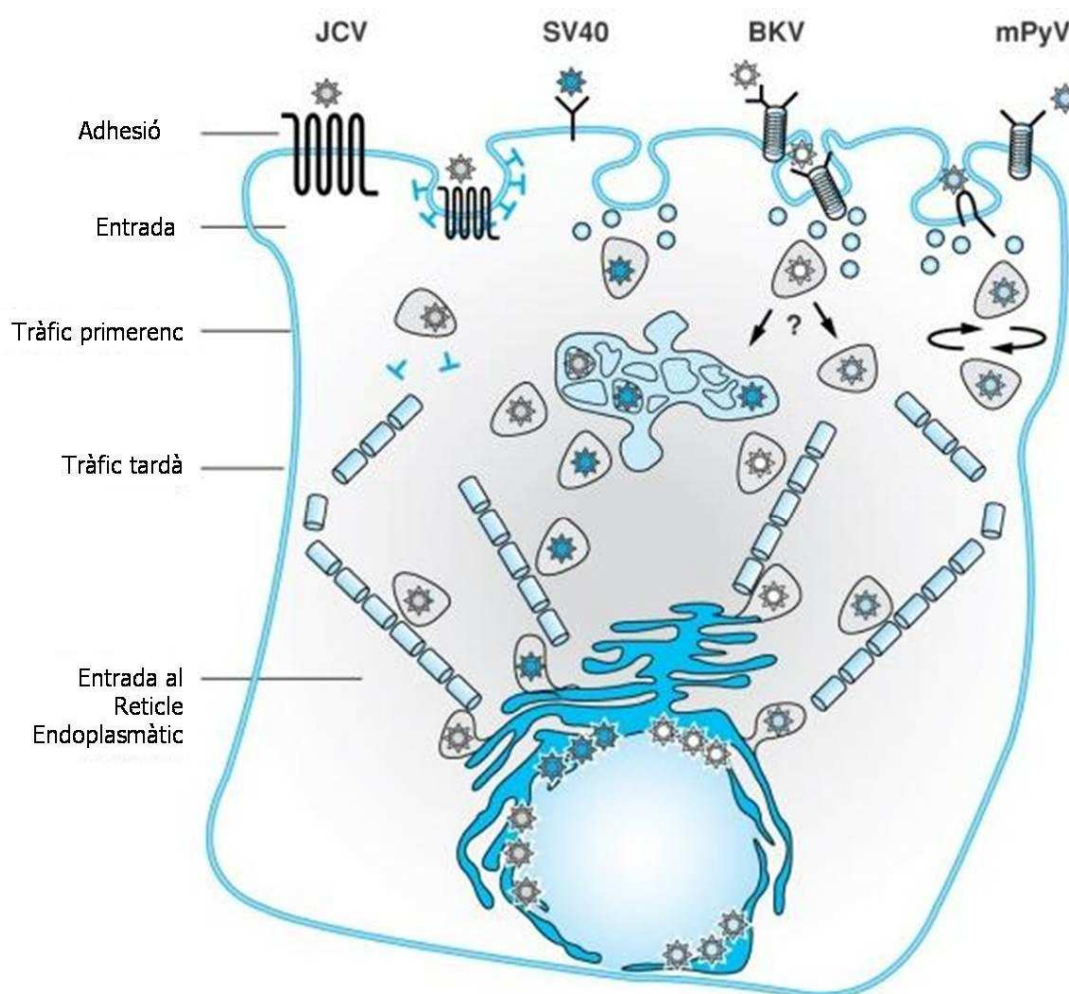


Fig. 4 Vies d'entrada usades pels poliomavirus. JC s'adhereix a àcid siàlic i després al receptor de serotonina 5HT_{2A}; això activa la fosforilació d'una proteïna desconeguda que promou l'entrada per endocitosi dependent de clatrina. Les vesícules que contenen JC s'agreguen en compartiments positius per caveolina-1. Els microtúbuls polimeritzats transporten JC a la membrana del reticle endoplasmàtic on es fusionen i s'acumulen a la membrana perinuclear. SV40 s'adhereix al gangliòsid GM1. La endocitosi mediada per clatrina forma una vesícula de pH neutre i una senyal de fosforilació permet l'entrada del virus. Les vesícules s'agreguen en els caveosomes. BK s'adhereix a àcid siàlic i gangliòsids GD1b i GT1b. La endocitosi mediada per caveoles i una senyal de fosforilació permet l'entrada del virus. La localització endosomal de BK es desconeix. MPyV s'uneix a àcid siàlic i gangliòsids GD1a i GT1b i després a integrina $\alpha 4 \beta 1$. L'endocitosi es mediada per caveoles o per un altre mecanisme independent de caveolina, clatrina i dinamina. El virus s'acumula en compartiments positius per caveolina-I i dins d'endosomes de reciclatge. Els microtúbuls polimeritzats transporten mPyV a la membrana del reticle endoplasmàtic on es produeix la fusió i la acumulació perinuclear. Extret de Imperiale i Major (2007).

Els gens primerencs dels poliomavirus humans codifiquen dues proteïnes: l'antigen T i l'antigen t petit, que es tradueixen a partir de dos mRNAs que deriven d'un mateix transcrit primari modificat per *splicing* alternatiu. Van ser anomenats així per ser els antigens dominants reconeguts pel sistema immunitari d'animals que presentaven tumors induïts per aquests virus (Black i col. 1963).

L'antigen T gran (TAg) és una fosfoproteïna nuclear d'aproximadament 700 aminoàcids en els virus de primats. Gairebé tot el que se sap d'aquesta proteïna prové dels estudis fets amb SV40. Una de les seves funcions més importants durant la fase

primerenca de la infecció és induir la cèl·lula a passar a la fase S. Ho ha de fer perquè el virus no codifica cap DNA polimerasa i per tant depèn de les de la cèl·lula hospedadora. El mecanisme pel qual actua és per la unió i inactivació de la proteïna de susceptibilitat a Retinoblastoma (pRb) i dues proteïnes de la mateixa família: p107 i p130. La inactivació provoca l'alliberament del factor de transcripció E2F que estimula la cèl·lula a transcriure gens involucrats en l'entrada a la fase S. La resposta cel·lular a aquest fenomen sol ser activar la p53 i induir l'apoptosi, però el TAg es pot unir a la p53 i inactivar-la, augmentant així la longevitat de l'hoste i assegurant una major progènie vírica. El TAg també juga un paper més directe en la replicació del DNA, actuant com a factor iniciador de la síntesi de DNA. Primer el TAg s'uneix a seqüències específiques de l'origen de replicació del DNA víric (fig. 5) i recluta la maquinària de síntesi unint-s'hi. Per altra banda, el TAg té funció helicasa i desfà la doble cadena de DNA en l'estadi d'iniciació de la síntesi.

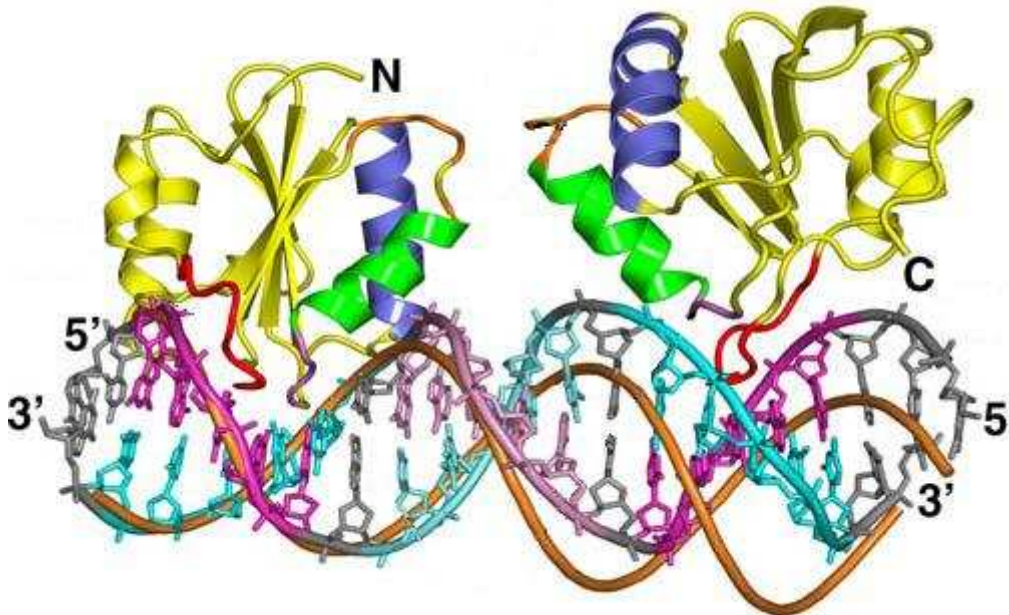


Fig. 5 Representació tridimensional de la unió de dos monòmers del T-Ag al DNA. N: extrem N-terminal de la proteïna. C: extrem C-terminal de la proteïna. La cinta taronja representa la forma idealitzada de la cadena de DNA en estat de no unió amb el T-Ag. (extret de Meinke i col. 2007).

