

Capítol 4. Reservoris animals del VHE.



4.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

Des de la identificació l'any 1983 de l'agent causal de les epidèmies d'hepatitis no-A, no-B a països subdesenvolupats (Balayan i col., 1983) i la confirmació de què aquest era el mateix agent que causava els casos esporàdics de la malaltia (Chauhan i col., 1992), un dels objectius dels investigadors ha estat determinar a on es manté el virus durant els períodes interepidèmics, apareixent únicament de manera esporàdica. L'any 1990, el grup del Dr. Balayan aconseguí infectar porcs domèstics amb una soca del VHE d'origen humà (Balayan i col., 1990). Amb aquests primers assajos d'infectivitat en animals es generalitzà la hipòtesis de l'existència de reservoirs animals pel VHE.

Estudis serològics realitzats en diferents poblacions animals mostraren la presència d'IgG anti-VHE en moltes d'elles. Es va observar que el VHE es troba de manera generalitzada a les poblacions porcines de països com els EUA, Austràlia, Tailàndia, Vietnam, Canadà, Xina, Japó..., considerats molts d'ells no endèmics pel virus. A Espanya, en un estudi anterior del nostre grup centrat a granges porcines de l'àrea de Barcelona s'observà una seroprevalença d'un 25% (Pina i col., 2000). L'any 1997, Meng i col. identificaren la primera soca del VHE aïllada a partir de mostres porcines als EUA. Poc després s'aïllaren, també als EUA, 2 soques del virus a partir de mostres de sèrum de pacients amb hepatitis agudes. La comparació de les seqüències completes porcina i humanes va mostrar una identitat nucleotídica d'un 92% (Erker i col., 1999a). Durant els últims anys s'han identificat nombroses soques del VHE d'origen porcí. En general s'ha observat que les soques porcines i humanes localitzades en una mateixa àrea geogràfica són molt similars, més que les humanes o les porcines de diferents regions. Al Japó la soca porcina SwJ13-1 i la humana HE-JA1 compartien un 99,8% de la seqüència nucleotídica de l'ORF1 i un 100% de la de l'ORF2 i l'ORF3 (Nishizawa i col., 2003). A Espanya també s'identificà una soca d'origen porcí (E11) amb un 92,1 i 94,0% d'identitat nucleotídica en un fragment de 304 nt amb VH1 i VH2, soques d'origen humà causants d'hepatitis agudes a Barcelona (Pina i col., 2000).

També s'ha estudiat la presència d'anticossos contra el VHE a rates, ovelles, vaques, cabres, gossos, micos, pollastres... A més de les soques porcines, s'han identificat soques infectant cérvols, porcs senglars, aus i rosegadors. He i col. (2002) identificaren una soca del VHE aïllada a rosegadors al Nepal, amb una identitat nucleotídica d'entre 95% i 96% amb 2 soques d'origen humà també del Nepal. Malgrat els esforços realitzats per molts investigadors no ha estat possible aïllar més soques murines del VHE i es considera la possibilitat de que aquests resultats del Nepal no siguin fiables. Les soques del VHE d'origen

Capítol 4. Reservoirs animals del VHE.

aviar identificades fins al moment presenten més diferències respecte a les soques humanes i porcines. La seqüenciació parcial d'una d'aquestes soques avians va mostrar una identitat nucleotídica d'entre un 55% i un 62% amb altres soques d'origen humà i porcí (Haqshenas i col, 2001).

Els objectius d'aquest capítol van ser:

- * Estudiar la seroprevalença (presència d'IgG) del VHE en poblacions porcines d'una zona considerada no-endèmica pel virus
- * Identificar soques del VHE d'origen porcí excretades en femta
- * Estudiar la presència de soques del VHE en llots d'escorxador
- * Realitzar un estudi preliminar de la presència del VHE en poblacions bovines
- * Caracteritzar les soques animals trobades

4.2. MATERIALS I MÈTODES

4.2.1. ESTUDI DE LA PRESENCIA DEL VHE EN POBLACIONS ANIMALS DE GRANGES

Amb l'objectiu d'estudiar la presència del VHE en poblacions d'animals domèstics i el possible paper que aquests juguen com a reservoirs del VHE, es va dur a terme l'anàlisi de diferents tipus de mostres animals. Algunes mostres procedien de diferents granges de cria d'animals domèstics (porcs i vaques) i d'altres van ser recollides a un escorxador. L'estudi de les mostres animals es va realitzar amb la col·laboració de la Dra. Margarita Martín, del departament de Sanitat i Anatomia Animals del CReSA (UAB).

4.2.1.1. Mostres d'origen porcí

4.2.1.1.1. Mostres de sèrum

Es van recollir mostres de sèrum de 3 granges porcines (A, B, C) de l'àrea de Barcelona (Taula 4.1.). Les mostres provenien d'animals d'al·letament (entre 3 i 8 setmanes), d'animals d'encebament (unes 15 setmanes) i d'animals de cria que havien tingut cap, un o múltiples parts. S'analitzaren un total de 73 mostres de sèrum de porc. Es van mantenir congelades a -80°C fins el moment del seu anàlisi. Les mostres van ser cedides per la Dra. Margarita Martín de la UAB.

Taula 4.1. Mostres de sèrum porcí analitzades.

Grup		Granja A	Granja B	Granja C	Total
Garrins	3 setmanes	3	2	10	15
	5-6 setmanes	3	2	10	15
	8-9 setmanes	2	1	10	13
Animals d'encebament	10-22 setmanes	0	0	10	10
Truges	nul·líparas	2	1	5	8
	primíparas	0	0	3	3
	múltiples	1	1	7	9
Total		11	7	55	73

Capítol 4. Reservoirs animals del VHE.

Aquestes mostres van ser analitzades per determinar la presència d'anticossos anti-VHE mitjançant la tècnica ELISA i del genoma del virus per RT-PCR. Els estudis serològics es van realitzar a l'Hospital General Universitari Vall d'Hebron pel grup del Dr. Jardí.

4.2.1.1.2. Mostres de femta

Es van analitzar mostres de femta de les 3 granges porcines (A, B, C). Es recolliren un total de 68 mostres (Taula 4.2.). Algunes d'elles es recolliren directament com a barreja de femtes de diferents animals (*pools*). Altres provenien d'un únic animal, però per analitzar-les es formaren *pools* de femtes d'entre 2 i 5 animals de la mateixa edat i granja. Les mostres del grup d'animals no reproductors de la granja C es van dividir per edats i les mostres de femta del grup de truges es van classificar segons el número de parts que havien tingut. Les mostres es van mantenir a 4°C si el procés de concentració de les partícules víriques es feia immediatament després de l'arribada de les mostres al laboratori o a -10°C si la concentració es feia posteriorment.

Taula 4.2. Mostres de femta porcina analitzades.

