

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.



1.1. HISTÒRIA

Des de mitjans de la dècada dels 50, s'han descrit nombroses epidèmies d'hepatitis víriques, principalment a Àsia. Inicialment s'atribuïren al VHA ja que la malaltia que causa cursa com una hepatitis aguda clínicament indistingible de la causada pel virus de l'Hepatitis E (Emerson i Purcell, 2001). Va ser diferenciada d'aquesta quan l'any 1980 uns estudis serològics demostraren que 2 brots d'hepatitis agudes a l'Índia (Delhi i Kashemir) estaven causats per un agent etiològic diferent al VHA (Vishwanathan, 1957; Wong i col., 1980; Khuroo, 1980). Es va definir una nova forma d'hepatitis no-A no-B transmesa per via fecal-oral. Es denominà hepatitis no-A, no-B epidèmica. Posteriorment va passar a ser denominada hepatitis no-A, no-B de transmissió entèrica. Aquesta nova hepatitis vírica presentava alguns trets diferencials respecte a la causada pel VHA, com una major taxa d'individus adults afectats i una elevada taxa de mortalitat en dones embarassades.

El VHE va ser identificat per Balayan i col. l'any 1983. Un voluntari va desenvolupar hepatitis aguda després d'ingerir un extracte de femta d'un malalt d'hepatitis no-A no-B. Va generar anticossos que reaccionaren amb les partícules víriques excretades pel malalt durant la fase aguda de la seva malaltia. Estudis de microscopia immuno-electrònica van permetre l'observació de partícules víriques no embolcallades d'uns 27 nm de diàmetre d'una mostra barrejada de femta del pacient de la fase aguda de la malaltia i sèrum de la fase convalescent. Posteriorment Balayan va aconseguir infectar micos amb el virus, que també van excretar el virus en femta (Balayan i col., 1983).

El virus va ser classificat dintre de la família *Caliciviridae*, ja que compartia amb els seus membres característiques morfològiques, físico-químiques i estructurals (Bradley i Balagan, 1988). L'any 1990 es clonà i caracteritzà el VHE a partir de bilis de macacs *cynomolgus* infectats experimentalment amb femtes de malalts d'un brot epidèmic a Birmània (Reyes i col., 1990). Tam i col. (1991) van seqüenciar el genoma complet d'aquesta soca birmana (a partir de femta d'un mico infectat experimentalment). Un segon aïllat va ser identificat durant un brot a Mèxic. La seqüència presentava una similitud d'un 76% amb la de la soca birmana (Huang i col. 1992). Aquestes 2 soques prototip representaven els 2 primers genotips descrits del VHE. Durant els anys immediatament posteriors a la identificació d'aquestes 2 soques, s'identificaren un gran nombre d'aïllats a Pakistan, Xina i Índia. Totes aquestes soques estaven altament relacionades amb la soca Birmana, amb més d'un 93% d'identitat nucleotídica (Schlauder i Mushahwar, 2001).

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

A partir de mitjans dels 90 s'han anat acumulant evidències sobre la presència del VHE entre poblacions de regions considerades no endèmiques. Inicialment els casos detectats a aquestes àrees s'associaren a viatges a regions endèmiques (Bader i col., 1991; Dawson i col. 1992a). Alguns estudis aïllats presentaven casos d'hepatitis E a individus sense història recent de viatges. Estudis seroepidemiològics mostraren que un 1-3% dels donants de sang dels EEUU i Europa eren seropositius pel VHE (Dawson i col., 1992b). L'any 1996 es detectà la primera soca del VHE (soca US) d'una regió considerada no endèmica (Schlauder i col., 1996; Kwo i col. 1997). Va ser aïllada als EUA a partir d'una mostra clínica d'un pacient amb hepatitis aguda. La seqüència completa es publicà l'any 1998 (Schlauder i col., 1998). Un any abans s'havia identificat la primera soca del tipus VHE que infectava animals (Meng i col., 1997). Aquesta soca d'origen porcí, aïllada també als EUA, i la soca clínica US presentaven una alta homologia suggerint el possible paper del porc com a reservori del virus. S'identificaren noves soques a regions industrialitzades, com a Itàlia, Grècia, Espanya (Psichogiou i col., 1995; Schlauder i col., 1999, Zanetti i col., 1999, Pina i col., 2000) causants d'hepatitis agudes en pacients que no havien viatjat a zones endèmiques. En els últims anys s'estan identificant soques del VHE a Xina, Taiwan i Japó que són diferents a totes les descrites fins al moment.

L'any 1998, per manca de relació filogenètica amb els altres membres de la família *Caliciviridae* (Koonin i col., 1992; Berke i Matson, 2000), així com per profundes diferències en el tipus d'enzims replicatius utilitzats pel VHE (Koonin i Dolja, 1993), aquest va ser exclòs d'aquesta família i temporalment classificat al gènere '*HEV-like viruses*' (virus del tipus VHE) (Pringle, 1998). Actualment és l'únic membre de la família *Hepeviridae*.

En els últims anys s'ha estudiat la presència d'anticossos anti-VHE a diferents espècies animals. S'han detectat a porcs, rosegadors, ovelles, vaques, pollastres i d'altres animals. Fins el moment ja s'ha aïllat el virus a porcs, porcs senglars, cérvols i aus, suggerint que alguns d'aquests animals poden actuar com a reservoris del virus.

1.2. L'AGENT CAUSAL DE L'HEPATITIS E

1.2.1. Característiques moleculars

1.2.1.1. Genoma

El genoma del VHE està format per una única cadena d'ARN d'orientació positiva. La longitud varia entre 7,2 i 7,5 Kb. La molècula d'ARN està poliadenilada a l'extrem 3' carboxiterminal i presenta un cap a l'extrem 5' aminoterminal, amb una 7-metilguanosa (Kabrane-Lazizi i col., 1999a).

El genoma està organitzat en 3 pautes obertes de lectura (ORF) diferents (Figura 1.1.). Aquestes ORF estan solapades.

- ORF1: localitzada a l'extrem 5', és l'ORF més gran. Codifica per proteïnes enzimàticament actives implicades, probablement, en la replicació viral i el processament proteic. S'han identificat motius característics d'una metiltransferasa, una cisteïna proteasa *papain-like*, una ARN helicasa i una ARN polimerasa ARN-depenent. També conté 2 dominis (X i Y) de funció desconeguda fins el moment i una regió hipervariable rica en prolines. Aquestes regions hipervariables es troben habitualment en proteïnes estructurals dels virus per escapar de la resposta immune de l'hoste (Worm i col., 2002a).
- ORF2: localitzada cap a l'extrem 3' del genoma. Codifica per 1 proteïna estructural. Aquesta regió és traduïda a un precursor amb 3 punts de glicosilació que posteriorment és processat i probablement glicosilat (Worm i col., 2002a). Assajos *in vitro* suggereixen que la proteïna és translocada a través del reticle endoplasmàtic i expressada tant intracel·lularment com a la superfície de la cèl·lula (Zafrullah i col., 1999).
- ORF3: localitzada al centre del genoma del VHE solapant-se cap a l'extrem 5' amb l'ORF1 i cap al 3' amb l'ORF2. Codifica per una proteïna de 123 aa de funció desconeguda. Diferents estudis han postulat el seu paper com a element d'ancoratge de les partícules víriques amb el citoesquelet de

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

les cèl·lules hepàtiques, actuant com a element important en el procés d'ensamblatge de les partícules víriques (Zafrullah i col., 1997).

La seqüència del genoma del VHE és relativament estable. La identitat nucleotídica entre aïllats d'un mateix brot és alta i passes seriatos en micos *cynomolgus* no resulten en deriva genètica (Arankalle i col., 1999). La majoria de substitucions nucleotídiques són silencioses, majoritàriament en les regions de l'ORF2 i ORF3 i únicament seqüències hipervariables de l'ORF1 presenten una considerable diversitat aminoacídica (Yarborough i col., 1991; Worm i col., 2002a).

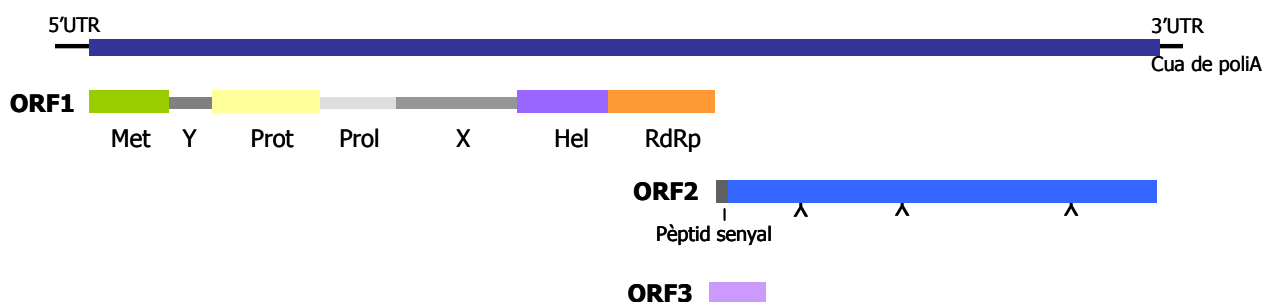


Figura 1.1. Organització del genoma del VHE en tres ORF o pautes obertes de lectura. Els dominis identificats a l'ORF1 són: un domini metiltransferasa (Met), un domini Y (Y), un domini de proteasa *papain-like* (Prot), una regió hipervariable rica en prolins (Prol), un domini X (X), un domini helicasa (Hel) i un domini ARN polimerasa ARN-depenent (RdRp). A l'ORF2 hi ha 3 punts potencials de glicosilació (^).

1.2.1.2. Càpside

Entre 1988 a 1998 el virus de l'Hepatitis E va estar inclòs dintre de la família *Caliciviridae*, degut a que compartia característiques físico-químiques amb els membres d'aquesta família. Aquests es caracteritzen per presentar 32 depressions amb forma de copa (càlix en llatí) a la seva superfície. En comparació amb els membres d'aquesta família, la partícula vírica del VHE és lleugerament més petita i les característiques de la seva superfície (com les espícules i les depressions) són més suaus (Worm i col., 2002a) (Figura 1.2.).



Figura 1.2. Fotografia obtinguda per microscopia electrònica mostrant partícules del VHE en femta de la fase aguda de la malaltia. Les partícules víriques tenen entre 28 i 34 nm de diàmetre. Extret de Emerson i Purcell (2001).

1.2.2. Característiques físico-químiques i estabilitat

El viriò del VHE presenta una estructura icosaèdrica d'entre 27 i 34 nm de diàmetre. Forma partícules víriques no embolcallades amb un coeficient de sedimentació d'aproximadament 183S. S'han detectat partícules del virus que sedimenten a 165S, però es creu que són defectives. La densitat en gradient de tartrat de potassi i glicerol és 1,29 g/ml (Purcell, 1996).