L'antigen t petit (tAg) és una proteïna rica en cisteïna de 172 aminoàcids a JC i BK i de 174 a SV40. Els primers 80 (82 a SV40) són iguals que al TAg. Es desconeix quin paper fa *in vivo*. *In vitro* s'ha vist que s'uneix a la fosfatasa cel·lular PP2A, inhibint la seva funció. Això produeix una cascada de transducció de senyal que estimula el creixement cel·lular. Es creu que el tAg pot ser important per crear l'ambient cel·lular idoni per la replicació eficient en certes condicions.

L'antigen t mitjà (Tm Ag) només s'ha trobat en poliomavirus de rosegadors. Ha evolucionat a partir del TAg però només al llinatge dels rosegadors. Ha perdut la capacitat d'unir-se a la p53 però tot i així és important per estimular de cèl·lules a que passin a la fase S (Gottlieb i Villarreal, 2001). L'antigen t diminut (t tAg), com el mitjà, només s'ha trobat en poliomavirus de rosegadors i comprèn el domini amino-terminal del TAg extès sis residus. Es coneix molt poc de la seva activitat durant el cicle vital del virus (Riley i col. 1997).

Una vegada començada la replicació del DNA, la infecció entra en la fase tardana. Al mateix temps, el TAg estimula la transcripció dels gens tardans i reprimeix la dels gens primerencs. Es transcriu el pre-RNA missatger que donarà lloc a les proteïnes estructurals VP1, VP2 i VP3. Depenent de les espècies, l'agnoproteïna també serà traduïda. Les proteïnes són transportades al nucleoplasma on té lloc la formació de la càpside. No es coneix gaire el mecanisme d'ensamblatge de les proteïnes estructurals ni el mecanisme d'encapsidació del DNA. S'ha especulat que la cèl·lula hospedadora mor per algun mecanisme apoptòtic. El cicle replicatiu dels poliomavirus dura unes 36-44 hores (extret d'Eash i col. 2006; Imperiale, 2001 i d'Imperiale i Major, 2007).

2.4. Transmissió

L'àmplia distribució dels poliomavirus a la natura s'evidencia per la presència d'anticossos en totes les espècies susceptibles, fet que suggereix una via comú d'entrada. En el cas dels poliomavirus humans encara avui es desconeix on es produeix la infecció primària i per tant, quina és la via d'entrada, però es barallen dues teories: la via respiratòria i la via gastrointestinal. S'ha trobat BK en teixit pulmonar en un pacient de pneumònia intersticial (Sandler i col. 1997) i en el tracte respiratori i amígdals d'un altre (Goudsmit i col. 1982). JC s'ha trobat en amígdala i els limfòcits B que contenia (Monaco i col. 1998), però també s'ha trobat en diversos punts del tracte intestinal (Ricciardiello i col. 2000). També hi ha estudis que postulen una possible transmissió vertical de JC (Kunitake i col. 1995). El fet que es detecti JC i BK en grans quantitats en orina i aigua residual recolza la teoria d'una probable transmissió oral (Bofill-Mas i col. 2001).

3. El poliomavirus humà JC

3.1. Característiques generals

JC va ser aïllat per primera vegada l'any 1971 al cervell d'un pacient de PML en cultiu primari de cèl·lules glials fetals humanes (Padgett i col. 1971).

La infecció primària té lloc durant la infantesa i primera adolescència i normalment és asimptomàtica (Taguchi i col. 1982). L'excreció asimptomàtica de poliomavirus en orina (poliomavirúria) és comú durant la infecció primària i en períodes d'immunosupressió. JC s'ha detectat també en 20-80% d'orines d'individus immunocompetents, depenent de l'edat i el grup ètnic (Agostini i col. 1996; Kitamura i col. 1990; Polo i col. 2004; Rossi i col. 2007).

Fins al moment es desconeix la via d'entrada de JC a l'organisme i la seva ruta de transmissió. JC es detecta en líquid cefaloraquídi (LCR) de la majoria de malalts de PML i quasibé mai en el LCR d'individus sans.

En individus immunocompetents, JC persisteix al ronyó. També s'ha descrit en limfòcits, cervell, amígdals, pulmó, fetge, melsa, nòduls limfàtics, moll de l'os i teixits gastrointestinals (revisat a Jensen i Major, 2001). La reactivació dels virus té lloc durant períodes d'immunosupressió conduint a l'aparició de patologies com la PML.

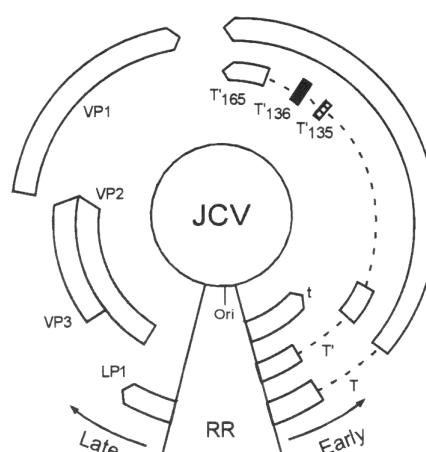


Fig. 6 Esquema de la organització genòmica de JC on apareixen la regió reguladora (RR) i les regions primenencia (*early*) i tardana (*late*), (Kim i col., 2001).

3.2. Estructura

La regió reguladora (RR) de JC és hipervariable, cosa que afecta marcadament a la capacitat de replicació del virus i al seu tropisme cel·lular (fig 6). Es pot dividir en set seccions, una que conté l'origen de replicació (ori) i unes altres sis anomenades de la *a* a la *f* formant l'estructura arquetípica d'aquesta regió (Ault i Stoner, 1993) (fig. 7). En alguns casos l'estructura arquetípica es veu modificada per duplicacions o delecions d'alguna de les seccions o part d'aquestes. Aquestes RR reorganitzades són les

comunament aïllades del cervell o de líquid cefaloraquídi de malalts de PML, és per això que s'associa reorganització amb patogènesi (Yogo i Sugimoto, 2001). D'extensos

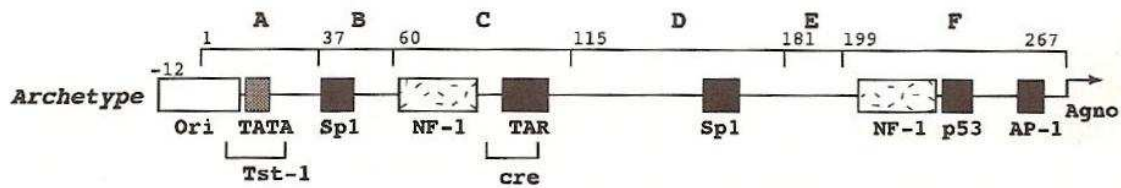


Fig. 7 Esquema de la regió reguladora de JC, que conté l'origen de replicació i sis seccions anomenades de la A a la F. Apareixen també l'origen de replicació (ori), la caixa TATA, llocs d'unió a proteïnes (Sp1, NF-1, TAR, p53, AP-1) i a factors de transcripció (Tst-1, cre) i l'origen de transcripció de l'agnoproteïna. Extret de Yogo i Sugimoto 2001.

estudis que s'han realitzat a diverses parts del món es desprèn que les soques arquetípiques són les que circulen majoritàriament entre les poblacions. S'ha demostrat que les soques reorganitzades són capaces d'infectar cultius cel·lulars mentre que les arquetípiques difícilment ho fan. Aquest fet podria ser extrapolat i es podria concloure que les soques reorganitzades infecten més eficaçment les cèl·lules glials del cervell i per això apareixen sempre relacionades amb patogènesi (Yogo i col. 1990). Es creu que els limfòcits actuen de vehicles del virus des d'òrgans perifèrics fins al sistema nerviós central. No està clar com es produeixen aquestes reorganitzacions, encara que s'han postulat diverses teories basades en errors de replicació del DNA (revisat a Yogo i Sugimoto, 2001).

La regió intergènica de JC està situada entre l'extrem C-terminal del TAg i l'extrem C-terminal de VP1. És la regió amb més variacions nucleotídiques exceptuant en alguns casos la RR.