Grup	Granja A	Granja B	Granja C	Total
Animals no reproductors	5 ^a	5 ^a	10 (3 setmanes) ^c	46
			10 (5 setmanes) ^c	
			10 (8 setmanes) ^c	
			6 (15 setmanes) ^d	
Truges	4 ^b	4 ^b	5 nul·líparas ^e	22
			3 primíparas ^d	
			6 múltíparas ^e	
Total	9	9	50	68

^a Mostres recollides com a *pools* de femta de 10-15 animals

^b Mostres recollides com a *pools* de femta de 5 femelles

^c Algunes mostres són d'un sol animal, altres són *pools* de varis animals

^d Mostres recollides com a *pools* de femta de varis animals

^e Cada mostra correspon a un sol animal

Les mostres de les granges A i B ja es recolliren com a barreja de femta de diferents animals, analitzant-se cada mostra individualment. Algunes mostres de la granja C es recolliren com a barreja de femta de diferents animals i altres com a femta corresponent a un únic animal. Al laboratori s'agruparen les mostres segons edat i nombre de parts, formant

12 barreges: 2 barreges pels animals de 3 setmanes, 2 pels de 5 setmanes, 2 pels de 8 setmanes, 2 pels de 15 setmanes (encebament), 2 barreges per les mostres de truges múltiples i una per les truges nul·líparas i 1 més per les primíparas. Aquestes barreges van ser processades i analitzades per RT-PCR per determinar la possible excreció del VHE per part dels animals.

4.2.1.2. Mostres d'origen boví: mostres de femta

Existeixen poques dades sobre la infecció del VHE en poblacions vacunes. Es va realitzar un estudi preliminar de la infecció del VHE en aquestes poblacions mitjançant l'anàlisi de mostres de femta de 3 granges. Les mostres van ser estudiades per RT-PCR per determinar la presència o absència del genoma víric. No es van realitzar estudis serològics perquè no es disposava d'una tècnica ELISA optimitzada per detectar el VHE en mostres de sèrum de vaca. Les mostres van ser recollides per la Dra. Marga Martí i pel veterinari Jordi Roig.

Es van recollir mostres de femta de 3 granges (D, E, F) de l'àrea de Barcelona. Les mostres arribaven refrigerades al laboratori i eren processades immediatament o bé es mantenien a -10°C fins el moment del processament. Algunes de les mostres corresponien a femtes d'un únic animal i altres a femtes barrejades de diferents animals. Al laboratori algunes de les mostres individualitzades s'agruparen en *pools* de mostres d'entre 1 i 6 animals, tots de la mateixa edat i granja.

De la granja D es van recollir 5 mostres de vedelles de 3-6 mesos, 6 de 6-18 mesos, 1 mostra de vedells d'encebament de 4 mesos i 3 de vedells de 10-11 mesos. En total eren 15 mostres que es van analitzar en forma de 4 *pools* segons sexe i edat.

De la granja E inicialment es van recollir 10 mostres de vaques adultes, analitzades en 2 barreges, i 2 mostres de vedells de 2 mesos, analitzades individualment. En posteriors mostrejos es recolliren 10 mostres més, 4 d'elles corresponents a animals d'entre 3 i 5 mesos, que s'analitzaren independentment. En total s'analitzaren 22 mostres, en forma de 2 *pools* i 12 mostres individuals.

De la Granja F es recolliren 4 mostres de les quals es desconeix l'edat. S'analitzaren individualment.

4.2.1.3. Determinació de la presència d'IgG anti-VHE en mostres de sèrum de porc

Al igual que per l'anàlisi d'algunes de les mostres humanes de sèrum, per les mostres de sèrum de porc es va utilitzar el kit Abbott HEV EIA (Abbott, North Chicago, IL, USA) amb algunes modificacions respecte a les instruccions del proveïdor. Degut a què l'antigen que presentava el kit estava dissenyat a partir de soques del VHE d'origen humà es va afegir un pas de contacte entre l'antigen i l'anticòs a 4°C durant tota la nit abans de la primera incubació a 40°C. Els rentats amb aigua destil·lada es van substituir per rentats amb PBS-Tween. L'anticòs secundari utilitzat era un anticòs de cabra anti-IgG porcines conjugat amb l'enzim peroxidasa amb una dilució de treball 1:1000.

Els controls positius i negatius utilitzats havien estat cedits pel Dr. R.H. Purcell i la Dra. S.U. Emerson. Eren sèrums porcins preimmune (control negatiu) i hiperimmune (control positiu).

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

Les mostres de femta van ser processades amb l'objectiu de concentrar les partícules víriques presents en un volum petit. Es va seguir el procediment descrit a l'apartat 3.2.3.2.2.2.2., amb el qual es concentraven les partícules presents en 1 g de femta en 100 µl de PBS 1x mitjançant elució amb glicina i ultracentrifugació. En alguns casos les mostres arribaven al laboratori com a barreja de femta de diversos animals, mentre que en d'altres casos les mostres s'agruparen en *pools* segons granja i edat al laboratori abans de la concentració de les partícules víriques. Els concentrats obtinguts es van conservar congelats a -80°C.

4.2.1.5. Extracció i amplificació dels àcids nucleics dels concentrats vírics

L'extracció dels àcids nucleics es va fer tal i com es descriu a l'apartat 2.2.1.4.1., partint de 25 µl de concentrat víric i eluint amb 25 µl de tampó d'elució. Es van preparar dilucions 1:10 de cada extracció amb el mateix tampó d'elució. Els àcids nucleics extrets es conservaren congelats a -20°C.

S'analitzaven per retrotranscripció 5 µl de l'ARN extret de les mostres i 5 µl de les dilucions 1:10, corresponent a 5 µl i 0,5 µl de sèrum i $5 \cdot 10^{-2}$ i $5 \cdot 10^{-3}$ g de femta. Els encebadors utilitzats van ser els descrits a la Taula 2.3. que permetien l'amplificació d'una regió de l'ORF2 (apartat 2.2.1.4.2.2).

Algunes de les mostres positives per aquest primer assaig van ser analitzades amb els encebadors que amplificaven una regió de l'ORF1 (apartat 2.2.1.4.2.).

4.2.1.6. Seqüenciació dels fragments amplificats

Per confirmar els resultats positius obtinguts per PCR es va procedir a seqüenciar els fragments amplificats. La seqüenciació requeria una purificació prèvia del producte de PCR, una PCR de seqüenciació i una precipitació del producte d'aquesta PCR. Aquests processos estan descrits a l'apartat 2.2.1.5. En el cas dels amplificats de l'ORF1 obtinguts, la seqüenciació es va fer de la banda obtinguda a la RT-PCR i va requerir la purificació a partir d'un gel d'agarosa degut a l'aparició de bandes inespecífiques (apartat 2.2.1.5.1.2.). En aquest cas els encebadors utilitzats a la PCR de seqüenciació van ser HEVORF1con-s1 i HECORF1con-a1, a una concentració de 3,2 pmol/µl.