En condicions de laboratori el VHE és bastant làbil. S'observa la desintegració del virus durant la centrifugació per l'obtenció dels gradients de CsCl, ja que és extremadament sensible a les altes concentracions salines utilitzades (Tam i col., 1999). És necessari el manteniment a temperatures tan baixes com sigui possible, encara que es degrada fàcilment durant la congelació i descongelació (Balayan, 1997; Yarbough 1999). També és sensible als enzims proteolítics (Bradley, 1992; Bradley, 1994; Ticehurst, 1999). Els desinfectants iodats i l'autoclau destrueixen el virus (Ticehurst, 1999).

S'ha observat que els virions es mantenen inalterables després de l'exposició a trifluorotricloroetà (Purcell, 1996). La seva via de transmissió (fecal-oral) fa pensar que també és relativament estable a pH àcids i bàsics mitjans (Harrison, 1999; Purcell, 1996) i la detecció del virus en aigua residual suggereix que el virus sobreviu relativament bé a l'ambient (Harrison, 1999). Pina i col. (1998b) observaren una T_{90} de 20 dies i una T_{99} de 39 dies al dopar aigua residual amb una concentració coneguda d'una soca del VHE i mantenir-la a 20°C. L'estabilitat del VHE en aquestes condicions era inferior a la de Poliovirus-1.

1.2.3. Diversitat genètica

Exceptuant la regió hipervariable continguda dintre de l'ORF1, el genoma del VHE és relativament estable (Arankalle i col., 1999). La majoria de la variació que s'observa a nivell de l'ARN representa substitucions que no provoquen canvis a la seqüència d'aminoàcids. L'ORF2 i ORF3 estan conservats especialment (Yarborough i col., 1991; Worm i col., 2002a).

S'ha observat que la similitud nucleotídica de les seqüències aïllades durant un brot epidèmic és elevada, malgrat que es troben mutacions puntuals, normalment silencioses, entre les soques del VHE obtingudes de diferents pacients d'un brot. Això suggereix l'existència de nombroses soques relacionades, cadascuna amb canvis propis, circulant simultàniament en un mateix brot. En general, aquestes soques presenten característiques genètiques pròpies i distingibles de les que presenten les soques causants d'altres brots (Aggarwal i col., 1999). Sembla, però, que la deriva genètica no és un factor important a l'evolució del VHE i que per tant aquestes diferències no representen més que poblacions concretes del virus (Arankalle i col., 1999; Aggarwal i col., 1999).

També s'observen diferències geogràfiques. Les seqüències de zones geogràfiques diferents presenten generalment més variacions entre elles que les seqüències de soques d'una mateixa zona. Aquestes diferències representen substitucions silencioses i únicament seqüències hipervariables de l'ORF1 presenten una diversitat aminoacídica important (Worm i col., 2002a).

Durant molts anys, el VHE ha estat considerat un virus limitat a zones tropicals i subtropicals qualificades com a endèmiques. Es van descriure soques causants d'epidèmies i de casos esporàdics a Índia, Birmània, Xina, Pakistan... La majoria dels aïllats presentaven seqüències similars a la seqüència de la soca prototip birmana, conformant el genotip 1. L'únic aïllat genèticament diferent identificat inicialment va ser el provinent d'un brot d'hepatitis E a Mèxic (Huang i col., 1992). Era l'únic membre del genotip 2. L'aparició de noves seqüències aïllades a partir de mostres de pacients amb hepatitis agudes a regions industrialitzades considerades no endèmiques pel VHE (EUA, Itàlia, Grècia, Espanya) (Kwo i col., 1997; Zanetti i col., 1999; Schlauder i col., 1999; Pina i col., 2000), va aportar noves dades que indicaven una major diversitat genètica de la que es creia. Aquestes soques presentaven seqüències significativament diferents a les trobades a regions endèmiques i eren bastant similars entre elles. La seqüenciació del genoma complet de les soques dels EUA mostrà l'existència d'un tercer genotip, el 3. Les seqüències estudiades de les soques europees corresponen a fragments molt petits del genoma impossibilitant una classificació

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

genotípica definitiva. Les dades disponibles fins ara indiquen, però, que o bé formen part del genotip 3, juntament amb les soques dels EUA i d'altres japoneses, o bé formen part de genotips diferents, però més pròxims al 3 que a qualsevol altre (Schlauder i col., 1999). Durant els últims anys s'han descrit soques procedents principalment de Xina i Japó, distingibles de totes les anteriors, que formarien part d'un quart gran genotip, el 4 (Hsieh i col., 1998; Wang i col., 1999; Wang i col., 2000).

Actualment hi ha diferents nomenclatures proposades per designar el diferents genotips descrits pel VHE. Worm i col (2002a) defineixen un genotip com a un conjunt de virus amb una divergència nucleotídica inferior al 20% a la regió ORF2. Segons aquest criteri, les diferents soques es classifiquen en els 4 grans genotips descrits anteriorment. El genotip 1 (soques africanes i asiàtiques) presenta una diversitat molt baixa. El genotip 2 està format per la soca Mexicana i alguns aïllats de Nigèria. El genotip 3 el formen les soques nord-americanes, europees, japoneses i argentines. El genotip 4 està format per aïllats xinesos i japonesos detectades recentment. Altres estudis classifiquen les diferents soques fins en nou grups diferents, bàsicament per la separació dels membres del genotip 3 en diferents grups. La Taula 1.1. resumeix algunes de les nomenclatures proposades pels diferents grups o genotips del VHE.

Les soques del virus de l'Hepatitis E d'origen animal descrites a partir de la dècada dels 90 recolzen la hipòtesi d'una possible zoonosi responsable dels casos d'hepatitis E esporàdics en humans a regions no endèmiques. S'ha observat que les seqüències de les soques d'origen porcí aïllades a una determinada regió són més similars a les seqüències de les soques aïllades a partir de mostres clíniques de pacients humans amb hepatitis agudes a aquesta mateixa regió que a les soques porcines d'altres regions (Hsieh i col., 1999; Pina i col., 2000; Meng i col., 1997; Okamoto i col., 2001). Fins el moment, únicament s'han identificat soques del VHE d'origen porcí pertanyents als genotips 3 i 4.

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

Taula 1.1. Propostes de classificació de soques del VHE. Es recullen soques de diferents distribucions geogràfiques: Birmània (B1 i B2), Índia (I1 i I2), Pakistan (P1), Xina (C1 a C4, Ct1, Cb6, Cb7, Cs13, Ct1, Cs15, Ch3, Cs5, Cb3, Cb4, Cs9, Ct705, Ct821 i Ct841), Marroc (Mo12 i Mo23), Uzbekistan (Uz), Kirgistan (Ki), Txad (Chad), Mèxic (M), Nigèria (N1, N4 a N7 i N9), Estats Units d'Amèrica (US1, US2 i SwUS1), Itàlia (It1), Nova Zelanda (SwNZ1), Grècia (G1 i G2), Espanya (VH1 i VH2), Argentina (Ar1 i Ar2) i Àustria (Au1). SwUS1 i SwNZ1 són soques del VHE d'origen porcí. Modificat de Schlauder i Mushahwar, 2001.

Aïllats	Schlauder ^a	Schlauder ^a	Schlauder ^b	Wang ^c	Arankalle ^d	Tsarev ^e
B1, B2, I2	I	1	1	1a	IA	I1b
P1, C1-4	I	1	1	1b	IB	I1a
I1	I	1	1	1c		I1c
Cb6, Cb7, Cs13	I	1	1	1c		
Mo12, Mo23	I	1	1	1e	IC	
Uz, Ki, Chad	I	1		1d	IC	I2
M	II	2	2	2	II	II
Ni^f	II	12				
US1, US2, SwUS1	III	3	3	3	III	III
It1	III	4	5			
SwNZ1	III	4				
G1, VH1, VH2	III	5	6			
Gr2	III	6	7			
Ar1, Ar2	III	7	8			
Au1	III	7				
Ct1	IV	8				
Cs15, Ch3	IV	9	4	4a		
Cs5, Cb3, Cb4	IV	10		4b		
Cs9	IV	11		4c		
Ct705, Ct825, Ct845	IV	10-11				

^a Schlauder i Mushahwar, 2001

^b Schlauder i col., 2000

^c Wang i col., 1999

^d Arankalle i col., 1999

^e Tsarev i col., 1999

^f Soques nigerianes 1, 4-7 i 9

1.2.4. Diversitat serotípica

Les diferències entre soques del VHE es limiten a la seqüència de nucleòtids. Les seqüències aminoacídiques de les soques de diferents genotips estan altament conservades, recolzant la teoria més generalitzada de l'existència d'un únic serotip (Tsarev i col., 1999). Únicament s'observen certes diferències serològiques a l'expressar antígens de l'ORF3 (Yarborough i col., 1991; Khudyakov i col., 1993; Khudyakov i col., 1994). Durant un temps, però, es va considerar que la soca mexicana era l'únic membre d'un segon serotip minoritari (Bradley i col., 1991).

Les partícules víriques d'un genotip determinat reaccionen amb els anticossos generats durant la infecció produïda per qualsevol dels altres genotips descrits (Yarborough, 1999). Experiments creuats amb diverses soques del VHE en primats han mostrat protecció creuada a la infecció (Bradley i col., 1987; Tsarev i col., 1993; Worm i Wirnsberger, 2004). Només s'ha descrit un agent similar al VHE causant d'una epidèmia d'hepatitis no-A, no-B a Sibèria que no reaccionava amb sèrums de pacients amb hepatitis E d'altres regions. Aquest agent, indistingible del VHE per immunomicroscopia electrònica, podria correspondre a un nou serotip o bé a un altre agent totalment diferent (Purcell, 1996).

1.2.5. Replicació del virus

Reyes i col., (1993) van proposar un model de replicació basat en motius conservats de dominis no estructurals i analogies entre el VHE i d'altres virus amb genomes formats per ARN de cadena positiva. Els hepatòcits són les cèl·lules diana per excel·lència pel VHE, però estudis en rates inoculades experimentalment amb una soca del VHE d'origen humà han permès identificar altres possibles dianes, com els monòcits de sang perifèrica, la melsa, els nòduls limfàtics i les cèl·lules de l'intestí prim (Maneerat i col., 1996). El model de replicació està representat a la Figura 1.3.:

- a) El virió s'uneix a un receptor de la superfície de la cèl·lula permissiva i és internalitzat. Al citoplasma, i per mecanismes desconeguts, perd la càpside proteica.
- b) La molècula d'ARN genòmica és traduïda a una primera poliproteïna no estructural (nsP) codificada per l'ORF1 i que és processada per generar les proteïnes no estructurals amb les diferents funcions de metiltransferasa, proteasa, helicasa i replicasa.