3.3. Patologia

La Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva o PML fou descrita el 1930 per Hallervirden i posteriorment l'any 1958 per Åström (Åström i col. 1958), però no va ser associada a JC fins el 1971 per Padgett i col. En aquells moments va ser considerada una malaltia rara ja que es donava en pacients que patien malalties immunosupressives poc comunes. En l'actualitat ha guanyat importància degut a la SIDA; es considera que aproximadament un 4% de pacients de SIDA pateixen PML (Berger i Nath, 2001). És una gliopatia que afecta cèl·lules de la macroglia causant primer desmielinització i més tard degeneració d'oligodendròcits. Recentment s'ha detectat PML en alguns pacients d'esclerosi múltiple i malaltia de Crohn sota nous tractaments d'immunomoduladors (Yousry i col. 2006). Les tomografies computeritzades de cervells de malalts de PML revel·len lesions que afecten la matèria blanca. Els nuclis dels oligodendròcits

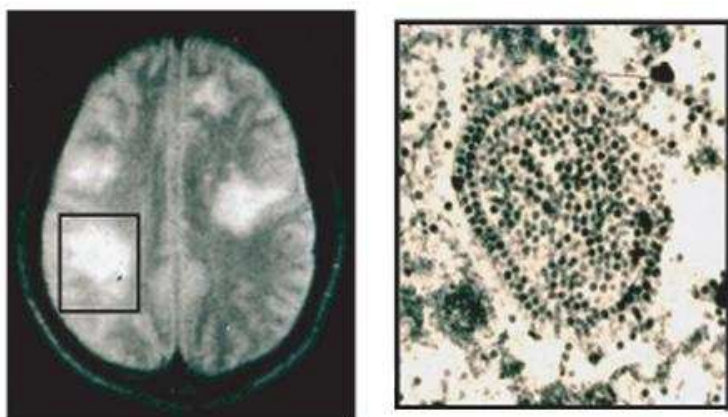


Fig. 8 Esquerra: Ressonància magnètica del cervell presentant demielinització de la matèria blanca subcortical. Dreta: Micrografia on apareixen partícules víriques allotjades al nucli d'un oligodendrocit infectat. Extret d'Imperiale i Major (2007).

apareixen deformats i per microscòpia electrònica es poden apreciar els virions de JC en aquestes cèl·lules (fig. 8). La PML provoca desmielinització en múltiples focus suggerint una dispersió del virus per via hematològica. Els símptomes inclouen debilitat, desordres motors, deficiència visual,

problemes de parla i pèrdua sensorial.

JC és un potent inductor de tumors de cervell en hámster i en primats; aquesta capacitat s'ha provat que li ve donada pel TAg. Són moltes les descripcions de tumors de cervell associats a PML, sobretot astrocitomes, limfomes de sistema nerviós central, endomiomes i gliomes. JC ha estat també relacionat amb càncer de colon per alguns laboratoris (Enam i col. 2002; Hori i col. 2005).

3.4. JC i l'origen ètnic de les poblacions

JC compleix les condicions per ésser usat com a marcador de migracions humanes (revisat a Agostini i col. 2001)

1. El virus infecta gran proporció de la població humana sense posar en risc la supervivència de l'hoste. JC és ubiqüi i la infecció primària és asimptomàtica.
2. Les mostres són fàcils d'obtenir i analitzar. Com s'ha comentat anteriorment del 20 al 80% de la població adulta excreta JC per la orina.
3. El genoma del virus és suficientment petit com per poder ser amplificat a partir d'orina en una sola reacció de PCR. El producte es pot clonar i seqüenciar.

S'han descrit un total de 8 genotips principals que difereixen 1-2,6% en les seqüències de DNA (exceptuant la RR). Aquests genotips estan associats a poblacions en regions geogràfiques específiques. La millor explicació per la distribució trobada està basada en la dispersió d'humans moderns des d'Àfrica.

A l'Àsia Predominen els genotips 2 i 7; a l'Àfrica s'ha identificat dos genotips principals, el 3 i el 6; a Europa predominen els genotips 1 i 4. Al continent nord-americà la població descendent dels colonitzadors europeus presenta sobretot els genotips 1A, 1B i 4, mentre que la població de nadius americans com els *Flathead* i els *Navaho* presenten el genotip 2A predominant sobretot a l'Àsia. És molt probable que les poblacions de nadius americans portessin aquests genotips amb ells quan van arribar a Amèrica a través de l'estret de Bering fa 12.000 anys. En la població afroamericana el genotip 3 només es troba en un 18% i estudis fets amb la població propera a Washington DC proven una elevada prevalència dels genotips 3 i 4. A les illes del Pacífic predominen genotips asiàtics com el 2 i també el genotip 8 a Papua Nova Guinea (revisat a Agostini i col. 2001).

4. El poliomavirus humà BK

4.1. Característiques generals

BK va ser aïllat per primera vegada també l'any 1971, a partir d'un cultiu en cèl·lules Vero procedent d'una mostra d'orina d'un pacient trasplantat de ronyó que patia estenosi uretèrica (Gardner i col. 1971).

La infecció primària té lloc a l'infantesa i sol ser asimptomàtica (Taguchi i col. 1982), tot i que en alguns casos pot ocasionar lleugers símptomes respiratoris o molèsties en el tracte urinari. La infecció primària provoca virèmia i el virus arriba a diversos òrgans on hi roman indefinidament en estat latent. El ronyó és el principal òrgan on BK estableix infeccions persistents. La reactivació s'associa a un estat d'immunosupressió conduint a l'excreció del virus en orina i a l'aparició de patologies. Els factors que controlen el balanç entre l'estat de latència i l'activació no es coneixen completament. S'ha descrit la reactivació de BK en orina sota una àmplia varietat de condicions, incloent l'embaràs, trasplant de ronyó, de moll de l'os, de cor, malalties immunosupressives, lupus eritematós sistèmic i teràpies immunosupressives (revisat a Moens i Rekvig, 2001). La via de transmissió encara es desconeix.

Als 3 anys un 50% de nens presenta anticossos per BK i als deu anys la majoria de la població està infectada. Les dades sobre la prevalència de BK van del 50 al 90% (Arthur i Shah, 1989).

Totes les soques de BK estudiades fins al moment es classifiquen en 4 serotips (I, II, III, IV) basats en les diferències antigèniques que presenta la regió amino-terminal de VP1. Aquesta regió codifica per un *loop* hidrofílic que està situat a la part externa de la càpside i té molta importància antigènica ja que és hipervariable. El subtipus I és el més àmpliament distribuït i I i II són habitualment detectats en mostres d'orina de dones

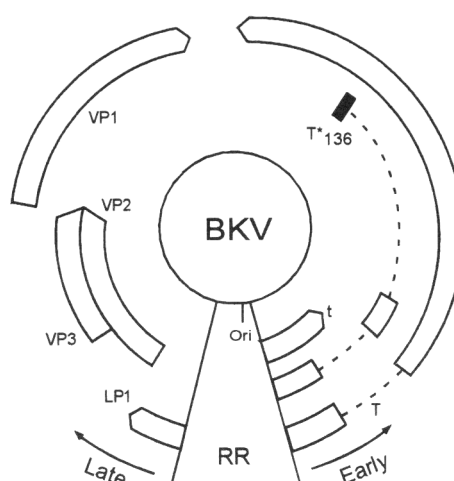


Fig. 9 Esquema de la organització genòmica de BK on apareixen la regió reguladora (RR) i les regions primerencs (*early*) i tardanes (*late*), (Kim i col., 2001).

embarassades. El fet que presenti diferenciació en serotips, cosa que no passa amb JC, podria indicar una major història evolutiva de BK en humans.

4.2. Estructura

La regió reguladora de BK (fig. 9) segueix el mateix patró que la de JC: la majoria de soques trobades en orina presenten una RR arquetípica, mentre que hi ha algunes altres soques que presenten reorganitzacions. La regió conté l'ori i 5 seccions: regió A/T, P, Q, R i LL (*Late Leader*). Es creu que les reordenacions confereixen a virus major capacitat lítica i/o transformant (revisat a Moens i Rekvig, 2001).

4.3. Patologia

BK provoca estenosi uretèrica en malalts trasplantats renals o de moll de l'os i en pacients terminals de SIDA. Es caracteritza per una proliferació de cèl·lules epitelials que condueixen a l'obstrucció dels urèters. En malalts trasplantats de moll de l'os també pot provocar cistitis hemorràgica (Hirsch i Steigner, 2003). També s'han descrit casos de cistitis hemorràgica en pacients d'HIV (Moens i Rekvig, 2001).

Alguns autors creuen que hi ha una associació clara entre BK i càncer, ja que el DNA de BK pot transformar fibroblasts embrionics i cèl·lules cultivades a partir de ronyó i cervell de ratolí, rata, hàmsster, conill i mico (Corallini i col. 1982; Tognon i col. 2003; White i Khalili, 2004). En aquests experiments, les cèl·lules en cultiu expressaven el TAg de BK al nucli. S'ha detectat BK en tumors de pàncrees, neuroblastoma rabdomiosarcoma, sarcoma de Kaposi, fetge, cervell i tracte urinari (Fioriti i col. 2005) però també en teixits normals.

5. El poliomavirus SV40

5.1. Característiques generals

Aquest virus va ser descobert arran del desenvolupament i distribució de vacunes de la polio accidentalment contaminades, exposant cents de milions de persones al virus durant els anys 1955-1961 (Shah i Nathanson, 1976). Les vacunes eren preparades en cultius primaris de cèl·lules de ronyó de micos *Rhesus*, els hosts naturals de SV40 (Shah i col. 1971). Aviat es va veure que els nens vacunats amb la vacuna contaminada excretaven virions infecciosos en orina almenys 5 setmanes després de la infecció (Melnick i Stinebaugh, 1962) i que els títols d'anticossos persistien durant un període de fins a tres anys (Gerber, 1967). Poc temps després del descobriment es va conèixer que SV40 podia induir tumors en animals i posseïa la capacitat de transformar certa varietat de tipus cel·lulars en cultiu. Els primers estudis sobre els efectes potencials de SV40 en humans no van mostrar evidències significatives de que el virus hagués causat un increment en la incidència del càncer (Strickler i Goedert, 1998).