4.2.1.7. Anàlisi de les seqüències

Les seqüències obtingudes van ser comparades a les existents als bancs de dades tal i com es descriu al capítol 2, utilitzant el programa BLAST del NCBI. L'anàlisi filogenètica de les regions seqüenciades es realitzà amb els programes del software PHYLIP i la visualització de l'arbre va ser creada amb el programa TREEVIEW 1.5.

Per la comparació de les seqüències obtingudes, a més de les utilitzades als capítols anteriors (Taula 2.8.), s'afegiren d'altres aïllades de porc, porc senglar i cérvol (Taula 4.3.).

Capítol 4. Reservoirs animals del VHE.

Taula 4.3. Nombre d'accés al GENBANK de les seqüències del VHE d'origen animal utilitzades per realitzar les comparacions i els estudis filogenètics .

Lloc, soca		ORF1	ORF2
Holanda,	Holanda1	AF336009	AF336294
	Holanda2	AF336001	AF336290
Regne unit,	Regne Unit1	-	AF503511
	Regne Unit2	-	AF503512
	Regne Unit3	AJ315768	-
Canadà,	Canadà	AY115488	
Japó,	Japó ^{3a}	AB180054	-
	Japó ^{4b}	AB114179	-
Nova Zelanda,	Nova Zelanda	AF215661	AF200704
Argentina,	Argentina	-	AY286304
Mèxic,	Mèxic	AF521654	-
Austràlia,	Austràlia	AF521653	-
Kirguizistan,	Kirguizistan	AF455784	

^a VHE aïllat de porc senglar

^b VHE aïllat de cérvol

4.2.2. PRESENCIA DEL VHE EN MOSTRES DE LLOTS D'ESCORXADOR I ESTUDI DE LA SEVA VARIABILITAT

L'aigua residual generada als escorxadors conté contaminació vírica procedent dels animals que han passat per les seves instal·lacions. Ja en un estudi anterior a Barcelona es va detectar el VHE en una mostra d'aigua residual procedent d'un escorxador a on es sacrificaven porcs (Pina i col., 2000).

Els llots estudiats provenien de la decantació dels materials que es trobaven en l'aigua residual generada a l'escorxador. Els biosòlids originats per aquesta decantació passaven a una cubeta a on s'acumulaven i es deixaven assecar. Les mostres es van recollir durant la fase d'acumulació i assecat, un cop passada la fase de decantació i floculació orgànica. El seu anàlisi permetia trobar contaminacions procedents d'animals que havien passat per la planta en moments diferents i que pertanyin a granges diferents. Aquests anàlisis aporten

una visió global de la presència del virus a les poblacions porcines i del potencial efecte contaminant dels biosòlids generats, com per exemple per la seva dispersió sobre camps de conreu.

També es va estudiar la variabilitat present en la mostra que resultà positiva per veure si hi havia una sola soca o moltes. La detecció simultàniament de molts aïllats del VHE en una mateixa mostra podria suggerir l'existència de diferents soques del virus i la seva distribució generalitzada entre les diferents poblacions porcines.

4.2.2.1. Mostres d'escorxador

Es van analitzar un total de 4 mostres recollides durant setmanes diferents per estudiar la presència o absència del VHE i la possibilitat de què una o més de les diferents poblacions de porcs que havien passat per la planta estiguessin infectades pel VHE.

4.2.2.2. Concentració de les partícules víriques presents a les mostres d'aigua escorxador

El protocol emprat va ser el mateix que s'utilitzava per concentrar les partícules presents a mostres de femta descrit a l'apartat 3.2.3.2.2.2. Les partícules víriques eren eluïdes en 100 µl de PBS 1x i conservades a -80°C fins el moment de l'anàlisi.

4.2.2.3. Extracció i amplificació dels àcids nucleics presents a les mostres

L'extracció dels àcids nucleics dels concentrats vírics es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 2.2.1.4.1., partint de 25 µl de partícules víriques i eluint els àcids nucleics en 25 µl de tampó d'elució. També es van preparar dilucions 1:10 amb el mateix tampó d'elució. Les extraccions es van conservar a -20°C fins el moment de l'anàlisi.

L'amplificació dels àcids nucleics es va fer mitjançant la tècnica RT-PCR descrita a l'apartat 2.2.1.4.2.2. del capítol 2. Es va estudiar el fragment de la seqüència del VHE de l'ORF2 originat mitjançant l'ús dels encebadors que apareixen a la Taula 2.3.

4.2.2.4. Clonació dels amplificats obtinguts

El producte de la PCR de la mostra que va resultar positiva va ser clonat per veure la variabilitat present. La clonació es va fer tal i com es descriu a l'apartat 2.2.2.2. EL producte de la RT-PCR seminiada es va purificar per tal de poder lligar-lo al vector pGEM-T Easy. Una alíquota d'un creixement de la soca DH5 d'*E.coli* en estat competent es va transformar amb el purificat i s'incubà ON a 37°C en plaques de LB amb IPTG, amp i X-gal. Els clons blancs o blanc-blaus es van repicar en plaques noves i aquestes es van mantenir a 4°C.

4.2.2.5. Anàlisi de la seqüència dels clons

Per comprovar la presència de l'insert en els clons repicats es va realitzar una PCR amb els encebadors dels promotors T7 i SP6 presents al vector. Els tubs de PCR amb la barreja van ser inoculats, amb l'ajuda d'escuradents estèrils, a partir de les estries dels clons aïllats.

Deu dels clons amb insert van ser seqüenciats. Els productes de l'amplificació amb els encebadors del vector van ser purificats i seqüenciats tal i com es descriu a l'apartat 2.2.2.2.4. La PCR de seqüenciació es va realitzar amb els mateixos encebadors T7 i SP6, a concentració 3,2 pmols/ μ l. Després de la precipitació dels productes les seqüències van ser analitzades als Serveis Científico-Tècnics de la UB.

La comparació de les seqüències es va fer amb les soques descrites a les taules 2.8 i 4.3.

4.3. RESULTATS

4.3.1. PRESENCIA DEL VHE EN POBLACIONS ANIMALS DE GRANGES

4.3.1.1. Poblacions porcines

4.3.1.1.1. Detecció d'IgG anti-VHE

S'analitzaren un total de 73 mostres de sèrum pertanyents a 3 granges diferents. Cap de les mostres de sèrum de les granges A i B presentava IgG anti-VHE. De les 55 mostres procedents de la granja C, 10 presentaven anticossos contra el virus. Els resultats es mostren a la Taula 4.4. Cap animal de 8 setmanes o menys havia seroconvertit en el moment de la presa de la mostra de sèrum.

Taula 4.4. Presència d'IgG anti-VHE en mostres de sèrum d'origen porcí de la granja C.