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

- c) La replicasa que s'ha format pot fer servir el genoma víric com a motlle per sintetitzar les molècules d'ARN negatives que actuaran com a intermediaris de replicació.
- d i e) Degut a la homologia de seqüència amb altres alphavirus s'ha proposat que a partir d'aquests ARN negatiu, es formen 2 classes d'ARN de sentit positiu: genòmic i subgenòmic.
- f) Les molècules d'ARN subgenòmic es tradueixen per donar les proteïnes estructurals codificades per l'ORF2, i possiblement també la proteïna codificada per l'ORF3.
- g) Un cop generades les proteïnes estructurals, aquestes s'assamblen formant la càpside i incloent una molècula d'ARN positiu genòmic. Això dóna lloc a la progènie vírica. Aquests nous virions poden infectar altres cèl·lules o ser excretats com a partícules víriques infeccioses.

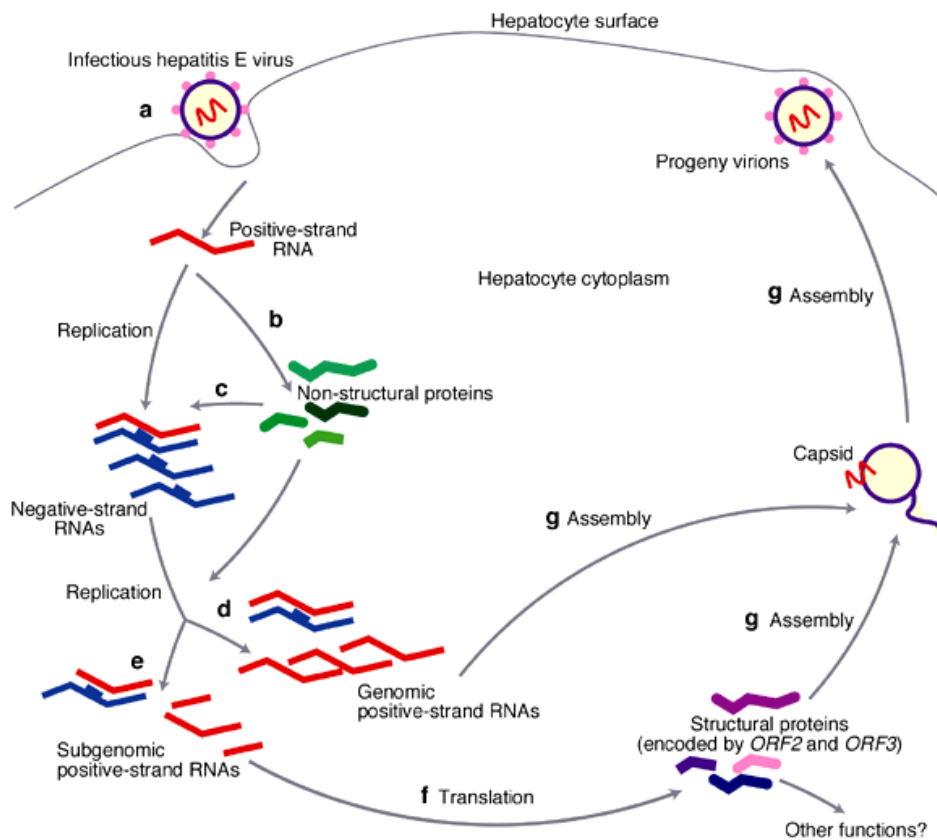


Figura 1.3. Model de replicació proposat per Reyes i col., 1993. Esquema extret de Jameel, 1999.

1.3. EPIDEMIOLOGIA

Les característiques epidemiològiques de la infecció pel VHE són (Worm i col., 2002a; Mast i Krawczynski, 1996):

- Transmissió fecal-oral,
- Brots epidèmics associats a aigua contaminada en àrees amb condicions sanitàries deficientes,
- Major taxa d'afectats entre joves adults d'entre 15 i 40 anys,
- Major taxa de mortalitat en dones embarassades (especialment durant el 3er trimestre),
- Baixa seroprevalença (IgG anti-VHE) en zones amb brots i casos esporàdics d'hepatitis E,
- Baixa taxa de transmissió per contacte persona-persona,
- Manca de seqüeles o cronicitat.

1.3.1. Zones endèmiques i no endèmiques

El virus de l'Hepatitis E causa grans epidèmies principalment a regions tropicals i subtropicals d'Àsia, Àfrica i Amèrica Central (Mast i Alter, 1993). És el responsable de més del 50% de les hepatitis agudes virals a molts països en desenvolupament, considerats endèmics pel VHE (Yarborough, 1999). En aquestes regions provoca casos esporàdics d'hepatitis i brots epidèmics. Aquests brots s'associen majoritàriament al consum d'aigua contaminada fecalment (Schlauder i Mushahwar, 2001; van del Poel i col., 2001). La majoria d'aquests brots apareixen en zones rurals i es limiten a pocs individus afectats (Worm i Wirnsberger, 2004). Altres, però, són autèntiques epidèmies que afecten a grans quantitats d'individus. Algunes de les més importants estan recollides a la Taula 1.2. Arankalle i col. (1994) van estudiar 17 brots epidèmics d'hepatitis agudes a la Índia, tots ocasionats per la contaminació fecal de l'aigua. Setze dels brots estaven causats pel VHE.

La malaltia es dona principalment a regions o situacions a on la contaminació fecal de les fonts de subministrament d'aigua pel consum és freqüent, o després de desastres naturals o operacions militars quan grups de refugiats es veuen obligats a consumir l'aigua de fonts incontrolades (Jameel, 1999; Worm i Wirnsberger, 2004). A més d'aquests brots epidèmics, el VHE també provoca casos esporàdics d'hepatitis E. És responsable de més del 50% de les hepatitis agudes virals a molts països subdesenvolupats (Yarborough, 1999).

Taula 1.2. Brots epidèmics causats pel VHE.

Lloc	Any	No. casos
Nova Delhi (Índia)	1955	29000
Kirgizia (Rússia)	1955-56	10800
Vall de Katmandú (Nepal)	1973-74	10000
Ahmedabad (Índia)	1975-76	30000
Mandalay (Birmània)	1976-77	20000
Kashmir (Índia)	1978-82	52000
Algèria	1980-81	780
Tortiya (Costa d'Ivori)	1983-84	800
Etiòpia	1985-86	2000
Xinjiang (Xina)	1986-88	120000
Somàlia	1988	11400
Kampur (Índia)	1990-91	79000
Islamabad (Pakistan)	1993-1994	3827
Sadr City (Iraq)	2004	100
Txad	2004	1442
Sudan	2004	6861

Les regions industrialitzades són les considerades tradicionalment com a regions no endèmiques i a on el VHE causa únicament casos esporàdics. Fins fa poc aquests casos s'atribuïen a soques importades de regions endèmiques (Balayan, 1997; Aggarwal i Krawczynski, 2000). Amb la detecció a països industrialitzats de soques del VHE a partir de mostres clíniques de pacients sense historial de viatges a zones de risc, s'ha plantejat la possibilitat de l'existència de soques autòctones pròpies d'aquestes regions a on la prevalença d'infeccions pel VHE podria ser superior a la considerada tradicionalment (Jameel, 1999). Alguns dels països europeus a on s'han descrit casos d'aquest tipus són: Àustria (Worm, i col. 1998; Worm i col., 2000), Holanda (Widdowson i col., 2003), Itàlia i Grècia (Zanneti i col., 1999; Schlauder i col., 1999; Grieco i col., 2001), França (Mansuy i col., 2004), Regne Unit (McCrudden i col., 2000; Wang i col., 2001). També a Espanya s'han identificat soques del VHE causants d'hepatitis agudes (Pina i col., 2000).

1.3.2. Seroprevalença

A tot arreu es troben anticossos contra el VHE (Figura 1.4.). A les regions d'Àsia i Àfrica considerades endèmiques, els valors de seroprevalença entre individus sans són més alts que els corresponents a individus sans de les regions industrialitzades. En general s'observa que els valors de seroprevalença en aquestes zones endèmiques són més baixos del que es podria esperar, entre un 3% i un 26% (Purcell, 1996). En menors de 10 anys la presència d'IgG anti-VHE és inusual, mentre que els nivells augmenten fins a un 10-40% entre adults majors de 25 anys (Arankalle i col., 1995). Un segon patró, però, s'ha descrit recentment a Egipte i certes àrees de la Índia, a on els nivells d'IgG anti-VHE en nens menors de 5% eren superiors al 60% (Fix, 2001; Aggarwal i col., 1997).

En països industrialitzats d'Europa i EEUU els valors d'IgG anti-VHE oscil·len entre 1 i 5% (Paul i col., 1994), valors relativament alts si s'accepta que els casos d'hepatitis E són tots importats. A Espanya, la seroprevalença trobada entre 76 individus sans va ser del 5,5% (Buti i col., 1995), mentre que entre donants de sang és d'un 2,8% (Mateos i col., 1999). Existeixen, però, estudis que mostren valors encara més alts. Mentre que a Carolina del Nord (EUA) la seroprevalença entre donants de sang oscil·lava entre 1,2 i 1,4% (Mast i col., 1997), a Baltimore MD (EUA) els valors arribaven al 21% (Thomas i col., 1997). Al Japó s'han trobat nivells que varien entre un 1,9% i un 14,1% depenent de la localització geogràfica (Li i col., 2000). Aquests nivells podrien reflexar infeccions subclíniques pel VHE o reactivitat creuada amb altres agents. (Aggarwal i Krawczynski, 2000).