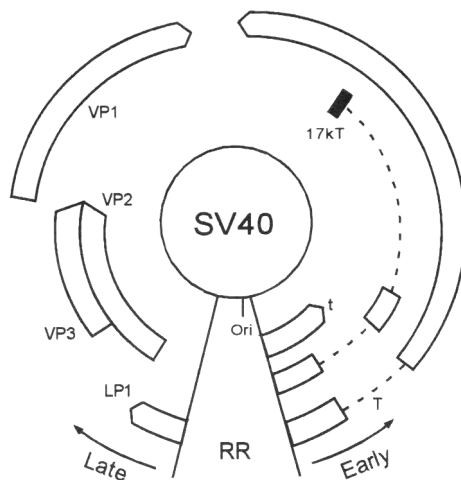


Fig. 10 Esquema de la organització genòmica de SV40 on apareixen la regió reguladora (RR) i les regions primàries (*early*) i tardanes (*late*), (Kim i col., 2001).

SV40 és un virus que infecta micos *Rhesus* de la Índia, Japó, Taiwan i Vietnam; no té hosts coneguts en altres països (Shah i col. 1971). En els hosts naturals, el virus es multiplica produint virèmia i reacció serològica. La infecció sembla benigna, s'estableix una infecció crònica latent als ronyons i és excretada en orina (Minor i col. 2003). Només s'observa patologia en micos immunodeprimits en els quals pot ocasionar PML i deficiències renals.

Hi ha estudis que descriuen la resposta humana a SV40 administrat per diferents vies. En alguns casos es va detectar presència d'anticossos en la sang dels voluntaris però en femta es va detectar en molt petites quantitats o no es va detectar. Shah i col·laboradors (1971) va fer estudis de prevalència d'anticossos en persones vacunades (20% en nens entre 12 i 14 anys) i gent que treballava amb micos (27% de prevalència).

Fins avui no hi ha dades concloents sobre la prevalència de les infeccions de SV40 en la població humana. S'han fet extensos estudis de serologia en la població humana tant de SV40 com dels poliomavirus humans, les dades obtingudes indicaven que la prevalència d'anticossos de SV40 era de 1,3-5% (Knowles i col. 2003). Tot i així s'observa reacció creuada entre els anticossos de SV40 i de BK (Viscidi i Clayman, 2006). Alguns estudis afirmen que hi ha infeccions en nens i adults: s'ha detectat SV40 en teixit neoplàsic en persones o massa joves o massa velles com per haver rebut la vacuna contaminada i s'han trobat virions a l'orina indicant que hi ha una transmissió horitzontal en humans (Martini i col. 2007), encara que aquests estudis no es consideren concloents. També s'ha descrit transmissió zoonòtica en persones que treballen en contacte amb micos durant llargs períodes de temps (Engels i col. 2004; Shah, 1966).

5.2. Estructura

El genoma de SV40 (fig. 10), d'organització similar a la dels poliomavirus humans, presenta dues regions d'elevada variabilitat. A la regió carboxi-terminal del TAG s'observen variacions puntuals, mentre que a la regió reguladora hi ha duplicacions i delecions d'una estructura a la què s'anomena arquetípica per conservar la nomenclatura emprada pels poliomavirus humans (revisat a Yogo i Sugimoto, 2001). Com en els poliomavirus humans, les reorganitzacions en la regió reguladora estan associades a major capacitat lítica (Lednický i col. 1998; Lednický i Butel, 1997).

5.3. Propietats transformants

Les propietats transformants de SV40 han estat caracteritzades en una gran varietat de tipus cel·lulars de diverses espècies incloent humans, hàmmsters, ratolins, rates, etc. La infecció de cèl·lules no permissives per SV40 de vegades resulta en integracions a l'atzar del genoma del virus en el DNA de la cèl·lula hoste. La integració del DNA de SV40 no és produeix en un lloc específic, però la regió primerenca del genoma viral es troba sempre en cèl·lules que expressen el fenotip transformant. La transformació i immortalització cel·lular son resultats secundaris d'infeccions no lítiques en les que el TAG s'expressa de manera contínua. Les cèl·lules de mico, com les provinents de ronyó de mico *rhesus* on es va aïllar per primera vegada el virus, es consideren permissives a la infecció ja que el virus infecta i es replica ràpidament produint grans quantitats de progènie i la mort cel·lular. Les cèl·lules humanes es consideren semipermissives a la infecció, la replicació es produeix en la majoria de

cèl·lules però menys eficientment i es produeixen nivells baixos de progènie infecciosa (Arrington i Butel, 2001).

Els models animals han jugat un paper important en la definició de SV40 com a un virus causant de tumors. El Dr. Eddy va ser el primer en demostrar que cèl·lules de ronyó de mico *rhesus* infectades amb SV40 induïen sarcomes en hámsters nounats en el lloc de la inoculació (Eddy i col. 1962). El consens d'aquests models animals és que SV40 és un potent agent oncogènic. L'expressió del TAg de SV40 i la seva associació amb proteïnes supressores de tumors com la p53 i la pRb en cèl·lules tumorals són factors importants a tenir en compte a l'hora de esbrinar la possible funció de SV40 en la tumorogènesi en humans (Arrington i Butel, 2001).

5.4. SV40 i càncer

L'any 1974 es va suggerir per primera vegada una associació entre SV40 i càncer (Soriano i col. 1974). Des de llavors s'han descrit associacions a diferents tipus de tumors on SV40 podria jugar un paper important (Shah, 2000). SV40 ha estat associat a mesoteliomes, diferents tipus de tumors cerebrals com ependiomes i carcinomes de plexe coroïdal, glioblastomes, meduloblastomes, meningiomes, oligodendromes, astrocitomes, papilomes, gliosarcomes i adenomes pituïtaris. A més també s'ha trobat associat a d'altres tumors i teixits no tumorals, osteosarcomes, limfomes tipus no-Hodgkin, limfomes (revisat a Arrington i Butel, 2001). Tot i l'existència d'aquests treballs, no existeixen estudis de validació inter-laboratori que confirmin els resultats ni que descriguin les característiques de les interaccions entre SV40 i les cèl·lules tumorals. La presència d'un virus en un tumor no implica necessàriament que el virus en sigui la causa.

6. Els adenovirus humans

6.1. Característiques generals

Són virus no embolcallats de 70-100 nm de diàmetre i constituïts per genoma de DNA. Tenen gran variabilitat d'hoste i s'agrupen donant lloc a la família *Adenoviridae*. Van ser aïllats originàriament a partir de teixits glandulars al 1953 per dos grups d'investigació mentre buscaven agents etiològics causants d'infeccions respiratòries agudes (Hilleman i Werner, 1954; Rowe i col. 1953), i van rebre el nom d'adenovirus degut al teixit (adenoid) del qual va ser aïllada la soca prototip. Els adenovirus es multipliquen en el tracte respiratori i intestinal, en el qual poden fer infeccions permanents i subclíniques a més d'infeccions simptomàtiques de tipus respiratori i gastrointestinal.

Fins a l'actualitat s'han descrit adenovirus en vertebrats, des de peixos fins a humans i s'han dividit en cinc gèneres: *Mastadenovirus*, aïllats de mamífers, incloent tots els adenovirus humans; *Aviadenovirus*, aïllats d'aus, *Atadenovirus*, anomenats així degut a l'alt contingut de A+T i aïllats de reptils, aus, marsupials i alguns mamífers; *Siadenovirus*, aïllats de reptils i aus i finalment un únic representant d'un nou gènere proposat aïllat d'un esturió (Berk, 2007). S'han descrit 51 serotips d'adenovirus humans classificats en sis espècies (Taula 2).

Taula 2. Classificació dels adenovirus humans, gènere *Mastadenovirus* (Berk, 2007).