Grup animal		Animals amb IgG/animals analitzats	% positius
Garrins,	3 setmanes	0/10	0%
	5 setmanes	0/10	0%
	8 setmanes	0/10	0%
Animals d'encebament,	15 setmanes	4/10	40%
Truges,	nul·líparas	2/5	40%
	primíparas	1/3	33,3%
	multíparas	3/7	42,8%
Total		10/55	18,2%

La seroprevalença total observada entre els 73 animals analitzats va ser d'un 13,7%, mentre que la de la granja C va ser d'un 18,2%.

4.3.1.1.2. Detecció de l'ARN del VHE

Les mostres de sèrum i de femta de porc van ser analitzades per RT-PCR per estudiar la possible virèmia i excreció de VHE per part dels animals. Cap de les mostres de sèrum

Capítol 4. Reservoirs animals del VHE.

analitzada presentava el virus. En quant a l'excreció del virus, mentre que a les granges A i B no es detectà la seva presència, a la granja C es detectaren *pools* de femtes amb partícules víriques (Taula 4.5.). Sis dels 12 *pools* d'aquesta granja analitzats presentaven amplificació quan s'utilitzaven els encebadors per amplificar la regió de l'ORF2.

Taula 4.5. Presència del genoma del VHE en *pools* de femta porcina procedents de la granja C.

Granja C		<i>Pools positius/ pools analitzats</i>
Garrins	3 setmanes	1/2
	5 setmanes	1/2
	8 setmanes	2/2
Animals d'encebament	15 setmanes	1/2
Truges	nul·líparas	0/1
	primíparas	1/1
	multíparas	0/2
Total		6/12

No s'observà cap grup animal a on no hi hagués excreció del virus, però els nivells d'excreció a les edats joves semblaven més alts que a les edats adultes. Dos dels *pools* que havien donat positiu per la regió de l'ORF2 van ser també analitzats per la regió de l'ORF1 amb l'obtenció de 2 seqüències que diferien en 1 nt.

4.3.1.1.3. Estudi filogenètic del VHE d'origen porcí

4.3.1.1.3.1. ORF2

La seqüenciació dels amplificats obtinguts a partir de l'ORF2 va mostrar l'existència d'una única seqüència a tots els *pools* de mostres de la granja. Aquesta seqüència va ser denominada Por1. La màxima homologia dintre dels 101 nt de la regió ORF2 es donava amb la soca grega Grecia2, amb 94 nt iguals (93,1%), seguida de la soca trobada a Nancy amb 92 nt idèntics (91,1%). Amb les altres soques identificades a Barcelona a partir d'aigua residual i de mostres clíniques pròpies del genotip 3, el nombre de nucleòtids que coincidien era lleugerament inferior, variant entre 85 nt (amb BCN4) i 90 nt (amb BCN5/13, BCN6, BCN20, BCN3 i BCN16 i VH3), és a dir, entre un 84,1% i un 89,1%. Amb BCN10 la identitat

Capítol 4. Reservoirs animals del VHE.

era únicament d'un 80,2% (81 nt). Amb les soques representatives dels altres genotips utilitzades en els estudis filogenètics, la coincidència era inferior: entre 75,2% i 80,2% amb les soques del genotip 1, un 78,2% amb el genotip 2 i entre 77,2 i 80,2% amb les del genotip 4 (Taula 4.6.).

En l'estudi de la seqüència de la soca porcina trobada es van incloure altres soques d'origen porcí presents als bancs de dades. En aquest cas la comparació es va fer amb 98 nt perquè algunes seqüències no permetien l'ús del fragment de 101 nt. Totes aquestes soques procedien de regions considerades no-endèmiques pel VHE, ja que no es va localitzar cap soca procedent d'alguna regió endèmica que tingués la seqüència del fragment comparat disponible. S'observà que les soques més similars eren les que s'havien aïllat a Europa (Holanda i Regne Unit) amb entre un 88,8% i un 92,8%. Les altres soques aïllades a Amèrica del Nord, Amèrica del Sud i Nova Zelanda presentaven més diferències nucleotídiques, amb una identitat màxima de 84,3% amb la soca canadenca. La similitud amb la soca del Kirguizistan era intermèdia, amb 86 nt igual (87,7%).

La seqüència d'aa de Por1 obtinguda del fragment amplificat de l'ORF2 era idèntica a la de la majoria de soques aïllades a Barcelona, com per exemple VH2, i que es mostren a la Figura 3.2. del capítol 3.

4.3.1.1.3.2. ORF1

Dos dels *pools* de femtes van ser analitzats amb els encebadors de l'ORF1. Es van obtenir 2 seqüències gairebé idèntiques, Por2 i Por3, amb un únic nucleòtid de diferència. La soca més similar, com ja s'havia observat amb el fragment de l'ORF2, era Grècia2, amb 223 (92,1%) i 222 nt (91,7%) respectivament. Respecte a les soques clíniques autòctones aïllades a Barcelona (VH1 a VH4) hi havia entre 193 (79,7%) i 205 nt (84,7%) idèntics. VH5 presentava més diferències, amb 180 (74,4%) i 181 nt (74,8%) iguals respectivament. No va ser possible comparar les 2 seqüències de la regió de l'ORF1 amplificades amb seqüències aïllades a partir d'aigua residual de Barcelona perquè no es disposava de les seqüències d'aquestes últimes. Amb els membres dels altres genotips comparats els valors d'identitat nucleotídica no superaven el 79%, variant entre un 74,0% i un 79,3% (Taula 4.6.).

També es van comparar les seqüències Por2 i Por3 amb les seqüències d'altres soques del VHE d'origen animal, principalment porcí. La soca més propera era una aïllada al Regne Unit (Regne Unit3), amb un 89,2% d'identitat. La identitat amb altres soques oscil·lava entre

Capítol 4. Reservoirs animals del VHE.

un 83,0% i un 81,0%, a excepció de la soca porcina dels EUA, Sw USA, que només coincidí en un 77,7% amb Por2 i en un 78,1% amb Por3.

Taula 4.6. Comparació de les regions amplificades de l'ORF2 i ORF1 de les seqüències d'origen porcí del VHE aïllades a Barcelona i altres soques pertanyents als diferents genotips descrits. La comparació del fragment de l'ORF2 s'ha realitzat sobre 101 nt en les soques humanes i 98 en les soques animals. La del fragment de l'ORF1 s'ha fet sobre 242 nt en tots els casos. En cursiva es mostren les seqüències d'origen animal.