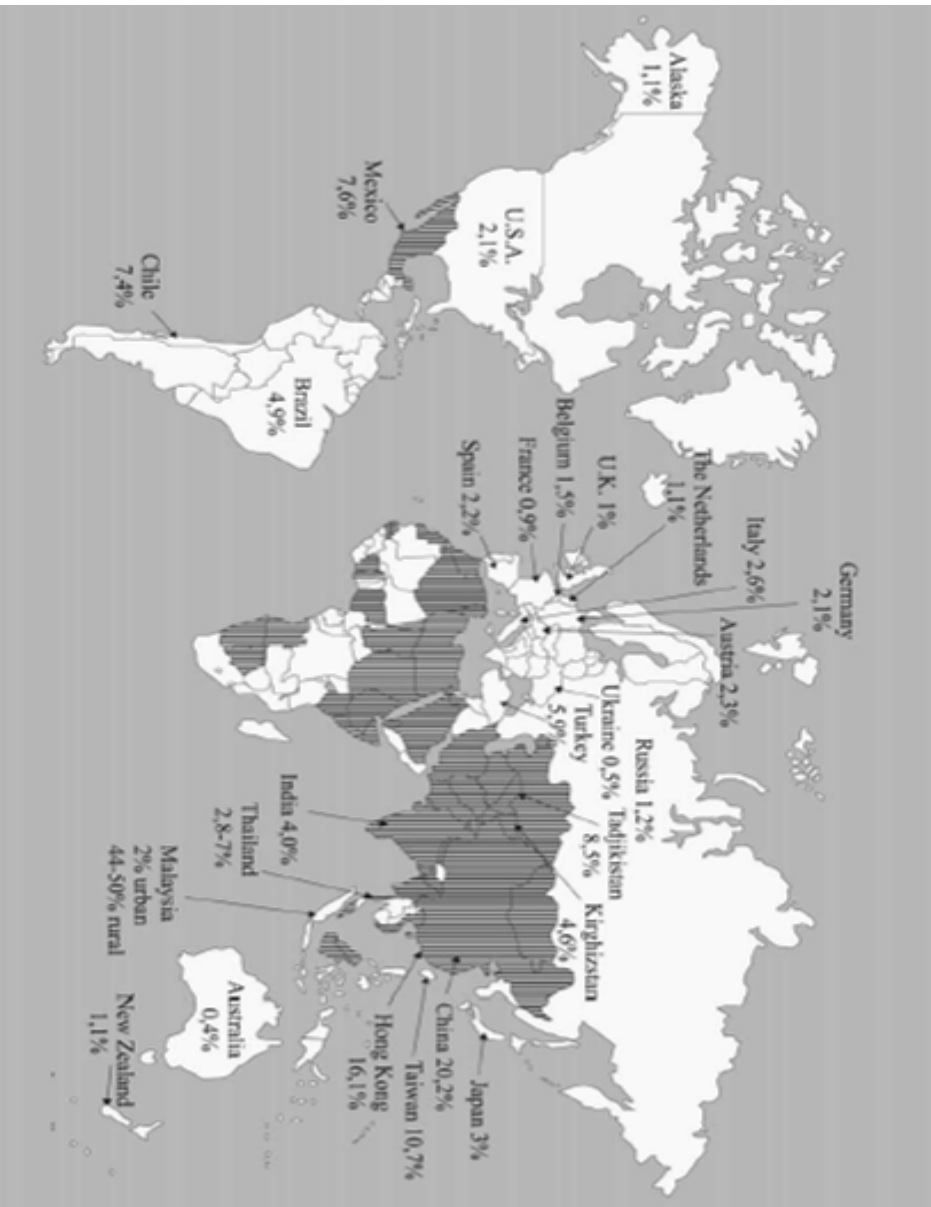


Figura 1.4. Distribució del VHE. Les àrees ratllades corresponen a regions amb epidèmies documentades d'infeccions pel VHE i/o a on >25% de les hepatitis no-A-B són atribuïbles al VHE. S'inclouen dades serològiques obtingudes a diferents estudis (Dawson i col., 1992b; Seow i col., 1999; Worm i col., 2000; Balayan, 1997). Extret de Worm i col. (2002a).

1.3.3. Vies de transmissió

La ruta fecal-oral és la via de transmissió predominant del VHE (Mast i Krawczynski, 1996; Khuroo i col., 2004). Això s'ha demostrat en experiments amb voluntaris humans que van desenvolupar hepatitis després d'ingerir filtrats procedents de femta de pacients amb hepatitis E (Balayan i col., 1983; Chauhan i col., 1993).

➤ Transmissió per aigua

La via principal de transmissió del VHE és l'aigua, habitualment aigua contaminada fecalment. Moltes epidèmies s'han donat durant inundacions, monsons o temporades de pluges, a on l'aigua residual s'ha barrejat amb les reserves d'aigües (Smith, 2001). Aquestes epidèmies també es veuen afavorides per circumstàncies que impliquin acumulació d'una gran quantitat de persones (camps de refugiats, barris pobres de grans ciutats...) i una inadequada disposició de les aigües fecals (Balayan, 1997).

Alguns brots d'hepatitis E a Indonèsia i Vietnam s'han donat a comunitats que viuen al costat de rius, a on no hi ha infraestructures sanitàries o aquestes són inadequades. Corwin i col. (1999) van relacionar els alts nivells de seropositivitat pel VHE observats en algunes d'aquestes comunitats amb l'ús que es feia de l'aigua del riu per beure, cuinar, la higiene personal i l'eliminació dels excrements humans. Observaven una disminució de la prevalença d'IgG anti-VHE a aquelles àrees a on l'aigua de riu era bullida abans de fer-la servir per beure o cuinar. Alguns brots epidèmics s'han donat en els mesos més calurosos, quan la reducció del cabdal dels rius incrementa el risc d'infecció pel VHE (Worm i col., 2002b).

➤ Transmissió per aliments

Aliments cuinats o rentats amb aigua contaminada, o manipulats per individus infectats amb VHE, poden convertir-se en una via de transmissió de la infecció. Alguns autors (Cacopardo i col., 1997; Mechnik i col., 1998; Tei i col., 2003) descriuen casos d'infecció pel VHE causats pel consum d'aliments contaminats, com mol·luscs o carn crua de possibles reservoris animals. També s'ha descrit un cas d'hepatitis E possiblement associat a la ingestió d'una herba medicinal d'origen xinès (Ishikawa i col., 1995).

➤ Transmissió persona-persona

La infecció pel VHE també es transmet pel contacte persona-persona. En casos epidèmics per contaminació d'aigua el paper d'aquesta via no és molt rellevant, ja que l'exposició de la població al patogen és generalitzada (Hau i col., 1999; Rab i col., 1997; Khuroo i col., 2004). Segons alguns estudis, en aquestes situacions menys del 2,5% dels casos es deu al contacte entre individus.

En infeccions esporàdiques aquesta via de transmissió sí és important. Khuroo i Dar (1992) observaren que l'índex d'afectats pel contacte domèstic amb un malalt d'hepatitis E era d'un 29%. També s'ha descrit la transmissió del virus a hospitals. En Sud-Àfrica 3 membres del personal sanitari d'un hospital desenvoluparen hepatitis E després d'atendre a un pacient amb fallada hepàtica fulminant pel VHE (Robson i col., 1992).

➤ Transmissió per altres vies

La transmissió del VHE per via parenteral no està clara. Hi ha estudis que descriuen una major seroprevalença pel VHE a malalts que necessiten hemodiàlisi respecte a donants. Altres estudis no troben cap diferència entre els dos grups. Psychogiou i col. (1996) van observar que un aparent increment en la seroprevalença a pacients amb hemodiàlisi desapareixia quan els casos eren comparats amb controls de la població general d'edats i sexes similars.

Arankalle i Chobe (1999) detectaren el genoma del VHE mitjançant RT-PCR al sèrum de donants, sense evidències de que els receptors desenvoluparen la malaltia. En un estudi retrospectiu a l'Índia, Khuroo i col. (2004) trobaren marcadors d'infecció aguda pel VHE (IgM i ARN) en un 43,3% del pacients que havien rebut transfusions de sang dintre dels 3 mesos previs a l'anàlisi, en comparació amb el 2% trobat en controls sans (individus que no havien rebut transfusions de sang mai).

Hi ha evidències de la transmissió vertical del VHE. Khuroo i col. (1995) detectaren l'ARN del virus en sang de nounats un cop la virèmia materna s'havia resolt. Kumar i col. (2001) observaren que el 100% dels nounats de mares a les que se'ls hi havia detectat l'ARN del VHE presentaven infecció i símptomes clínics.

Una altra via de transmissió del VHE que s'ha postulat és la transmissió sexual. Montella i col. (1994) observaren que els homes homosexuals amb el virus de la immunodeficiència humana presentaven una major probabilitat de ser també positius pel

VHE que els homes homosexuals sense el VIH. Altres estudis no trobaren cap increment del risc de patir la infecció pel VHE a pacients afectats pel VIH respecte d'altres grups (Bissuel i col., 1996).

1.3.4. Factors de risc

S'ha estudiat la importància de certs factors en la infecció per VHE.

- **Grup ètnic.** No hi ha evidències de que la pertinença a un grup ètnic determinat constitueixi un factor de risc per la infecció per VHE (Margolis i col., 1997).
- **Sexe.** Els homes infectats amb el VHE tenen més probabilitat que les dones de patir hepatitis clínica (Balayan, 1997), però segons l'estudi la proporció varia entre 1:1 i 3:1 (Margolis i col., 1997). Aquesta diferència no s'observa en nens, suggerint que els papers ocupacionals o socials dels homes poden ser els responsables de la major susceptibilitat.
- **Estat.** Durant les epidèmies causades pel VHE la taxa d'incidència més alta d'hepatitis E s'observa en individus entre 15 i 40 anys, mentre que la malaltia en nens és poc freqüent (Worm i col., 2002a; Aggarwal i Krawczynski, 2000). Khuroo i Kamili (1994) van descriure una epidèmia d'hepatitis E a la Índia a on la taxa d'infecció en nens, tant clínica com subclínica, era del 7,5%, en comparació amb el 20% en adults. Arankalle i col., (1995) i Hau i col., (1999) van demostrar que el pic d'incidència de la infecció, mesurat per la presència d'IgG anti-VHE, es trobava entre els 20 i els 40 anys. En contrast amb l'hepatitis E epidèmica, l'espòrica presenta una prevalença similar en adults i nens (Arora i col., 1999).
- **Geografia i viatges.** L'hepatitis E és més prevalent en regions tropicals i subtropicals a on les condicions socioeconòmiques i higièniques són deficientes. La majoria d'infeccions que es diagnostiquen als països industrialitzats s'associen a viatges a regions en vies de desenvolupament (Dawson i col., 1992a; Schwartz i col., 1999). Schwartz i col. (1999) van fer un recull dels casos d'individus amb hepatitis aguda associada a viatges publicats entre 1986 i 1997 (Taula 1.3.).

Taula 1.3. Resum dels casos d'hepatitis agudes associades a viatges publicats entre 1986 i 1997. Modificat de Schwartz i col. (1999).