Espècie	Grup d'hemaglutinació	Serotips	Potencial oncogènic	
			Tumors en animals	Transformació de cultiu cel·lular
A	IV (poca aglutinació)	12,18,31	Alt	+
B	I (completa en eritròcits de mico)	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Moderat	+
C	-III (aglutinació parcial en eritròcits de rata)	1, 2, 5, 6	Baix o cap	+
D	-II (completa en eritròcits de rata)	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	Baix o cap	+
E	III	4	Baix o cap	+
F	III	40,41	Desconegut	+

6.2. Estructura

Els adenovirus són virus no embolcallats que presenten una càpside icosaèdrica d'uns 90 nm de diàmetre, constituïda per 20 cares i 12 vèrtexs. Consta de 252 unitats estructurals anomenades capsòmers; la càpside té als vèrtex 12 pentons, de cada un

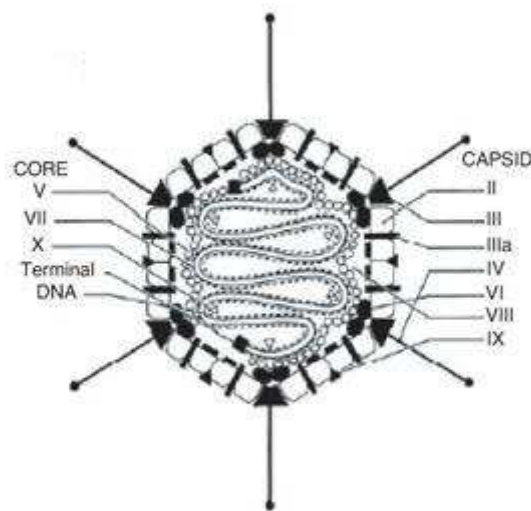


Fig. 11 Esquema de la estructura de la partícula vírica d'adenovirus, amb una càpside icosaèdrica envoltant una cadena de DNA lineal de doble cadena (Stewart i Burnett 2003).

que la seva funció podria ser la d'ancorar el nucli del virió a la càpside. La quarta proteïna del nucli és la *proteïna terminal* que està covalentment unida als extrems 5' del DNA viral. El nucli també conté aproximadament deu molècules de la proteasa viral p23 que té la funció de tallar els precursors d'algunes proteïnes virals durant l'ensamblatge i maduració de la partícula vírica (Berk, 2007).

El genoma és DNA lineal de doble cadena, de 36-38 Kb; cada cadena està flanquejada per repeticions invertides de mida variable en posició terminal (ITR). Codifica 11 pautes de lectura oberta (ORF) i es divideix en dues regions segons el moment d'expressió dels seus gens.

A la regió primerenca o *early* s'hi inclouen 5 unitats de transcripció: E1A, E1B E2, E3 i E4 i tres unitats transcripcionals primerenques retardades: IX, IVa2 i E2 *late*. La regió tardana o *late* codifica una única unitat transcripcional que es processa per generar 5 famílies de RNA missatgers: L1, L2, L3, L4 i L5, tots transcrits per la RNA polimerasa II (fig.12). Aquesta regió és l'encarregada d'expressar les proteïnes estructurals que determinaran la morfologia de la partícula vírica.

dels quals surt una fibra (Stewart i col. 1993) involucrada en les funcions d'adsorció i penetració, i per 240 hexons (fig. 11). Les proteïnes minoritàries de la càpside VIII i IX estabilitzen les unions entre els hexons. A l'interior de la càpside hi ha cinc proteïnes i el genoma viral. Els polipèptids V, VII i μ són proteïnes que contacten amb el DNA i probablement el condensen dins la càpside. El polipèptid VII és la principal proteïna de l'interior de la càpside amb més de 800 còpies per virió. El polipèptid V només s'ha trobat en mastadenovirus, es pot unir a la base dels pentons i al polipèptid VI indicant

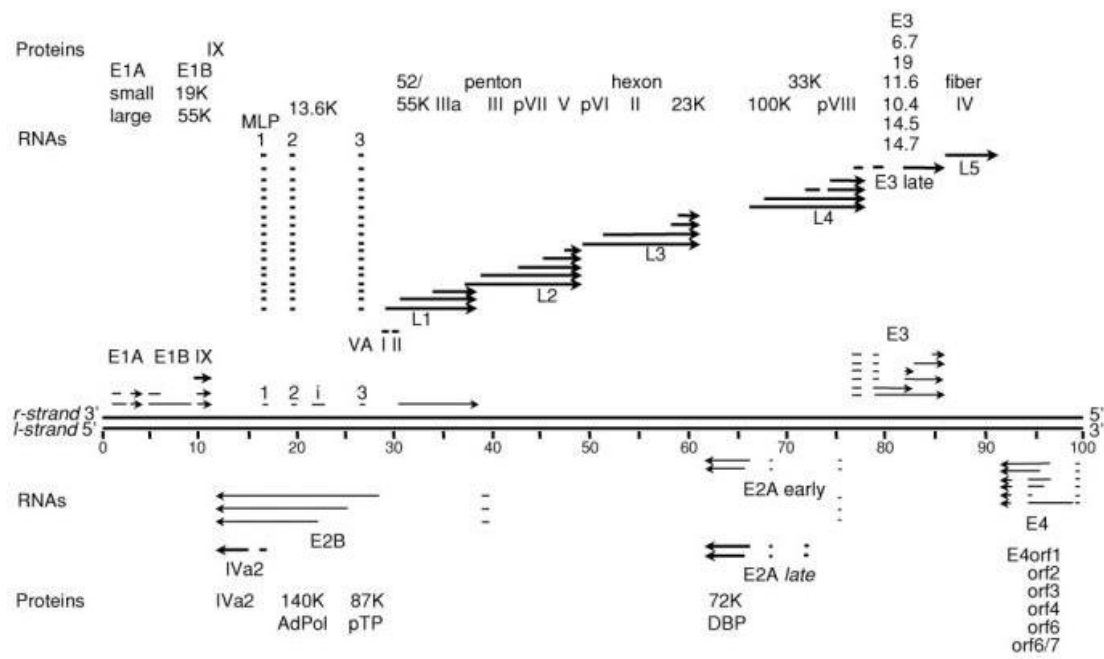


Fig. 12 Mapa de transcripció de l'adenovirus tipus 2. Els mRNA primerenques estan representats per línies primes, els mRNA tardans estan representats amb línies gruixudes i els mRNA primerenques retardats estan representats per línies mitjanes. Les puntes de fletxa representen finals 3' poliadenilats (Berk 2007).

6.3. Cicle biològic

Els estudis de la replicació dels adenovirus humans s'han centrat principalment en els Ad tipus 2 i 5, ja que són molt fàcilment cultivables al laboratori. El cicle replicatiu pot ser dividit en dues fases segons el temps d'expressió dels gens que inclou: la fase primerenca i la fase tardana.

La internalització es produeix per diversos receptors cel·lulars. La primera adsorció és mediada per la fibra que s'uneix a la membrana plasmàtica per una proteïna de la superfamília de les immunoglobulines anomenada CAR (*Coxsackie B and Adenovirus Receptor*). Seguidament els pentons interaccionen amb les integrines cel·lulars estimulants la internalització. El virus penetra a la cèl·lula per endocitosi, les vesícules cobertes de clatrina maduren cap a endosomes i les partícules víriques sense les fibres escapen al citosol. El *core* viral arriba al nucli gràcies a la interacció amb el sistema microtubular. Quan el virus arriba als porus nuclears, s'allibera el DNA viral.

Al nucli esdevé la transcripció dels gens primerenques. Els primers ORFs activats (E1A i E4) codifiquen factors i transactivadors transcripcionals que indueixen la transcripció de la resta de gens primerenques i els gens tardans. Els gens primerenques s'encarreguen d'induir la fase S cel·lular, d'activar les resistències a les defenses de

l'hoste, d'induir la síntesi de proteïnes víriques i d'inhibir la síntesi de proteïnes cel·lulars.

Durant la fase tardana del cicle replicatiu només es produeix un transcrit primari, que es tradueix en 18 proteïnes; es tracta principalment de les proteïnes estructurals que formaran la càpside del virió. Aquestes, un cop sintetitzades al citoplasma, migren cap al nucli generen el *core* i més tard la càpside (Berk, 2007).

6.4. Epidemiologia

Les infeccions per adenovirus es produeixen a tot el món. En general els serotips d'adenovirus humans no són patogènics pels animals, i els adenovirus animals són patogènics només dins l'espècie d'origen (Taylor, 2006). Les infeccions per adenovirus constitueixen el 3% de les infeccions en humans i puja al 7% si només es consideren les malalties febrils (Fox i col. 1969).

Taula 3. Infeccions provocades per adenovirus associades amb la malaltia (Wold i Horwitz, 2007).

Malaltia	Individus en risc	Serotips
Faringitis aguda	Infants, nens petits	1-3, 5-7
Febre faringoconjuntiva	Nens en edat escolar	3, 7, 14
Malaltia respiratòria aguda	Reclutes militars	3, 4, 7, 14, 21
Pneumònia	Infants, nens petits	1-3, 7
Pneumònia	Reclutes militars	4, 7
Queratoconjuntivitis	Qualsevol	8, 11, 19, 37
Síndrome <i>Pertussislike</i>	Infants, nens petits	5
Cistitis hemorràgica aguda	Nens petits	11, 21
Gastroenteritis	Infants, nens petits	40, 41
Meningoencefalitis	Nens i immunodeprimits	7, 12, 32
Hepatitis	Infants i nens hepatotransplantats	1, 2, 5
Miocarditis	Nens	?

Encara que presenten una moderada importància com a patògens, alguns serotips humans són causants d'infeccions urinàries i gastroenteritis (Serotips 39, 40, 41). Els serotips 40 i 41 pertanyen a la subespècie F i estan considerats la segona causa de gastroenteritis en infants després dels rotavirus. Altres serotips provoquen infeccions respiratòries i conjuntivitis, com el serotip 5. Alguns serotips inclosos a l'espècie B són els causants del 5-10% de les conjuntivitis i infeccions respiratòries en nens (Wold i Horwitz, 2007). El patògen respiratori més important és el serotip 7, que és capaç de causar la mort a nens immunodeprimits (Taula 3). Després de la infecció

aguda, alguns serotips d'HAdV poden ser excretats en femta durant mesos o inclús anys (Wadell i col. 1988).