Soques	ORF2	ORF1	
	<i>Por1</i>	<i>Por2</i>	<i>Por3</i>
VH1	89 (88,1)	204 (84,3)	205 (84,7)
VH2	89 (88,1)	200 (82,6)	201 (83,0)
VH3	90 (89,1)	193 (79,7)	194 (80,2)
VH4	89 (88,1)	198 (81,8)	199 (82,2)
VH5	80 (79,2)	180 (74,4)	181 (74,8)
BCN3	90 (89,1)	-	-
BCN4	85 (84,1)	-	-
BCN5/13	90 (89,1)	-	-
BCN10	81 (80,2)	-	-
BCN12	89 (88,1)	-	-
BCN15	88 (87,1)	-	-
BCN16	90 (89,1)	-	-
BCN19	88 (87,1)	-	-
Grècia1	92 (91,1)	201 (83,0)	202 (83,5)
Grècia2	94 (93,1)	223 (92,1)	222 (91,7)
Itàlia	86 (85,1)	195 (80,6)	196 (81,0)
Àustria	85 (84,1)	190 (78,5)	191 (78,9)
Regne Unit1	89 (90,8)	-	-
Regne Unit2	88 (89,8)	-	-
Regne Unit3	-	216 (89,2)	215 (88,8)
Holanda1	87 (88,8)	203 (83,9)	204 (84,3)
Holanda2	91 (92,8)	197 (81,4)	198 (81,8)
N1	92 (91,1)	-	-
W1	83 (82,2)	193 (79,7)	194 (80,2)
USA1	84 (83,2)	196 (81,0)	197 (81,4)

Taula 4.6. Comparació de les regions amplificades de l'ORF2 i ORF1 de les seqüències d'origen porcí del VHE aïllades a Barcelona (continuació).

Soques	ORF2	ORF1	
	<i>Por1</i>	<i>Por2</i>	<i>Por3</i>
USA2	82 (81,2)	189 (78,1)	190 (78,5)
Sw USA	84 (83,2)	188 (77,7)	189 (78,1)
Canadà	83 (84,7)	198 (81,8)	199 (82,2)
Sw Mèxic	-	197 (81,4)	198 (81,8)
Argentina	81 (82,6)	-	-
Japó1	84 (83,2)	193 (79,7)	192 (79,3)
Japó2	83 (82,2)	193 (79,7)	194 (80,2)
Japó3	-	199 (82,2)	200 (82,6)
Japó4	-	199 (82,2)	200 (82,6)
Nova Zelanda	80 (81,6)	200 (82,6)	201 (83,0)
Austràlia	-	196 (81,0)	197 (81,4)
Mèxic	79 (78,2)	186 (76,8)	185 (76,4)
Xina2	78 (77,2)	192 (79,3)	191 (78,9)
Xina3	81 (80,2)	183 (75,6)	182 (75,2)
BCN	80 (79,2)	181 (74,8)	182 (75,2)
Txad	80 (79,2)	179 (74,0)	180 (74,4)
Egipte	81 (80,2)	-	-
Birmània	81 (80,2)	180 (74,4)	181 (74,8)
Índia	78 (77,2)	184 (76,0)	185 (76,4)
Xina1	78 (77,2)	181 (74,8)	182 (75,2)
Pakistan	79 (78,2)	179 (74,0)	180 (74,4)
Marroc	76 (75,2)	184 (76,0)	185 (76,4)
Kirguizistan	86 (87,7)	201 (83,0)	200 (82,6)

- no està disponible la seqüència de la soca comparada

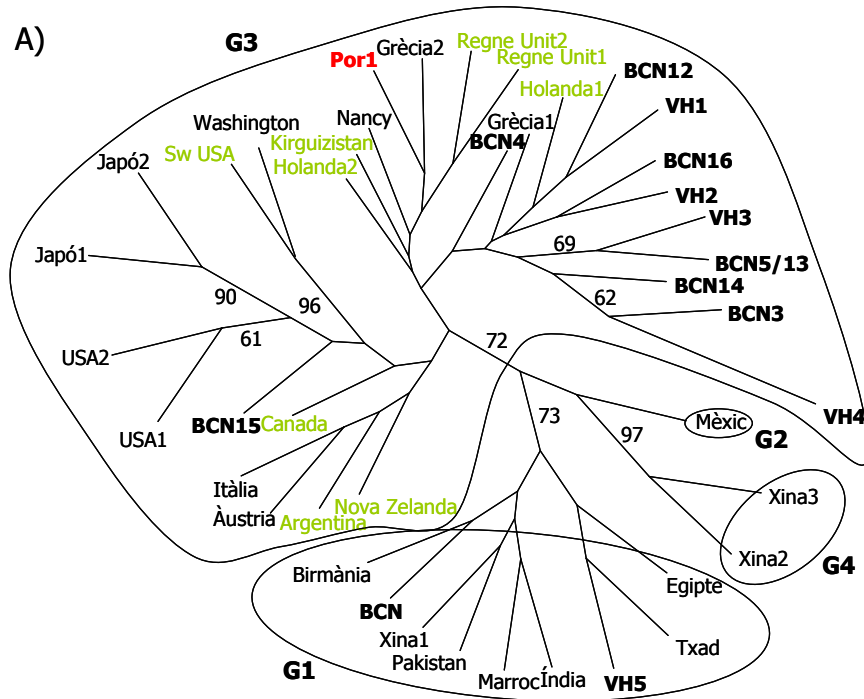
Les seqüències d'aa de Por2 i Por3 són idèntiques i només presenten una posició diferent respecte a Grècia2, 2 respecte a les soques d'origen humà aïllades a Barcelona i 3 respecte a una altra porcina, Regne Unit3 (Figura 4.1.).

Capítol 4. Reservoirs animals del VHE.