Origen	No. Casos	Destinació
Israel	5	Nepal, Índia
Nord-Amèrica	8	Índia, Pakistan, Nepal, Bangladesh, Mèxic
Austràlia	1	Tailàndia, Nepal
Regne Unit	57	Pakistan, Índia, altres zones endèmiques
Holanda	3	Bangladesh, Somàlia, Orient Mitjà
Escandinàvia	8	Nepal, Índia, Pakistan, altres països (no recollit)
Nepal	4	Nepal
Japó	1	Xina
Itàlia	16	Índia, Somàlia, altres zones endèmiques
França	45	Índia, Somàlia, Txad

- **Període estacional.** La majoria d'epidèmies d'hepatitis E documentades s'han associat a la contaminació fecal de les fonts d'aigua. Moltes s'han donat després de fortes pluges o època de monsons (Velazquez i col., 1990; Smith, 2001). Les inundacions poden realitzar un paper important en la disseminació de la malaltia (Wong i col., 1980). A països amb climes més moderats hi ha un marcat increment de l'hepatitis E durant la tardor i principis d'hivern (Balayan, 1997).
- **Embaràs.** En brots epidèmics pel VHE la principal causa de mortalitat és l'alta taxa de fallida hepàtica fulminant en dones embarassades, principalment durant el tercer trimestre de l'embaràs. Les dones embarassades tenen més possibilitat d'infectar-se pel virus, de desenvolupar una fallida hepàtica fulminant i de morir amb pèrdua del fetus (Smith, 2001). La raó per la qual la infecció per VHE en aquest grup és tan severa és desconeguda. Khuroo i Kamili (2003) van dur a terme un estudi en dones amb hepatitis agudes esporàdiques d'origen viral a la Índia entre gener del 1993 i gener del 1996. De les 413 dones estudiades d'entre 15 i 45 anys, 76 (18,4%) estaven embarassades. En la comunitat a on es realitzà l'estudi, el grup de dones embarassades d'entre 15 i 45 anys constituïa el 3,0% de la població, i per tant estaven 6 vegades més representades entre les dones amb hepatitis agudes que a la població. En un brot epidèmic pel VHE pel mal funcionament d'una

planta de tractament d'aigua, Rab i col. (1997) van observar una taxa d'incidència de l'hepatitis E en dones embarassades d'un 21,6%, mentre que en dones no embarassades en edat fèrtil i en homes va ser d'un 10%.

Durant l'embaràs es donen canvis fisiològics i hormonals que podrien estar relacionats amb la severitat de les infeccions per VHE. A països en desenvolupament, a més, la manca nutricional i d'atenció mèdica, la immunosupressió que es dona durant l'embaràs i la presència d'altres infeccions víriques, bacterianes i parasitàries comuns en aquestes regions podrien ser algunes de les causes de la severitat de la infecció (Smith, 2001).

→ **Transfusions.** La transmissió parenteral del VHE no és habitual, ja que la fase de virèmia és breu, però s'ha descrit casos de donants sense símptomes amb marcadors d'infecció aguda pel VHE. És especialment important en regions hiperepidèmiques (Arankalle i Chobe, 1999). En un estudi retrospectiu a l'Índia, Khuroo i col. (2004) trobaren marcadors d'infecció aguda pel VHE (IgM i ARN) en un 43,3% del pacients que havien rebut transfusions de sang dintre dels 3 mesos previs a l'anàlisi, en comparació amb el 2% trobat en controls sans (individus que no havien rebut mai transfusions de sang).

→ **Hemodiàlisi.** Existeixen estudis que descriuen una prevalença d'anticossos anti-VHE en pacients amb hemodiàlisi incrementada respecte als controls. Ayoola i col. (2002), a l'Aràbia Saudi, van trobar una prevalença d'IgM anti-VHE en pacients amb hemodiàlisi superior a la trobada en els controls. A França, Buffet i col. (1996), van observar un 8% de pacients amb hemodiàlisi amb IgG anti-VHE, percentatge molt inferior respecte a d'altres virus de transmissió parenteral com el VHC o el VIH. D'altres autors no consideren aquest tipus de pacients com a grup de risc (Arinsoy i col., 1998; Sylvan i col., 1998).

→ **Malalties hepàtiques preexistents.** Els pacients amb malalties hepàtiques cròniques poden presentar major risc de morbiditat associada al VHE i fallida hepàtica (Worm i Wirnsberger, 2004). S'ha descrit que malalts hepàtics amb infecció pel VHE presenten un prognòstic greu per descompensació severa que porta a una elevada taxa de mortalitat (Ramachandran i col., 2002). Els autors van trobar en un estudi a l'Índia que el 56% dels malalts hepàtics crònics presentaven IgG anti-VHE.

→ **Risc ocupacional.** S'han realitzat nombrosos estudis per determinar si els veterinaris i les persones en contacte amb animals poden presentar un major risc de patir hepatitis aguda pel VHE. Seroprevalences significativament altes es van trobar entre veterinaris treballadors en contacte amb porcs a Xina i Tailàndia (Meng i col., 1999), regions amb alts nivells d'anticossos en la població general. Els nivells observats en regions industrialitzades semblen confirmar aquesta situació de risc. Hsieh i col. (1999) van trobar que a Taiwan el 27% dels individus que treballaven amb porcs presentaven IgG anti-VHE davant del 8% dels controls. Un altre estudi mostrà que els veterinaris en contacte amb porcs als EUA tenien 1,5 vegades més probabilitat de patir infecció pel VHE que el grup de donants de sang (Meng i col., 2002).

També s'ha descrit un increment dels valors de seroprevalença en individus que treballaven en contacte amb aigua residual (56,5%) respecte a la població control (18,9%) a l'Índia (Vaidya i col., 2003) i en membres del personal d'urgències i de cirurgia en un estudi realitzat a 3 hospitals d'Alemanya (Nübling i col., 2002).

→ **Ingestió de carn crua.** La possibilitat de que alguns animals actuïn com a reservoris del VHE suposa una situació de risc pels individus que consumeixen la seva carn. L'any 2003 es detectà al Japó un brot d'hepatitis E entre individus que havien menjat carn crua de cérvol. L'estudi d'una porció de l'animal va mostrar que estava infectat per una soca del VHE idèntica a la causant del brot (Tei i col., 2003). En aquest mateix país es va observar que el 17,7% dels individus que consumien habitualment carn crua de cérvol presentaven IgG anti-VHE, en front del 2,2% del grup control que no en menjaven (Tei i col., 2004), i que un 1,9% de 363 fetges de porc posats a la venda presentaven el genoma del VHE (Yazaki i col., 2003).

1.4. LA MALALTIA: HEPATITIS E

1.4.1. Característiques clíniques

L'hepatitis E és una malaltia aguda que no progressa cap a cronicitat (Emerson i Purcell, 2003). El període d'incubació en humans varia entre 15 i 60 dies, amb una mitja de 40 dies (Mast i Krawczynski, 1996; Smith, 2001). Els símptomes clínics són bàsicament els mateixos que els d'una hepatitis pel VHA, però lleugerament més severa. Els símptomes habituals són icterícia, anorèxia i hepatomegàlia, però també pot aparèixer dolor abdominal, nàusees, vòmits i febre (Purcell, 1996; Worm i col., 2002a). Els malalts amb icterícia mostren pell groguenca, icterícia escleral i orina i femta enfosquides (Smith, 2001).

Les IgM anti-VHE apareixen en sèrum amb l'inici dels símptomes, i es mantenen detectables durant 2-3 mesos. La resposta d'IgG es dona immediatament després de l'aparició de les IgM, augmentant durant la fase aguda (Worm i col., 2002a). No està clar quant dura la resposta d'IgG anti-VHE. Alguns estudis descriuen una vida mitja curta en una proporció significativament important de pacients, sobretot en nens (Goldsmith i col., 1992; Worm i col., 1998). D'altres estudis han detectat IgG fins a 4,5 anys després de la infecció o inclús 14 anys després (Dawson i col., 1992a; Clayson i col., 1995). En pacients amb hepatitis aguda s'ha observat: elevació dels nivells de bilirrubina en sèrum, d'alanina aminotransferasa, d'aspartat aminotransferasa, fosfatasa alcalina i gamma-glutamil transferasa (Mast i Krawczynski, 1996).

L'ARN del VHE es detecta en sèrum durant les 2 primeres setmanes simptomàtiques (Clayson i col., 1995), encara que s'han descrit períodes més prolongats d'entre 4 i 16 setmanes (Chauhan, 1993; Aggarwal i Krawczynski, 2000). L'excreció del virus en femta comença aproximadament una setmana abans de l'aparició dels símptomes, i continua fins a 2 setmanes després (Aggarwal i col., 2000). En aquest estudi, les mostres de sèrum i femta de 19 dels 20 pacients estudiats resultaren negatives pel VHE un cop els nivells d'ALT en sèrum retornaren a la normalitat.

L'hepatitis fulminant està més comunament associada amb el VHE que amb d'altres tipus d'hepatitis virals (Mast i Krawczynski, 1996). La mortalitat a la població general és aproximadament d'un 1%, però s'incrementa quan les afectades són dones embarassades.

En aquest cas la mortalitat pot arribar al 20%, principalment durant el tercer trimestre d'embaràs (Emerson i Purcell, 2003).

1.4.2. Diagnòstic

Tradicionalment, el diagnòstic d'infeccions pel VHE s'havia realitzat per visualització de les partícules víriques presents en sèrum o femta per microscopia immunoelectrònica, però és una tècnica cara, laboriosa i poc sensible, disponible només en alguns laboratoris especialitzats i que actualment ja no s'utilitza pel diagnòstic.

Els assajos serològics són les tècniques més esteses actualment. En general, la detecció d'IgG i IgM anti-VHE es realitza mitjançant assajos immunoenzimàtics (EIA). Utilitzen proteïnes recombinants o pèptids sintètics derivats del VHE representant epítops immunodominants de les proteïnes estructurals de l'ORF2 i ORF3 de les soques prototip birmana i mexicana. Ghabrah i col. (1998) en un estudi comparatiu de tests van observar que aquells que utilitzaven antigens recombinants derivats de l'ORF2 del VHE eren més sensibles per detectar IgG i IgM anti-VHE que els que utilitzaven proteïnes derivades de l'ORF3. A més, contra més llarga era la proteïna, tant de l'ORF2 com del ORF3, més sensible era el test. Un altre estudi comparatiu dels diferents EIAs utilitzats habitualment pels laboratoris davant un panel de mostres de sèrum va mostrar que la sensibilitat variava entre un 17% i un 100%, i que la concordància entre tests variava entre 0 i 89% (Mast i col., 1998). Aquest estudi suggereix que els tests disponibles actualment per la detecció d'anticossos anti-VHE són útils quan s'apliquen a pacients amb hepatitis agudes, sobretot en les zones considerades endèmiques, però la interpretació dels resultats obtinguts en estudis de seroprevalença és qüestionable.

El desenvolupament de les tècniques de detecció molecular va permetre l'aparició d'una nova tècnica de diagnòstic. L'amplificació per RT-PCR del genoma del VHE permet determinar la seva presència o absència en mostres, per exemple, de sèrum o femta. És una tècnica cara, però sensible, que es pot utilitzar com a prova confirmativa. Requereix especial atenció en el transport, manipulació i conservació de les mostres.

L'anàlisi s'ha de realitzar durant la fase aguda de la malaltia per evitar falsos negatius (Aggarwal i Krawczynski, 2000). Els criteris per un diagnòstic d'infecció aguda pel VHE són (Worm i col., 2002a):

- Detecció d'IgM,

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

- Detecció d'alts nivells d'IgG o increment del seu títol, inclús en absència d'IgM,
- Detecció de l'ARN del VHE.

La detecció d'IgG anti-VHE en nivells basals és indicació d'infecció pel VHE però no necessàriament d'infecció recent (Aggarwal i Krawczynski, 2000).