L'elevada prevalència i estabilitat dels HAdV, així com el seu origen humà suggereixen que aquests resultarien uns indicadors molt útils de la presència de virus humans en l'ambient (Pina i col. 1998; Puig i col. 1994).

7. Altres virus presents en la contaminació fecal vírica a l'ambient

Hi ha molts grups de virus que infecten l'intestí humà i són excretats a l'ambient. Només alguns d'ells poden causar suficient dany per produir gastroenteritis o altra malaltia. Com són excretats en la femta, els podem trobar a l'aigua residual. Els més significatius, a part dels ja descrits en les seccions anteriors, es troben llistats a continuació.

7.1. Enterovirus

Els enterovirus, dins la família *Picornaviridae*, són virus RNA nus, icosaèdrics d'aproximadament 27 nm de diàmetre. Els virions són molt resistents als canvis de pH, però sensibles al clor i la radiació ultraviolada (Racaniello, 2007). Els enterovirus estan presents al tracte intestinal d'individus sans. La majoria d'infeccions són asimptomàtiques però algunes poden causar símptomes molt variats com paràlisi, meningitis, cardiopaties o constipats i febre. La quantitat excretada d'aquests virus no és tan alta com la dels indicadors bacterians: l'aigua residual pot contenir fins a 10^5 unitats formadores de placa (pfu)/L mentre que els coliforms totals poden assolir 10^7 cfu/100 ml (Lasobras, 1997).

La vacunació per *Poliovirus* 1, 2 i 3 inactivats ha reduït i pràcticament eliminat la presència de Poliovirus en l'ambient de moltes regions on la vacunació s'ha aplicat amb èxit.

Els *Coxsackievirus B* són freqüentment identificats, sobretot B3, B4 i B5 (Hughes i col. 1992). Els Echovirus són menys freqüentment identificats (Morris i Sharp, 1984), tot i que s'han detectat en alguns estudis (Borchardt i col. 2007; Hsu i col. 2008; Lee i Kim, 2002).

7.2. Norovirus

Els norovirus, antigament anomenats virus del tipus Norwalk, són virus RNA de cadena simple que formen el gènere *Norovirus* dins la família *Caliciviridae*. Constitueixen un grup genèticament molt divers (Phan i col. 2007). Basant-se en les comparacions entre les seqüències genètiques de la RNA polimerasa viral RNA-

dependent i de les proteïnes de la càpside, els norovirus han estat subdividits en cinc genogrupos (GI-GV). Els més importants són el GI i el GII que inclouen els norovirus més comunament trobats (Pang i col. 2005; Zheng i col. 2006). Constitueixen la principal causa de gastroenteritis viral aguda en adults a tot el món. Les vies de transmissió majoritàries són la fecal-oral i a través d'aigua i aliments contaminats (Koopmans i col. 2002). S'han produït diversos brots epidèmics que han estat molt ben documentats (Beuret i col. 2000; Borchardt i col. 2003). La partícula vírica és robusta i sobreviu a l'ambient un cop excretat (Wynn-Jones i Sellwood, 2001) però fins ara ha estat impossible de cultivar-lo eficientment, per tant s'estudia exclusivament amb mètodes moleculars. Estudis recents han aconseguit cultivar *Norovirus* en un cultiu de cèl·lules epitelials intestinals en tres dimensions (Straub i col. 2007).

Recentment s'ha descrit que certa proporció de la població té resistència genètica a la infecció de soques específiques de norovirus: una mutació en un gen fa que no excretin un antigen necessari per la infecció (Kindberg i col. 2007).

7.3. Astrovirus

Els astrovirus són els únics representants de la família *Astroviridae*, són de 28 nm de diàmetre i tenen aspecte d'estrella observats al microscòpi electrònic, amb 5 o 6 puntes (Appleton i Higgins, 1975). Han estat associats a casos esporàdics i petits brots de diarrea principalment en nens, encara que els adults també es poden veure afectats (Glass i col. 1996). Hi ha relativament pocs estudis sobre la presència d'aquests virus en l'ambient (Miagostovich i col. 2008; Riou i col. 2007). Les dades dels estudis sobre la resistència dels astrovirus en l'ambient indiquen que és comparable a la dels rotavirus i adenovirus però són més sensibles a altes temperatures (Abad i col. 1997).

7.4. Rotavirus

Els rotavirus són la major causa de gastroenteritis viral infantil. Estan classificats dins la família *Reoviridae* i són partícules víriques incosaèdriques de 75 nm de diàmetre i una triple capa de proteïnes de la càpside (Estes i Kapikian, 2007). El genoma està constituït per 11 segments de RNA de doble cadena. Els rotavirus estan classificats en serogrupos, serotips i més recentment en genogrupos. El genogrup A és el rotavirus humà més comú. Hi ha pocs estudis sobre la transmissió aquàtica d'aquests virus (Gerba i col. 1996).

Els Rotavirus causen la mort de 600.000 nens anualment en països amb baixos nivells sanitaris. Actualment existeixen dues vacunes atenuades que s'administren per via oral. Hi ha en marxa diversos programes de vacunació sobretot en països en vies de desenvolupament (www.rotavirusvaccine.org).

7.5. Virus de l'hepatitis A

El virus de la hepatitis A és l'únic representant del gènere *Hepatovirus* dins la família *Picornaviridae*. Només es coneixen set genotips i un serotip; els humans i primats no humans són els únics hosts coneguts. La majoria de les soques infecten humans i pertanyen al genotip I i III. Hi ha poques soques identificades dins els genotips IV i V. El genotip VI conté només una soca que infecta simis. És extraordinàriament resistent a baix pH i alta temperatura (Hollinger i Emerson, 2007). Hi ha hagut diversos brots, relacionats tant amb aigua com amb aliments (Ansaldi i col. 2007; Hasegawa i col. 2007; Kojouharova i col. 2006). Al 2003, el nombre total de casos d'Hepatitis A reportats al *National Notifiable Diseases Surveillance System* operats pels centres de control i prevenció de malalties va ser de 7653, amb una taxa de 2,6 casos per un milió d'habitants als EUA (CDCP, 2005).

Existeixen vacunes molt eficients, tot i que generalment només s'apliquen en poblacions de risc. A Catalunya s'ha implantat la vacunació obligatòria en pre-adolescents des del 1998.

7.6. Virus de l'hepatitis E

Recentment aquest virus ha estat reclassificat com a únic membre del gènere *Hepevirus* dins la família *Hepeviridae*. La partícula vírica és esfèrica, no embolcallada d'uns 30 nm de diàmetre (Emerson i Purcell, 2007). El virus de l'hepatitis E és la major causa d'hepatitis vírica aguda a moltes àrees d'Àsia, Àfrica i Mèxic (Bradley, 1990; Khuroo, 1980), on es considera endèmic. La malaltia és autolimitant però poden produir-se complicacions i una major mortalitat, com en el cas de les dones embarassades en el tercer trimestre, en que la mortalitat pot assolir el 20% (Balayan, 1997). Tradicionalment se l'havia considerat endèmic de països en desenvolupament però recentment se l'ha detectat circulant a països industrialitzats així com també s'han identificat casos esporàdics d'hepatitis E aguda en països industrialitzats associats a soques autòctones (Clemente-Casares i col. 2003).

8. Tècniques usades per la detecció de virus en el medi ambient

8.1 Mètodes de concentració

L'anàlisi de les aigües per la detecció de virus humans és normalment un procés en dues etapes. Els virus es troben en massa baixa concentració com per ésser detectats directament, per tant la mostra es processa per concentrar-los en volums més petits. Posteriorment es procedeix a la detecció i quantificació dels virus mitjançant una varietat de mètodes.

Les partícules víriques posseeixen polaritat i poden adsorbir-se a una gran varietat de matrius amb càrrega, les quals poden ser immòbils (com les membranes) o fluides (com la pols de vidre). Un mètode de concentració òptim ha de complir una sèrie de criteris (Wyn-Jones i Sellwood, 2001):

1. Ésser tècnicament fàcil de realitzar en curt temps.
2. Tenir una eficiència de recuperació alta.
3. Concentrar gran varietat de virus.
4. Permetre obtenir un volum final petit.
5. No ser costós.
6. Ésser capaç de processar grans volums d'aigua.
7. Ser repetible (dins un laboratori) i reproduïble (entre laboratoris).

No hi ha un únic mètode que compleixi tots aquests criteris.

A la taula 4 podem observar un resum de les tècniques de concentració, cada mètode pot tenir les seves variants.

Taula 4. Resum de les tècniques de concentració de virus en aigua. Extret de Wyn-Jones i Sellwood, 2001.