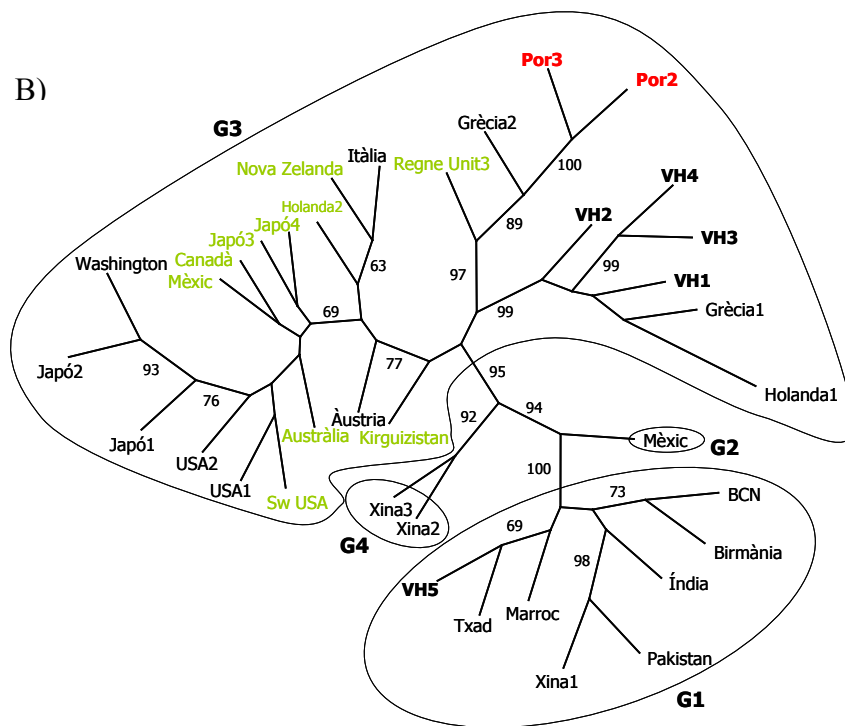
	*	20	*	40	*	60	*	80							
Por2	:	VRPFLSRTQT	DILINLMQ	PRQLVFR	PEVLWNH	PIQRVIH	NELEQY	CRARAGRC	LEIGAH	PR	SINDNPN	VLHRC	FLRPVGR	:	80
Por3	:												:	80
Grècia2	:V.....												:	80
Regne Unit	:E.....V...S.....												:	80
VH3	:V.....V.....												:	80
VH4	:V.....V.....												:	80
Grècia1	:V.....V.....												:	80
Holanda1	:A.....V.....												:	80
VH1	:V.....V.....												:	80
VH2	:I.....V.....												:	80
Japó2	:V..E.....V.....												:	80
Washington	:V..E.....V.....												:	80
Japó1	:V..E.....V.....												:	80
USA2	:V..E.....V.....												:	80
USA1	:V..E.....V.....												:	80
Sw USA	:V..E.....A.....C.....V.....F.....												:	80
Austràlia	:V..E.....V.....												:	80
Canadà	:V..E.....V.....K.....												:	80
Sw Mèxic	:V..E.....V.....												:	80
Japó4	:V..E.....												:	80
Japó3	:V..E.....												:	80
Nova Zelan	:V..E.....												:	80
Itàlia	:L..E.....F.....												:	80
Holanda2	:V..E.....V.....												:	80
Àustria	:V..E.....V.....												:	80
Kirguizist	:V..E.....V.....												:	80
Xina2	:L..E.....W.....E.....D.....K.....												:	80
Xina3	:L..E.....I.....V.....K.....												:	80
VH5	:HQ.IE.....F.....L.....S.....V.....												:	80
Txad	:HQ.IE.....F.....L.....S.....V.....												:	80
Marroc	:HQ.IE.....F.....L.....S.....V.....												:	80
Pakistan	:HQ.IE.....F.....L.....S.....V.....A.....												:	80
Xina1	:HQ.IE.....F.....L.....S.....V.....A.....												:	80
Birmània	:HQ.IE.....F.....L.....S.....V.....												:	80
BCN	:HQ.IE.....F.....L.....S.....V.....												:	80
Índia	:HQ.IE.....F.....L.....S.....V.....												:	80
Mèxic	:HQ.VE.....F.....S.....H.....												:	80

Figura 4.1. Alineament de les seqüències d'aminoàcids de la regió de l'ORF1 amplificada de les soques d'origen porcí aïllades a Barcelona, altres d'origen humà de la mateixa àrea i soques representants dels diferents genotips. Els punts representen aminoàcid idèntic al de la primera seqüència.

La topologia dels arbres filogenètics derivats dels fragments amplificats de l'ORF1 i ORF2 són molt similars, com es mostra a la Figura 4.2. Por1, Por2 i Por3 s'agrupen amb la soca Grècia2 i molt a prop de les seqüències d'origen humà causants d'hepatitis agudes a Barcelona (com VH1, VH2, VH3 i VH4). Formarien part del genotip 3, un dels 4 grans genotips descrits, malgrat que els valors de *bootstrap* obtinguts amb el fragment més llarg (242 nt de l'ORF1) podrien començar a indicar l'agrupació de les diferents soques en més de 4 genotips.



_10



_10

Figura 4.2.

Arbres obtinguts pel mètode *Neighbor Joining* representant les relacions filogenètiques segons els fragments de 101 nt amplificats de la regió de l'ORF2 (A) i de 242 nt de la regió de l'ORF1 (B) entre les seqüències porcines aïllades a Barcelona, alguns dels aïllats identificats també a Barcelona i altres soques representants dels diferents genotips. En vermell es representen els aïllats porcins de Barcelona. En color verd apareixen altres soques d'origen animal (principalment porcí). En negreta es representen les soques aïllades a Barcelona. Només es recullen els valors de bootstrap superiors a 60.

4.3.1.2. Poblacions bovines

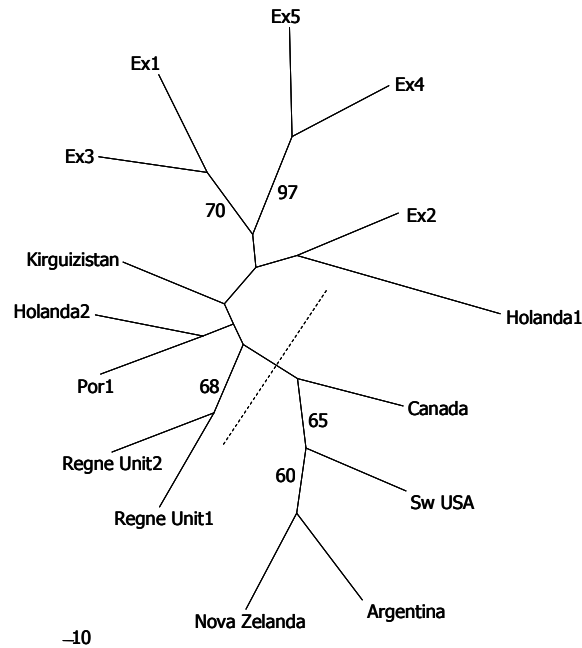
En el cas de l'estudi de la població bovina com a reservori del VHE, únicament s'analitzaren mostres de femta. Les mostres es recolliren de 3 granges diferents. El resultat va ser negatiu. No es va detectar el genoma del virus a les diferents mostres analitzades.

4.3.2. PRESENCIA DEL VHE EN MOSTRES DE LLOTS D'ESCORXADOR I ESTUDI DE LA SEVA VARIABILITAT

Es van analitzar 4 mostres de llots d'un escorxador a on es treballava amb poblacions porcines. Als llots s'acumulen, per decantació, partícules presents a l'aigua residual generada a l'escorxador. L'anàlisi dels llots era equivalent a mirar una barreja de residus generats per un gran nombre de poblacions porcines, en aquest cas de les poblacions que havien passat per l'escorxador des de l'inici de la formació del llot.

De les 4 mostres analitzades, només una va resultar positiva quan es va analitzar per RT-PCR niada per amplificar un fragment de l'ORF2 del genoma del VHE. Aquest amplificat va ser purificat i clonat per poder determinar si totes les molècules d'amplificat corresponien a la mateixa seqüència o a diferents. Es detectaren 5 seqüències diferents (Ex1-Ex5). La identitat nucleotídica entre les 5 seqüències variava entre un 92,1% i un 99,0% en el fragment de 101 nt.