1.5. ZONOSI

1.5.1. La infecció natural en animals

L'any 1990 Balayan i col. (1990) van infectar porcs domèstics amb una soca del VHE d'origen humà procedent d'Àsia Central. En aquest moment va sorgir la possibilitat d'una zoonosi associada al VHE. Entre un 80% i un 100% dels porcs de granges comercials dels EUA presenten anticossos contra el VHE i la infecció habitualment es dona als 2-3 mesos de vida (Meng, 2003). Resultats similars s'han obtingut en d'altres regions, tant endèmiques com no endèmiques pel VHE als humans, suggerint que el VHE es troba de manera ubiqua a les poblacions de porcs de tot el món (Taula 1.4.).

Taula 1.4. Seroprevalença d'IgG anti-VHE en porcs de diferents regions geogràfiques. Extret de Meng, 2003.

Origen geogràfic	Granja	Edat	No. Positius/no. Analitzat (%)
EUA	A	6-12 setmanes	0/16 (0)
		20 setmanes	8/8 (100)
		26 setmanes	5/8 (63)
		Adults	14/25 (56)
	B	3-8 setmanes	0/24 (0)
		13 setmanes	10/12 (83)
		6 mesos	8/8 (100)
		Adults	16/17 (94)
	C	2 mesos	1/8 (13)
		3 mesos	8/8 (100)
4 mesos		4/8 (50)	
5 mesos a adults		16/16 (100)	
9 granges	6 mesos a 3 anys	90/90 (100)	
2 granges	Adults	20/25 (80)	
Espanya	6 granges	3 setmanes a 2 mesos	2/10 (20)
		5-6 mesos	7/24 (29)
		6 mesos a 4 anys	6/26 (23)

Taula 1.4. Seroprevalença d'IgG anti-VHE en porcs de diferents regions geogràfiques. Extret de Meng, 2003.

Origen geogràfic	Granja	Edat	No. Positiu/no. Analitzat (%)
Austràlia	2 granges	Barreja	12/40 (30)
	2 granges	16 setmanes	45 (92-95)
	Porcs salvatges	Desconeguda	15/59 (17)
Taiwan	10 granges	Barreja	102/275 (37)
Canadà (Quebec)	37 granges	Cries	82/310 (26)
	16 granges	Adults	34/90 (38)
Canadà (Ontàrio)	10 granges	Cries	1/230 (<1)
	4 granges	Adults	12/82 (15)
Canadà (5 províncies)	81 granges	6 mesos	594/998 (60)
Corea	Múltiple	1-2 mesos	6/40 (15)
		3-6 mesos	39/80 (49)
		Truges	12/20 (60)
Nepal		Barreja	18/55 (33)
Xina	A	1-2 mesos	9/21 (43)
	B	3-5 mesos	8/30 (27)
	C	6 mesos a adults	5/21 (24)
Tailàndia	A	1-2 mesos	0/20 (0)
		3-4 mesos	13/20 (65)
	B	6 mesos	7/10 (70)
		Truges	2/10 (20)
	C	Adults	1/5 (20)
	D	Truges	0/10 (0)
Vietnam	Desconegut	Desconegut	36%
Índia (1988)	Desconegut	Desconegut	102/137 (74)
Índia (1993)	Desconegut	Desconegut	53/97 (55)

A més dels porcs, altres animals presenten anticossos contra el VHE. Kabrane-Lazizi i col. (1999b) van trobar que aproximadament el 77% de les rates de Maryland, el 90% de les de Hawaii i el 44% de les de Louisiana eren positives per IgG anti-VHE. Al Japó, el 31,5% de les rates del gènere *Rattus norvegicus* i el 13,3% del gènere *Rattus rattus* presentaven

anticossos con el VHE (Hirano i col., 2003a). Aquesta alta prevalença podria indicar que els rosegadors podrien transmetre la infecció als porcs i viceversa, ja que aquests acostumen a trobar-se molt a prop de les granges (Meng, 2003).

Nombrosos estudis realitzats al Japó han mostrat l'existència d'anticossos contra el VHE en moltes espècies animals. S'ha detectat IgG anti-VHE en gats (Usui i col., 2004) amb un 33% d'animals positius, malgrat que no es va poder aïllar cap soca del VHE. També a aquest país Hirano i col. (2003b) estudiaren la seroprevalença en 20 espècies diferents de primats. Només 4 espècies del gènere macaca (*Macaca fuscata* –micos japonesos-, *Macaca mulatta* – micos *rhesus*-, *Macaca fascicularis* –micos *cynomolgus*- i *Macaca cyclopis* –mico taiwanès-) presentaven anticossos contra el virus amb proporcions del 36,2%, 3,6%, 10,5% i 100% respectivament. Aquests resultats suggereixen que el VHE està circulant entre els macacs de manera natural i que podrien actuar com a reservoris del virus. També ho podrien fer cérvols i porcs senglars, ja que el 2% dels primers i el 9% dels segons presenten anticossos contra el VHE (Sonoda i col., 2004). També a Austràlia s'ha confirmat que alguns porcs senglars presenten anticossos anti-VHE (Chandler i col., 1999).

En els últims anys s'han aïllat els agents que afecten aus responsables del síndrome de l'hepatitis-esplenomegàlia a Nord-Amèrica (Haqshenas i col., 2001) i de la malaltia del fetge i la melsa grans (*'big liver and spleen disease'*) a Austràlia (Payne i col., 1999), o HSS i BLSV respectivament (en anglès). La seqüenciació ha mostrat que són virus relacionats genèticament amb el VHE. Un estudi per determinar la seroprevalença del VHE aviar causant del HSS va revelar que al 71% de les granges d'aus estudiades i al 30% dels animals analitzats es detectaven anticossos contra el virus (Huang i col., 2002).

1.5.2. Soques del VHE d'origen animal

Meng i col. (1997) identificaren la primera soca del VHE d'origen porcí als EUA. Aquesta soca porcina compartia un 92% d'identitat nucleotídica a les seqüències parcials analitzades amb les altres 2 soques del VHE detectades també als EUA, en aquest cas soques humanes (Schlauder i col., 1998; Erker i col., 1999a). Des d'aquest primer aïllat, s'han identificat moltes més soques del VHE d'origen porcí. A Taiwan (Hsieh i col., 1999), aïllaren una soca porcina amb un 97,3% d'identitat nucleotídica a la regió amplificada amb una soca d'origen humà aïllada a partir d'un granger sense història recent de viatges que havia viscut molts anys a prop d'una granja de porcs a la mateixa zona. A Espanya (Pina i col., 2000), s'identificà una soca del VHE present en una mostra d'aigua residual d'un

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

escorxador a on mataven principalment porcs que compartia un 92,1% i 94% amb VH1 i VH2, 2 soques humanes aïllades també a la mateixa regió (Barcelona). També s'han identificat soques porcines a Nova Zelanda (Garkavenko i col., 2001), a Japó (Okamoto i col., 2001), a Holanda (van der Poel i col., 2001) i d'altres.

Tots els indicis obtinguts fins ara indiquen que les poblacions porcines estan infectades de manera generalitzada per soques del VHE pertanyents als genotips 3 i 4 i que aquestes infeccions són subclíniques. No s'ha trobat cap soca dels genotips 1 i 2 infectant de manera natural porcs. Recentment, Cooper i col. (2005) han identificat soques del VHE infectant porcs a Mèxic i Tailàndia pertanyents al genotip 3, mentre que les soques identificades a humans en aquestes regions es classifiquen dintre dels genotips 2 i 1 respectivament. És probable que únicament els genotips 3 i 4 tinguin potencial zoonòtic. A regions com la Índia (soques humanes del VHE de genotip 1) o la Xina (soques humanes del VHE majoritàriament del genotip 1 però algunes 4) les soques porcines identificades són del genotip 4.

Al Nepal s'ha descrit l'aïllament del genoma del VHE a partir de 4 rates. Totes les seqüències eren idèntiques, compartint entre un 95% i un 96% d'identitat amb 2 soques del VHE d'origen humà aïllades de 2 pacients els anys 1987 i 1994 també al Nepal (He i col., 2002). Aquestes dades no han estat confirmades. Aquest fet, conjuntament amb la incapacitat d'altres grups investigadors per aïllar soques del VHE d'origen murí, fan dubtar de la solidesa de les dades publicades en aquest estudi.

També s'ha aconseguit aïllar els agents responsables del síndrome de l'hepatitis-esplenomegàlia i del 'big liver and spleen disease' que afecten aus (Haqshenas i col., 2001; Payne i col., 1999). La seqüenciació ha mostrat que són virus relacionats genèticament amb el VHE i que entre ells presenten una identitat nucleotídica d'un 80% (Haqshenas i col., 2001). El virus responsable del primer comparteix entre un 50% i un 60% de la seqüència nucleotídica amb altres soques del VHE d'origen humà i porcí (Haqshenas i col., 2001). S'ha observat reacció creuada en estudis serològics amb Western Blot entre la proteïna truncada de l'ORF2 del virus del HSS i antisèrums del VHE d'origen humà (soca Sar55 i US-2), porcí (soca Meng) i del BLSV (Haqshenas i col., 2002). El virus responsable del segon, el BLSV, té un 62% d'identitat nucleotídica amb una soca del VHE d'origen humà i es pot transmetre a ous embrionats mitjançant inoculació (Payne i col., 1999).

1.5.3. Animals models

La majoria d'estudis dels mecanismes de patogenicitat i d'obtenció de vacunes contra el VHE es porten a terme en animals, principalment primats. Hi ha 5 criteris en funció dels quals es reconeix que un animal està infectat pel VHE (Balayan, 1993):

1. elevació patològica dels enzims hepàtics (alanina aminotransferasa –ALT- i isocitrat deshidrogenasa –ICD-)
2. alteracions morfològiques específiques del teixit hepàtic
3. detecció de l'agent viral en cèl·lules del fetge per tècniques d'immunofluorescència
4. excreció de partícules víriques en femta
5. resposta immune humoral contra el VHE

Entre els primats no humans els macacs *cynomolgus* i *rhesus* són els que més habitualment han estat susceptibles a la infecció per soques del VHE i els que han resultat més útils per l'estudi del virus. La majoria desenvolupaven infecció (aparició d'anticossos), molts patien hepatitis i ocasionalment alguns excretaven partícules víriques a la femta. Menys consistent ha estat la resposta dels tamarins i ximpanzés a la infecció, patint infecció en alguns casos i essent refractaris en d'altres, possiblement degut a diferències biològiques entre les diferents soques del VHE (Purcell i Emerson, 2001). Bradley i col (1987) van aconseguir infectar tamarins (*Saguinus mystax mystax*) i macacs *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) amb suspensions fecals que contenien la soca prototip birmana o la paquistaní. Després de passes seriats, l'adaptació del virus als macacs *cynomolgus* va ser més eficient que l'adaptació als tamarins, ja que mentre en els primers el període d'incubació es reduïa a cada passi i els nivells bioquímics d'enzims hepàtics s'incrementaven, als segons era al contrari, atenuant-se la malaltia produïda.