Tècnica	Mètode	Tipus de mostra	Cost
Adsorció/elució	Coixins de gasa	aigua residual o efluent de depuradora	Molt baix
	Membranes electronegatives	Qualsevol	Mitjà
	Membranes electropositives	Qualsevol	Alt
	Cartutxos electronegatius	Qualsevol amb baixa turbidesa	Baix
	Cartutxos electropositius	Qualsevol	Alt
	Llana de vidre	Qualsevol	Baix
	Pols de vidre	Qualsevol	Baix
Filtració	Membranes d'alginat	Només neta	Baix
Ultrafiltració	Membrana senzilla	Neta	Baix
	Fluxe tangencial	Tractades amb baixa turbidesa	Alt
	Fluxe en vòrtex	Tractades amb baixa turbidesa	Alt
Hidroextracció	PEG o Sacarosa	Qualsevol	Molt baix
Ultracentrifugació		Qualsevol	Alt
Altres	Floculació amb òxid fèrric	Qualsevol	Alt
	Separació bifàsica	Qualsevol	Baix
	Immunoafinitat i partícules magnètiques	Desconegut	Mitjà

Actualment els mètodes de monitorització de virus, segons la agència de protecció ambiental dels Estats Units (USEPA) es basen en el nombre total de virus cultivables enumerats per nombre més probable (TCVA-MPN) en cultiu cel·lular (Jiang, 2006) però l'avanç en tecnologies basades en l'amplificació d'àcids nucleics ha escurçat significativament el temps de detecció i ha millorat la sensibilitat de detecció de virus.

S'han publicat diversos estudis sobre la presència d'adenovirus humans a l'ambient usant mètodes de concentració i detecció molt diversos. Existeixen pocs estudis sobre els poliomavirus humans al medi ambient (Bofill-Mas i col. 2000; 2001; 2006). A la bibliografia podem trobar en canvi, nombrosos estudis sobre HAdV en plantes de tractament d'aigua residual (Girones i col. 1995; Katayama i col. 2008; Pina i col. 1998), en aigua de riu (Choi i Jiang, 2005; Haramoto i col. 2005; Miagostovich i col. 2008), en aigua de mar (Haramoto i col. 2007) i també en aigua de beguda (van Heerden i col. 2005).

8.2. Cultiu cel·lular

Per la replicació de virus són necessàries cèl·lules vives. Originalment les úniques tècniques de cultiu disponibles eren ous embrionats de gallina, animals de laboratori i voluntaris humans. A partir de la dècada dels 50 es van començar a posar a punt les tècniques de cultiu cel·lular. En virologia hi ha dos tipus de cultiu cel·lular més emprats: El cultiu primari i el cultiu en continu.

En el cultiu primari, les cèl·lules s'extreuen directament d'un animal i poden ser usades per subcultivar virus durant un temps limitat (20-50 passatges). Per tant es fa necessària la disponibilitat constant d'animals per abastar les cèl·lules necessàries. Els cultius primaris de cèl·lules de ronyó de mico s'usen habitualment perquè permeten la replicació de molts virus humans i van ser usat rutinàriament per la detecció de virus entèrics a l'ambient.

El cultiu en continu consisteix en usar línies cel·lulars contínues pel cultiu de virus. Les línies cel·lulars contínues també deriven d'animals o humans però poden ser subcultivades indefinidament. Poden provenir de teixits normals o cancerosos.

Desafortunadament no tots els virus animals creixen en la mateixa línia cel·lular, i altres com NoV només recentment s'ha aconseguit que es reproduïxin en cultiu. Els virus necessiten receptors específics per la unió i la seva replicació dins la cèl·lula hoste.

Les tècniques més usades per la detecció i quantificació de virus per cultiu cel·lular són els mètodes basats en l'observació de l'efecte citopàtic (CPE) com comptatge de les unitats formadores de placa (PFU). Els efectes citopàtics són canvis observables en les cèl·lules hoste com a resultat de la replicació vírica. Aquests canvis poden ser observats com canvis de morfologia o la formació de forats en la monocapa cel·lular. No tots els virus produeixen CPE durant la seva replicació en una determinada línia cel·lular, en aquests casos s'han d'emprar altres tècniques per la seva detecció com la PCR o assajos immunològics.

Per la quantificació dels virus per CPE es pot usar el TCID₅₀ (dosi infectiva en cultiu cel·lular) o la dilució més alta de suspensió vírica capaç de produir CPE en el 50% dels flascons de cultiu cel·lular. L'altre mètode és el nombre més probable (MPN) similar a l'usat en el comptatge de bacteries.

Alguns virus, com els enterovirus i algunes espècies d'adenovirus, produeixen plaques de lisi en monocapes cel·lular. Aquestes plaques s'originarien a partir d'una única partícula vírica infecciosa, permetent així contar les unitats formadores de placa o PFUs (extret de Josephson i col. 2000).

Els mètodes actuals de monitorització de virus en mostres d'aigua segons la USEPA estan basats en el nombre total de virus cultivables enumerats per nombre més probable. La línia cel·lular usada difereix per cada virus o inclús pot variar en l'estudi d'un mateix virus, ja que soques diferents poden créixer en línies cel·lulars diferents (Jiang, 2006).

El cultiu cel·lular no és 100% efectiu en detectar totes les partícules víriques que poden ser observades al microscopi electrònic pel fet que no totes les partícules són infeccioses ni totes les partícules infeccioses arriben a infectar la cèl·lula. Una partícula vírica no infecciosa pot ser que no contingui DNA al seu interior o que estigui incomplet. Altres causes de la ineficiència del cultiu cel·lular poden ser la falta de

receptors en les cèl·lules hoste, o el temps insuficient d'incubació. L'ús del cultiu cel·lular per la detecció de virus en mostres ambientals en ocasions es fa difícil degut a la presència de bacteries, fongs i substàncies tòxiques. Per evitar aquests problemes les mostres s'han de filtrar i s'han d'afegir antibiòtics al cultiu. Això de vegades resulta en una pèrdua dels virus associats a sòlids. Les substàncies tòxiques també són un problema difícil de solucionar. Normalment es dilueix la mostra fins que no s'observa toxicitat (Josephson i col. 2000).

8.3. Detecció immunològica

Hi ha moltes tècniques per la detecció immunològica, però la més emprada és el test de neutralització sèrica (SNT) encara que és molt laboriós i els resultats no s'obtenen fins als tres o cinc dies.

Un altre mètode més ràpid i de més fàcil interpretació consisteix en tenyir cèl·lules infectades del cultiu en un portaobjectes amb una varietat d'antisèrums monoclonals específics i després amb un conjugat IgG/FITC anti-ratolí. Les cèl·lules infectades on es repliquen els virus emeten fluorescència. La citometria de fluxe també s'ha usat per accelerar els procediments d'immunofluorescència (Wynn-Jones i Sellwood, 2001).

8.4. PCR

La PCR o reacció en cadena de la polimerasa és una tècnica que ha revolucionat la biologia molecular. Des que es va descobrir al 1985 s'ha convertit en un mètode clau en molts laboratoris. La PCR és una reacció enzimàtica relativament simple que usa la DNA polimerasa per copiar un DNA diana repetidament durant una sèrie de 30-50 cicles. A cada cicle la quantitat de DNA diana es dobla, resultant en un augment exponencial d'aquest. El producte de PCR es pot visualitzar per electroforesi en gel d'agarosa i la mida de l'amplificat s'estima per comparació amb standards de DNA de mida coneguda.

També és aplicable als virus RNA amb un pas previ, la retrotranscripció. En aquest pas es crea una còpia DNA del motlle de RNA. Aquesta còpia és anomenada

cDNA. L'enzim que catalitza aquesta reacció és la transcriptasa reversa, una DNA polimerasa RNA dependent.

La PCR té molts avantatges sobre les tècniques de cultiu, és més sensible i detecta tots els organismes independentment del seu estat fisiològic. Un cop un assaig ha estat optimitzat, és relativament ràpid i simple obtenir resultats en menys de 24 hores. La PCR també té alguns desavantatges, per exemple detecta tant els virus infecciosos com els no infecciosos, deixant oberta la qüestió de quant patogènica pot ser una mostra. Aquesta tècnica també és susceptible d'inhibició per substàncies i metalls presents en mostres ambientals (Marlowe i col. 2000).

Per aprofitar els avantatges de la PCR i el cultiu cel·lular, tot i evitant al màxim els seus desavantatges alguns autors recentment han estat utilitzant l'assaig integrat de cultiu cel·lular i PCR (ICC-PCR). Aquest assaig combina la sensibilitat de la PCR i l'habilitat del cultiu cel·lular d'amplificar les partícules infeccioses (Jiang, 2006). S'ha reportat la detecció d'astrovirus, enterovirus i adenovirus per aquesta tècnica (Chapron i col. 2000). Tot i ser una tècnica més sensible que el cultiu cel·lular, té els mateixos problemes amb mostres que contenen alta concentració de substàncies tòxiques.