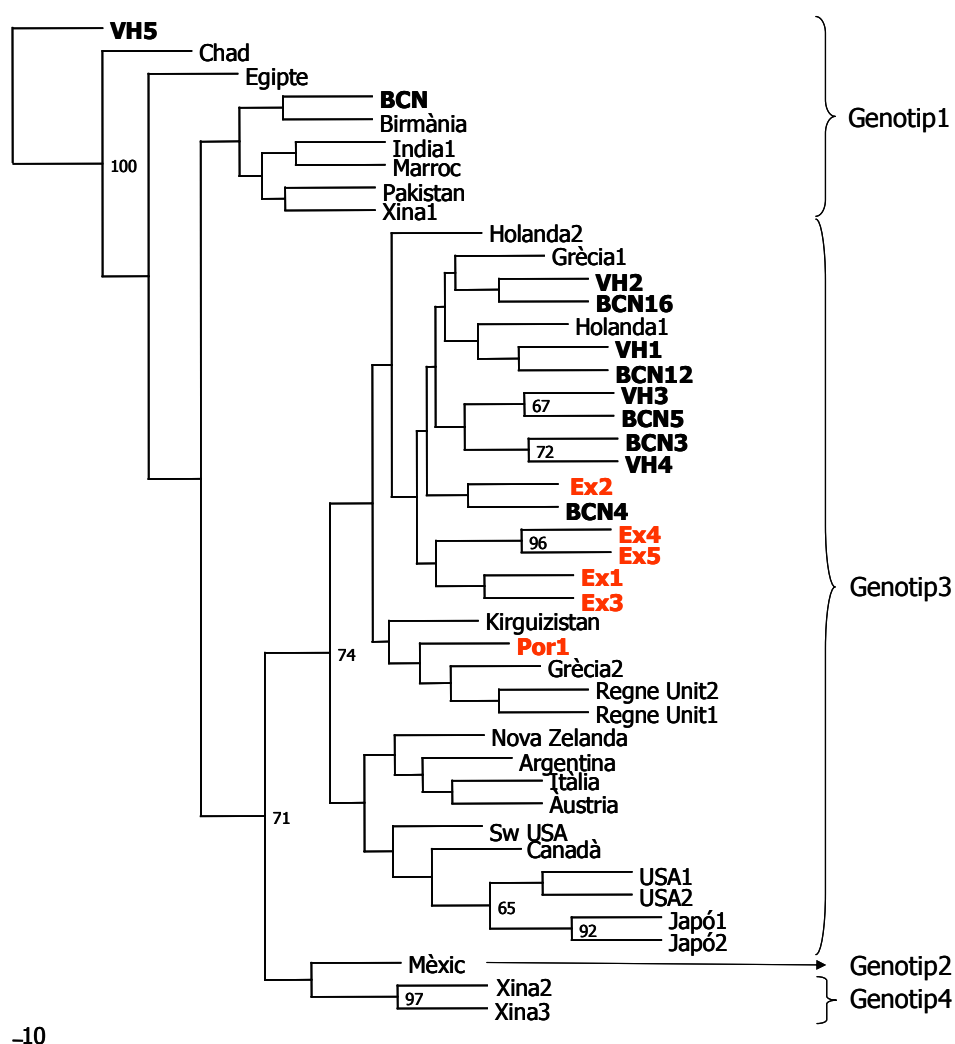
Es van comparar 98 nt de les seqüències procedents de la mostra de llots amb altres soques d'origen porcí. Cal destacar el 95,9% d'identitat existent entre el clon Ex2 i la soca d'origen holandès Holanda1, superior als valors existents entre aquest clon i els altres aïllats de l'escorxador. En general s'observava que aquesta soca holandesa era la més similar a les seqüències dels clons amb entre un 93,9% i un 95,9%. Amb l'altra seqüència aïllada a l'àrea (Por1), la similitud no era molt alta, amb un mínim d'identitat d'un 87,7% i un màxim d'un 89,9%. Les soques més allunyades genèticament eren les americanes i la de Nova Zelanda amb un màxim de 86,7% d'identitat (entre Ex5 i la soca Sw USA) i un mínim de 78,6% (entre Ex4 i la soca canadenca). Aquestes diferències es mostren a l'arbre filogenètic (Figura 4.3.) generat amb les seqüències obtingudes a la mostra de llot i altres seqüències d'origen porcí. S'observa l'agrupació de les primeres amb les soques europees a un costat, i les soques americanes i de Nova Zelanda a l'altre.



La comparació amb les soques d'origen humà es va fer amb els 101 nt. Cada seqüència del VHE d'origen porcí aïllada a partir de la mostra de llot compartia un mínim de 96 nt amb alguna soca del VHE d'origen humà de Barcelona. Ex1 compartia 98 nt (97,0%) amb BCN9 i BCN18 i 97 nt (96,0%) amb VH3. Ex2 coincidia en un 96,0% amb moltes soques aïllades a Barcelona a partir d'aigua residual (BCN5/13, BCN17 o seq5/03-5) o de sèrum humà (VH3). Ex3 compartia 99nt (98,0%) amb seq5/03-04 i seq5/03-2, i 98 nt (97,0%) amb VH3. Ex4 i Ex5 coincidien en 96 nt (95,0%) i en 97 nt (96,0%) amb seq5/03-2 respectivament. La similitud entre aquests aïllats i altres d'altres regions era més baixa. Les soques més allunyades eren la de Mèxic (24 diferències i 76,2% d'identitat amb Ex1, 23 nt diferents i 77,2% d'identitat amb Ex2 i 22 nt diferents i 78,2% d'identitat amb Ex3) i la de Marroc (23 nt diferents i 77,2% d'identitat amb Ex4 i 22 nt diferents i 78,2% d'identitat amb Ex5). S'observà que el nombre de diferències entre els aïllats d'escorxador i les altres soques del genotip 3 no aïllades a Barcelona era molt similar a les trobades al comparar-les amb les soques del genotip 1 (Taula 4.7.). A l'arbre filogenètic quedaven agrupades amb el genotip 3 (Figura 4.4.).

Taula 4.7. Intervalls d'identitats nucleotídiques entre Ex1, Ex2, Ex3, Ex4 i Ex5 i els diferents genotips representats per les soques humanes del VHE seleccionades per fer els estudis filogenètics (regió de l'ORF2).