També s'ha estudiat la susceptibilitat d'altres espècies animals a la infecció per VHE. A principis dels 90s, el grup de Balayan va transmetre diferents soques del VHE d'origen humà a porcs (*Sus scrofa domestica*), xais i rates (Balayan i col., 1990; Karetnyi i col., 1993 i Usmanov i col., 1994). La susceptibilitat dels porcs a la infecció per VHE ha estat confirmada amb la detecció de soques del VHE d'origen porcí, malgrat que els resultats dels estudis d'infecció en porcs amb soques d'origen humà han estat variats, suggerint que el porc podria no ser un model adequat per l'estudi de certes soques del VHE.

S'ha confirmat la transmissió experimental del VHE d'origen humà a rates, però només a regions a on la infecció és endèmica a la població humana (Maneerat i col., 1996). Els intents realitzats als EUA per aïllar-lo a partir de rates o transmetre'l han resultat infructuosos (Purcell i Emerson, 2001).

1.5.4. La infecció experimental

Malgrat que la via d'exposició principal és la via oral, el virus pot ser transmès parenteralment (s'ha fet sota condicions de laboratori). La transmissió via oral s'ha aconseguit en alguns casos, però no en tots els estudis realitzats.

Tsarev i col. (1994a) van observar que el títol infeccions pel VHE mesurat via intravenosa era al menys 10000 vegades superior que quan l'administració era oral. Fent servir dilucions d'una suspensió de femta d'un pacient pakistaní infectat amb la soca Sar55 del VHE constataren que una dilució 10^{-1} de la suspensió administrada via oral no provocava malaltia en macacs *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*). En canvi, via intravenosa, eren infectives les dilucions de 10^{-1} a 10^{-5} . La inoculació de la soca del Pakistan a *cynomolgus* provocava virèmia i excreció del virus en femtes. Hi havia increment dels nivells dels enzims alanina aminotransferasa i isocitrat deshidrogenasa així com seroconversió. El desenvolupament de la resposta immune conduïa a la desaparició del virus en sang i femta, així com a la resolució de la malaltia entre 6 i 7 setmanes després de la inoculació del virus (Tsarev i col., 1993a). En primats no humans, el títol víric en 1 g de femta és aproximadament uns 3 logaritmes superior al títol víric en 1 ml de sèrum (Tsarev i col., 1994b).

Els nivells d'ALT i la resposta anti-VHE en els *cynomolgus* depenien de la quantitat de virus inoculats a l'animal, disminuint els valors a mesura que l'inòcul estava més diluït. És a dir, en infeccions experimentals en primats no humans la presentació clínica de l'hepatitis E és dosi dependent (Tsarev i col., 1994a) i la manifestació de l'hepatitis requereix dosis al menys 1000 vegades superiors a la dosi mínima necessària per la infecció (Tsarev i col., 1994b). Es desconeix si aquesta relació manifestació clínica-dosi infecciosa es manté en infeccions naturals.

Altres estudis amb *cynomolgus* han demostrat que animals amb infeccions subclíniques del VHE sense alteracions en els nivells d'ALT podien excretar quantitats del virus equivalents a les excretades per animals amb nivells d'ALT elevats. Els virus excretats eren viables i capaços de transmetre la infecció a altres animals. A més, els 4 animals infectats amb el VHE

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

excretat per un animal amb infecció subclínica desenvoluparen també infecció subclínica. Això va poder ser degut a un baix títol víric a l'inòcul, a canvis moleculars al virus que generessin un virus atenuat o a factors intrínsecs dels animals inoculats (Aggarwal i col., 2001). L'excreció de grans quantitats de VHE per individus amb infeccions subclíniques o asimptomàtiques els convertiria en reservoris pel virus i una de les causes responsables dels alts nivells d'anticossos anti-VHE identificats a algunes regions considerades endèmiques inclús en períodes entre brots.

Després de l'exposició al virus, la primera evidència d'infecció s'observa al fetge i seguidament es pot detectar el virus en sang, bilis i femta. Probablement el principal lloc de replicació del virus és el fetge, però se suposa l'existència d'un altre punt de replicació al tracte intestinal. Sembla que la lesió hepàtica produïda per la infecció per VHE es deu més a la resposta immune de l'hoste que no pas a l'efecte directe del VHE sobre els hepatòcits (Purcell i Emerson, 2001).

Tsarev i col (1995) inocularen el virus a femelles *rhesus* embarassades i no embarassades. Observaren que els paràmetres bioquímics, histològics i serològics entre els dos grups eren similars. Les femelles embarassades no desenvoluparen malaltia severa ni hi havia transmissió vertical de la infecció.

En general moltes espècies de primats han mostrat susceptibilitat a la infecció pel VHE, però en diferent grau: micos verds africans, ximpanzés, macacs *cynomolgus*, micos de nit (*owl monkeys*), macacs *rhesus*, tamarins i d'altres. Per moltes d'aquestes espècies els resultats obtinguts a diferents laboratoris han mostrat discrepàncies, possiblement per les diferències biològiques entre soques del VHE (Purcell i Emerson, 2001).

S'ha observat que la severitat de la malaltia depèn d'alguna manera de la soca del virus inoculada, o més probablement del genotip de la soca. La soca Mex14 (genotip 2) és més virulenta que la soca US-2 (genotip 3). La soca de Pakistan té una virulència intermitja (genotip 1) (Emerson i Purcell, 2003). En tots tres casos les infeccions produïdes són agudes i no progressen cap a cronicitat.

Les característiques de la infecció en micos es resumeixen en el següent gràfic:

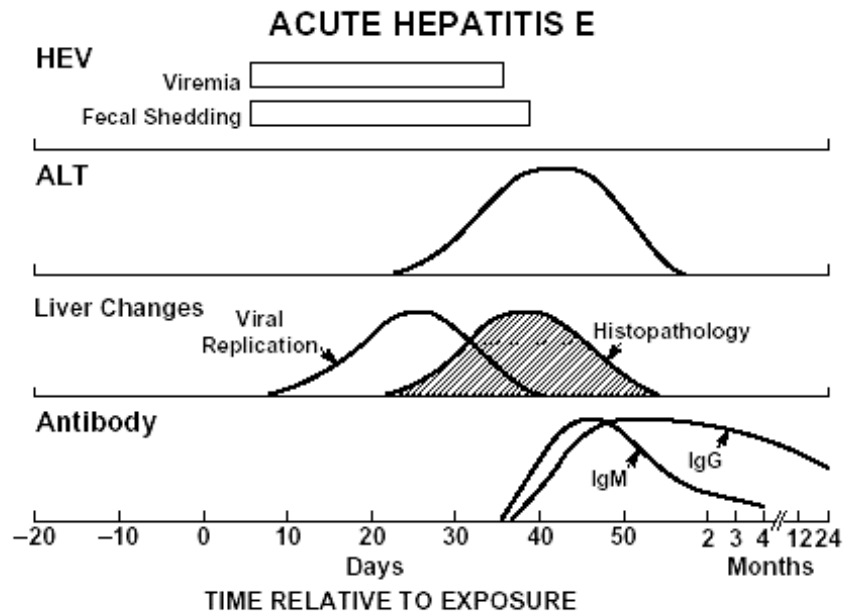


Figura 1.5. Curs de l'hepatitis E en primats no humans (extret de Purcell i Emerson, 2001 i basat en dades de McCaustland i col., 2000 i Tsarev i col., 1995).

A més dels primats no humans, s'han dut a terme estudis d'infectivitat en porcs. Balayan i col. (1990) reproduïren la infecció per VHE en porcs mitjançant la inoculació via intravenosa d'una soca d'origen humà que pertanyia al genotip 1. Observaren un desenvolupament de la infecció similar al que es dona en micos, però amb aparició de símptomes de la malaltia (icterícia), suggerint una major severitat de la malaltia en porcs. Cap dels animals inoculats amb el VHE neutralitzat amb sèrum amb anti-VHE va desenvolupar símptomes clínics. Posteriorment, Harbur i col. (2001) van inocular la soca US-2 del VHE d'origen humà i la soca Meng (soca d'origen porcí) a porcs. En aquest estudi van observar infecció per part de les 2 soques, però sense aparició de la malaltia. Tampoc en porcs ha estat possible reproduir l'alta mortalitat causada pel VHE en dones embarassades. La inoculació intravenosa de la soca porcina Meng en truges no va provocar transmissió vertical de la infecció a la descendència, únicament adquisició passiva d'anticossos que desapareixien cap als 2 mesos de vida (Kasorndorkbua i col., 2003).

També amb rates s'han obtingut resultats similars. Maneerat i col. (1996) van inocular rates Wistar amb una soca d'origen humà del VHE procedent del Nepal. Cap animal va

desenvolupar signes de la malaltia, però es detectà replicació del virus i alteracions histològiques al fetge, nòduls limfàtics i melsa atribuïbles a la infecció. Aquests resultats confirmaven estudis previs realitzats per Karetnyi i col. (1993).

1.5.5. Creuant barreres interespecífiques

Són nombrosos els estudis que s'han dut a terme per determinar si és viable la teoria que postula la transmissió a l'home de la infecció per VHE a partir d'animals infectats. A més, la manca d'un sistema adequat de cultiu cel·lular que permeti el creixement del VHE de manera eficient fa necessari l'ús de models animals susceptibles a la infecció per VHE per tal d'estudiar la patogenicitat del virus i avaluar possibles vacunes. Durant els últims anys s'han identificat soques del VHE infectant animals domèstics: porcs, cérvols, porcs senglars i aus. A més d'aquests animals, existeixen altres als que se'ls hi ha detectat anticossos anti-VHE, però no s'ha aconseguit aïllar una soca del VHE pròpia: gats, micos, vaques i d'altres.

Ja des dels anys 80 es van dur a terme estudis d'infectivitat en animals amb soques del VHE d'origen humà. Com es descriu a apartats anteriors, s'ha aconseguit transmetre la infecció amb soques del VHE d'origen humà a primats no humans com tamarins, macacs *cynomolgus* i *rhesus*, ximpanzés, a porcs domèstics, rates... Els resultats dels estudis d'infecció en porcs amb soques d'origen humà han estat variats. La inoculació d'una soca d'origen humà del genotip 1 aïllada a Àsia Central va provocar hepatitis bastant severa amb icterícia (Balayan i col., 1990), mentre que una soca d'origen humà dels USA (soca US-2 del genotip 3) provocà una patologia mínima (Meng i col., 1998a). No es va aconseguir la infecció amb les soques humanes de Pakistan i Mèxic malgrat que el títol víric de l'inòcul era equivalent a 10^5 MID (Meng i col., 1998a).