8.5. PCR a temps real

El primer sistema de PCR a temps real que es va desenvolupar detectava productes de PCR mentre s'acumulaven. Aquest sistema incloïa bromur d'etidi en cada reacció d'amplificació, un termociclador adaptat per irradiar les mostres amb raigs UV i una càmera operada per ordinador que detectava la fluorescència resultant. (Higuchi i col. 1992 i 1993). L'amplificació produïa un increment de la quantitat de DNA de doble cadena, que s'unia al bromur d'etidi produint un increment en la fluorescència. El sistema calculava gràfiques d'amplificació representant l'increment de fluorescència en funció del nombre de cicles.

Els sistemes de PCR a temps real poden usar *Sybr Green* com a intercalador, tot i que actualment la tècnica es basa sobretot en l'ús de sondes fluorogèniques per detectar quantitativament seqüències específiques d'àcids nucleics aprofitant l'activitat nucleasa 5'-3' de la Taq Polimerasa (Holland i col. 1991).

Aquestes sondes són oligonucleòtids específics per cada seqüència que volem detectar, d'unes 20-30 bases, amb un *reporter* a 5' i un *quencher* a 3'. El *reporter* fluorescent, com el FAM (6-carboxi-fluoresceïna) està unit covalentment a l'extrem 5'

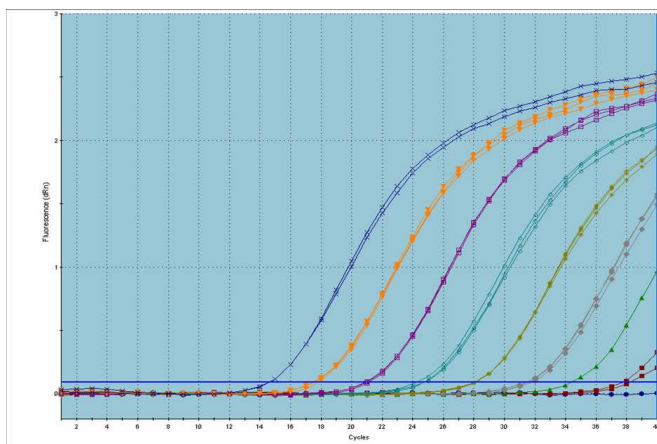


Fig. 13. Exemple de representació de les corbes d'amplificació tal com es presenten al programa que regeix el funcionament del termociclador. Gràfica: a l'eix d'ordenades es representa el nombre de cicles i al d'abscisses la fluorescència detectada. La barra horitzontal que travessa la gràfica senyala el valor Ct que és el cicle en el qual es considera que la fluorescència es detecta per sobre del soroll de fons. Les corbes representen la fluorescència detectada en

de l'oligonucleòtid. També s'usen altres *reporters* com el TET (tetracloro-6-carboxi-fluoresceïna) o el HEX (hexacloro-6-carboxi-fluoresceïna).

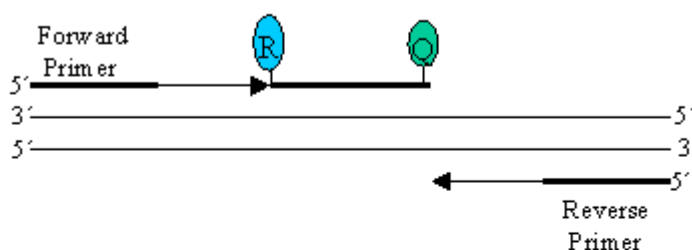
L'activitat fluorogènica del *reporter* és inhibida pel *quencher* TAMRA (6-carboxi-tetrametilrodamina), unit via linker a l'extrem 3' de la sonda.

Quan la sonda està intacta, la proximitat del *reporter* i del *quencher* resulta en una supressió de la fluorescència de l'encebador.

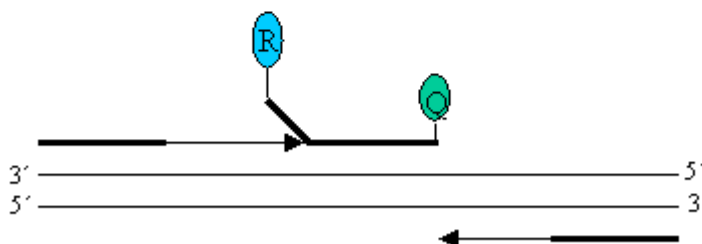
Durant la PCR, la sonda s'anella específicament a la seqüència que volem detectar entre l'encebador dret i l'encebador invers. L'activitat nucleolítica de la polimerasa trenca la sonda entre el *reporter* i el *quencher* només si aquesta hibriditza amb la seqüència diana, la polimerasa no pot trencar sonda lliure. Aquest procés es dona a cada cicle i no interfereix amb l'acumulació exponencial del producte. La fragmentació de la sonda provoca un increment de la fluorescència del *reporter* que és proporcional a la quantitat de producte acumulat (Fig. 14).

La capacitat inhibidora del *quencher* depèn de la proximitat espacial entre aquest i el *reporter*. La flexibilitat d'un oligonucleòtid monocatenari aparentment permet a la sonda adoptar conformacions en què el *reporter* i el *quencher* són suficientment a prop per permetre la inhibició. Qualsevol estructura que interfereixi en aquesta flexibilitat pot reduir en grau d'activitat del *quencher*; s'ha d'evitar que la sonda pugui adoptar estructures com *hairpins*, autocomplementarietat, complementarietat amb algun dels encebadors i quatre o més bases iguals seguides (revisat a Livak i col. 1995). Per tant les sondes s'han de dissenyar amb uns requisits molt específics, no només de seqüència, sinó per la formació d'estructures secundaries; a més de tenir una T_m més elevada.

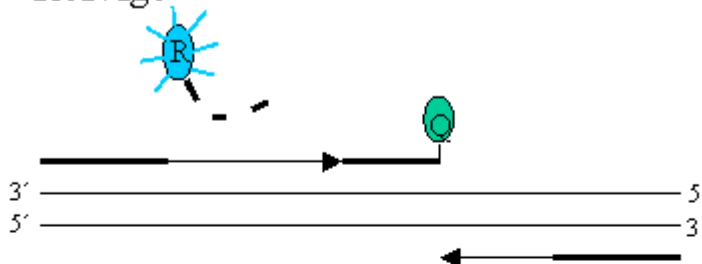
Polymerization



Strand Displacement



Cleavage



Polymerization Completed



Fig. 14. Esquema del procés d'amplificació de la PCR a temps real. Primer es produeix l'anellament dels encebadors i la sonda i es comença la polimerització. A mida que se sintetitza nou DNA, la sonda es veu desplaçada de la cadena motlle. En el següent pas l'acció exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa trenca la sonda i es produeix fluorescència. Finalment la polimerasa acaba de separar la sonda del DNA motlle i es repeteix el cicle. R: *reporter*; Q: *quencher*.

La reacció es realitza en un termociclador equipat amb un detector de fluorescència que recull dades a cada cicle i calcula una gràfica on es representa l'increment de fluorescència detectada en funció del nombre de cicles realitzats (Fig. 13).

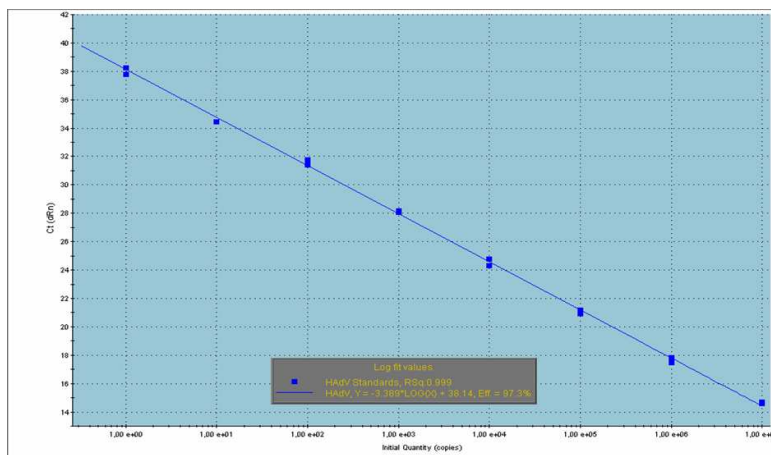


Fig.15. Exemple de representació d'una corba estàndard tal com es presenta al programa que regeix el funcionament del termociclador. La gràfica representa el valor Ct (abcisses) en funció de les quantitats presents (conegudes i introduïdes per l'usuari) a cada tub de reacció. El programa calcula una recta de regressió amb la qual intrapolar el valor Ct de les mostres a quantificar.

El valor Ct (*threshold cycle*) o valor llindar es defineix com el nombre fraccional de cicle en el qual la fluorescència del *reporter* generada pel trencament de les sondes sobrepassa un llindar fixat. Una gràfica del

logaritme decimal del nombre inicial de còpies d'una sèrie de dilucions estàndard en funció del valor Ct resulta en una línia recta (Fig. 15). La quantificació de seqüències diana en una mostra desconeguda es calcula mesurant el valor Ct i fent servir la recta estàndard per determinar el nombre inicial de còpies.