La primera soca porcina aïllada (soca Meng dels EUA) va ser transmesa a porcs, micos *rhesus* i a un ximpanzé (Halbur i col., 2001; Meng i col., 1998a; Meng i col., 1998b). Mentre que aquesta soca porcina va resultar ser atenuada en aquests receptors, la soca humana US-2 va resultar lleugerament més virulenta en porcs i micos *rhesus* però menys que altres soques d'origen humà que s'han caracteritzat en primats no humans (Halbur i col., 2001; Meng i col., 1998a; Meng i col., 1998b). Sembla que la soca humana US-2 i la porcina Meng són soques atenuades del VHE.

En els últims anys s'estan descrivint al Japó casos d'hepatitis agudes associades al consum de carn crua o poc feta de cérvol i porc senglar (Tei i col., 2003). Malgrat que no existeixen estudis de transmissió de les soques detectades, la detecció d'una mateixa

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

seqüència en mostres dels malalts i en restes no ingerits dels animals indiquen el pas de la infecció d'una espècie a l'altra i posen de manifest el risc associat al consum de possible reservoris del virus, especialment el consum de carn crua (Tei i col., 2003; Tei i col., 2004).

S'han realitzat experiments de transmissió via intravenosa del VHE d'origen aviar a gall dindis, micos *rhesus* i, molt recentment, porcs (Huang i col., 2004; Sun i col., 2004; Kasorndorkbua i col., 2005). S'ha observat transmissió de la infecció a gall dindis i porcs, amb virèmia i excreció del virus però sense símptomes de la malaltia. No va ser possible, però, infectar primats no humans amb una soca aviar del VHE.

1.6. Protecció contra el VHE

Els requisits fonamentals pel desenvolupament d'una vacuna no es limiten únicament a la capacitat que presenti de generar anticossos, sinó a la capacitat de generar una activitat neutralitzant àmplia (tant davant soques heteròlogues com homòlogues del patogen), immunitat a llarg termini i protecció contra la malaltia i la infecció (Worm i Wirnsberger, 2004). La vacunació amb partícules víriques atenuades o inactivades seria el millor sistema per imitar les infeccions naturals o experimentals i obtenir respostes humorals similars, però l'obtenció d'una vacuna d'aquest tipus no ha estat possible fins al moment, degut a la manca d'un sistema de cultiu cel·lular eficient per la replicació del VHE.

1.6.1. Immunoprofilaxis passiva

Consisteix en l'administració d'anticossos preformats en forma de plasma preparat a partir d'una barreja de plasmes d'individus en la fase de convalescència d'una malaltia. Tsarev i col. (1994) van administrar sèrum de macac obtingut durant la fase de convalescència d'una infecció experimental per VHE a altres macacs als que després se'ls hi va inocular la soca homòloga. Els anticossos subministrats van protegir contra l'hepatitis els animals. Aquests resultats suggereixen que l'administració d'anticossos anti-VHE podria protegir contra la malaltia. És poc probable, però, que la quantitat d'anticossos que es pugui obtenir a partir de sèrums humans, inclús a regions a on els brots pel VHE són habituals, sigui suficient per generar protecció contra la infecció, com s'ha observat en alguns estudis.

1.6.2. Vacunes

La manca d'un sistema eficient de cultiu cel·lular pel VHE no fa possible el desenvolupament de vacunes atenuades o inactivades. És per això que els estudis encaminats a la seva obtenció es basen en la generació de proteïnes recombinants o en vacunes d'àcids nucleics.

→ Proteïnes recombinants

Els estudis dirigits a l'obtenció de vacunes recombinants contra el VHE es concentren majoritàriament en la producció de proteïnes recombinants derivades de l'ORF2 del virus.

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

L'ORF1 codifica per proteïnes no estructurals i per tant aquestes no són bones dianes per la resposta immunitària humoral. La proteïna codificada per l'ORF3 és altament antigènica, però es desconeix si es troba o no a la superfície del virió. A més, estudis *in vitro* han demostrat que els anticossos generats contra aquesta no són neutralitzants (Tam i col., 1997). L'ORF2 és la proteïna que forma la càpside (sola o com a proteïna majoritària). És altament antigènica i neutralitzant (Emerson i Purcell, 2001).

S'han fet nombrosos estudis per caracteritzar els diferents epítops presents a l'ORF2, identificant un gran nombre d'aquests, però només un permet la neutralització del virus. Aquest epítop està format pels aa compresos entre el 578 i el 607 de la proteïna de la càpside de la soca Sar55. Aquest epítop es va identificar mitjançant un estudi de neutralització de la infecció per VHE en macacs *rhesus*. Schofield i col (2000) van observar que 2 anticossos monoclonals que reconeixien un fragment proteic que contenia els aa 112 a 607 de l'ORF2, però no reconeixien altres amb els aa 112 a 578 o menys, neutralitzaven la infecció provocada per la soca Sar55 en aquests animals. En canvi, anticossos monoclonals que reconeixien altres epítops no eren neutralitzants.

El sistema d'expressió de proteïnes més utilitzat actualment per l'obtenció d'antigens del VHE és la infecció de línies cel·lulars amb baculovirus recombinants, obtenint proteïnes solubles amb capacitat immunogènica (Yarborough, 1999).

Molts dels antigens derivats de l'ORF2 indueixen la formació d'anticossos, però no neutralitzen el virus. Existeixen 3 antigens de l'ORF2 neutralitzants que s'estan avaluant com a potencials vacunes:

- Proteïna recombinant de fusió denominada TrpE-C2. Derivada d'una soca birmana i formada per un fragment de l'enzim triptòfan sintetasa i l'extrem carboxiterminal de l'ORF2 (aa 221 a 660). És una proteïna expressada en *E. coli*. Dos macacs *cynomolgus* van ser vacunats amb la proteïna i posteriorment se'ls hi va inocular a un la soca homòloga i a l'altre la soca heteròloga Mex14. L'animal inoculat amb la soca homòloga no va desenvolupar ni malaltia ni infecció. L'animal inoculat amb la soca heteròloga Mex14 va patir la infecció del virus, però no la malaltia (Purdy i col., 1993).
- Proteïna recombinant de 55KDa. Derivada de l'ORF2 de la soca pakistaní Sar55 i expressada en cèl·lules d'insecte (*Spodoptera frugiperda*) infectades amb baculovirus recombinants. Correspon al fragment de l'ORF2 entre l'aa 112 i el 607. Micos *rhesus* immunitzats amb aquesta vacuna resultaren

protegits contra la malaltia quan se'ls inoculava la soca homòloga. La protecció contra la infecció s'obtenia si s'administraven 2 dosis de la vacuna als animals (Tsarev i col., 1994b). En un segon estudi s'administraren 2 dosis de la vacuna a micos *rhesus* i se'ls hi van inocular via intramuscular 300.000 MID₅₀ de la soca del VHE homòloga (Sar55) o 100.000 MID₅₀ de la soca heteròloga Mex14. Els animals van resultar protegits contra la malaltia, però no contra la infecció, possiblement pels alts títols vírics inoculats (Tsarev i col., 1997). Estudis posteriors han mostrat que aquesta vacuna confereix protecció davant la malaltia provocada per soques homòloques (genotip 1) i heteròloques (genotips 2 i 3) (Purcell i col., 2003).

Aquesta vacuna desenvolupada pels National Institutes of Health (NIH) dels EUA és l'única contra el VHE que ha passat els assajos clínics de Fase I i actualment està essent assajada al Nepal (Fase II/III).

- Proteïna recombinant de 62KDa denominada r62K. Derivada de l'ORF2 d'una soca birmana (aa 112-660) i en cèl·lules d'insecte (*Spodoptera frugiperda*) infectades amb baculovirus recombinants. Tres micos *cynomolgus* van ser vacunats i posteriorment se'ls inoculà la soca heteròloga Mex14 (1.000 MID₅₀). Dos dels animals no van mostrar signes d'infecció ni malaltia. El tercer va patir una infecció limitada retardada (Yarborough, 1999).

→ ADN

Plàsmids purificats d'ADN que contenen seqüències codificants amb activitat immunogènica poder ser inoculats per via intramuscular i, de manera similar a com passa en infeccions naturals, l'antigen pot ser expressat en cèl·lules hepàtiques en la seva forma original. Es genera resposta humoral i cel·lular (Kamili i col., 2004).

He i col (1997) van dissenyar un plàsmid (denominat pJHEV) que contenia tot el fragment de l'ORF2 del VHE juntament amb un vector d'expressió i el van inocular per via intramuscular a ratolins. En un primer experiment, després de la inoculació de 3 dosis de vacuna, el 80% dels ratolins havien seroconvertit i els nivells d'anticossos es mantingueren estables durant 12 mesos. En un segon experiment, el 100% dels ratolins havien seroconvertit 9 setmanes després de la primera dosi de vacuna (3 setmanes després de l'última dosi) (He i col., 1997). La producció d'anticossos va ser alta i en un període de temps inferior al període d'incubació en infeccions naturals (Worm i Wirnsberger, 2004). Un estudi

Capítol 1. El Virus de l'Hepatitis E.

més recent va avaluar l'eficàcia d'una vacuna d'ADN que contenia la seqüència completa de l'ORF2 d'una soca birmana (Kamili i col., 2002). Es van vacunar 4 macacs *cynomolgus* amb 4 dosis consecutives via intravenosa. Tots 4 animals desenvoluparen anticossos contra el VHE, encara que la resposta immune va ser modesta. Dos dels 4 animals van mostrar protecció contra la infecció per la soca heteròloga Mex14. Els altres 2 animals van patir infecció i malaltia. No s'observà increment dels nivells d'anticossos amb les vacunacions successives.

Aquesta mateixa vacuna ha estat inoculada recentment mitjançant la tècnica Gene Gun (Kamili i col., 2004). Aquesta tècnica consisteix a administrar via intradèrmica plàsmids amb seqüències immunogèniques de l'agent a combatre sota el control d'un promotor adequat. No s'utilitzen agulles i s'assegura que la vacuna entri en contacte amb una gran quantitat de cèl·lules del sistema immune de les capes intermèdies de la pell. Els animals vacunats amb aquesta tècnica van seroconvertir, observant-se un increment en els nivells d'anticossos després de cada dosi administrada amb un descens posterior. La inoculació de la soca heteròloga Mex14 no va provocar ni malaltia ni infecció en aquests animals. En canvi, cap dels animals vacunats per via intramuscular va seroconverir fins després de la inoculació de la soca Mex14, patint malaltia i infecció.

→ Plantes transgèniques

Recentment s'ha creat una planta de tomàquet transgènica dissenyada per actuar com a vacuna oral contra el VHE (Ma i col., 2003). Conté insertat un fragment de l'ORF2 del VHE (aa 394 a 604) que havia estat clonat dintre d'un vector d'expressió en plantes i transformat mitjançant *Agrobacterium tumefaciens*. S'ha demostrat l'expressió de la proteïna codificada per l'insert i la seva antigenicitat en teixits de tomàquets transgènics, però en nivells baixos.