Genotip	Ex1	Ex2	Ex3	Ex4	Ex5
Genotip 1	78,2-82,2	79,2-85,1	79,2-83,2	77,2-81,2	78,2-82,2
Genotip 2	76,2	77,2	78,2	79,2	80,2
Genotip 3	81,2-97,0	81,2-96,0	81,2-98,0	80,2-95,0	81,2-96,0
Genotip 4	78,2-79,2	79,2-81,2	79,2-81,2	80,2	81,2



-10

Figura 4.4. Arbre obtingut pel mètode Neighbor Joining representant les relacions filogenètiques segons el fragment de 98 nt amplificat de la regió de l'ORF2 entre alguns dels aïllats identificats a Barcelona (a partir de mostres clíniques humanes, d'aigua residual urbana, femta porcina i llots d'escorxador) i altres soques d'origen humà i porcí representants dels diferents genotips. En vermell apareixen les soques d'origen animal aïllades a Barcelona i en negreta les humanes. Només es recullen els valors de bootstrap superiors a 60.

4.4. DISCUSSIÓ

En aquest capítol s'ha estudiat l'excreció del VHE per part de porcs de diferents granges i edats i s'ha realitzat un estudi preliminar de l'excreció en animals bovins. Les poblacions porcines i bovines representen 2 dels animals de granja més habituals a Catalunya. Les primeres, tal i com s'ha descrit en els darrers anys, són susceptibles a la infecció pel VHE. Les segones estan essent estudiades actualment. Malgrat que hi ha autors que han detectat anticossos contra el VHE en vaques, cap seqüència bovina del virus ha estat aïllada fins al moment.

S'analitzaren mostres de sèrum i de femta de 3 granges porcines comercials. Dos d'elles estaven lliures del virus, mentre que la tercera presentava una seroprevalença d'anticossos anti-VHE d'un 18,2%. La determinació de la seroprevalença a nivell poblacional requereix l'anàlisi de mostres procedents de moltes granges diferents. Un estudi anterior, a la mateixa zona, va determinar la presència d'anticossos contra el VHE entre els animals de 6 granges porcines. De 60 mostres de sèrum analitzades, 15 (25%) presentaven IgG anti-VHE (Pina i col., 2000). L'anàlisi conjunta dels 2 estudis representa 133 animals analitzats de 9 granges diferents, amb una seroprevalença total d'un 18,8%. Aquest percentatge d'animals amb IgG antiVHE és alt considerant que es troben a una àrea considerada no endèmica pel VHE. En canvi, no és gaire elevat si es compara amb els valors trobats a altres països també considerats no endèmics. Als EUA la seroprevalença trobada a la població porcina va ser superior al 80% (Meng i col., 1997) i superior també al 80% en porcs majors de 6 mesos a Canadà (Pei i col., 2002). Al Japó va ser d'un 58% (Takahashi i col., 2003). A l'Índia els valors oscil·laven entre un 55% i un 74% (Arankalle i col., 2001), mentre que entre un 92 i un 95% dels porcs de 4 mesos d'edat analitzats a Austràlia tenien anticossos anti-VHE (Chandler i col., 1999). En general s'observa un increment de la seroprevalença amb l'edat de la població. En la granja C d'aquest estudi, els anticossos es van detectar en exemplars amb més de 10 setmanes d'edat (porcs d'encebament i truges), mentre que cap dels animals de 3, 5 i 8 setmanes d'edat havien generat anticossos. Els resultats semblen indicar una dinàmica lenta de difusió de la infecció dintre de la granja. El virus va ser aïllat de tots els grups d'edat, però majoritàriament del de 8 setmanes. Un de 2 *pools* d'animals de 3 setmanes, 1 de 2 de 5 setmanes, 1 de 2 d'animals de 15 setmanes i 1 de 4 *pools* de femta de truges presentaven també el genoma del virus. El fet de què les truges adultes fossin serològica i virològicament positives suggereix un possible paper de reservoirs del virus dintre de la granja. En un estudi realitzat al Japó, només es va poder aïllar el genoma del VHE d'animals d'entre 3 i 4 mesos (Takahashi i col., 2003).

Capítol 4. Reservoris animals del VHE.

Es van amplificar 2 fragments del genoma del VHE a les mostres de la granja C. El fragment de l'ORF2 (Por1) permetia comparar una regió de 101nt amb soques del virus d'origen humà. La màxima identitat nucleotídica es va trobar amb la soca grega Grècia2 i amb la soca N1 (d'aigua residual de Nancy), amb més d'un 91%. Amb les soques típiques aïllades a Barcelona fins el moment, Por1 presentava una identitat nucleotídica que oscil·lava entre un 84,1% i un 89,1%. Si la comparació es feia amb un total de 148 nt amplificats (la regió dels encebadors és molt conservada) aquest rang pujava a un 87,0%-91,0%. Comparant amb altres soques d'origen porcí, Por1 era similar a les soques Holanda2 i Regne Unit1 amb més d'un 90% d'identitat nucleotídica en tots dos casos. Al seqüenciar el fragment de l'ORF1 es van obtenir 2 seqüències, Por2 i Por3, que diferien només en una nucleòtid, però amb idèntica seqüència d'aa. La comparació d'aquest fragment de 242 nt amb altres soques va confirmar, com en el cas de les soques d'origen humà del capítol 3, els resultats obtinguts al comparar el fragment més petit de l'ORF2, donant arbres filogenètics de topologies molt similars.

En un estudi anterior es va aïllar, també a Catalunya, una soca d'origen porcí a partir d'aigua residual d'un escorxador. En aquest cas la soca E11 va mostrar una identitat nucleotídica d'un 92,1% i un 94,0% en un fragment de 304 nt amb les soques VH1 i VH2, soques aïllades a partir de mostres clíniques de pacients amb hepatitis agudes a l'àrea de Barcelona (Pina i col., 2000). Totes les seqüències del VHE d'origen porcí aïllades a l'àrea de Barcelona (E11, Por1, Por2 i Por3) estaven relacionades principalment amb les soques humanes aïllades a la mateixa regió i pertanyien al genotip 3, al igual que aquestes. Aquesta similitud entre soques humanes i porcines d'una mateixa regió s'ha observat en molts altres casos. La soca Sw USA presenta una identitat nucleotídica amb US1 i US2 d'un 92% aproximadament (Erker i col., 1999a). Una soca porcina de Taiwan era idèntica en un 97,3% a una soca humana taiwanesa aïllada d'una mostra d'un granger retirat que havia viscut durant dècades en una granja de porcs (Hsieh i col., 1999). Al Japó es va identificar una soca humana i una porcina que compartien un 99% del genoma (7168 nt de 7240) amb una seqüència aminoacídica 100% idèntica a les regions ORF2 i ORF3, i un 99,8% a la regió de l'ORF1 (Nishizawa i col., 2003). En canvi, a l'Índia totes les soques humanes aïllades pertanyen al genotip 1, mentre que les porcines són del genotip 4 (Arankalle i col., 2002; Arankalle i col., 2003). També es van comparar les seqüències Por1, Por2 i Por3 amb les seqüències d'origen porcí disponibles, totes d'àrees considerades no-endèmiques. Les més similar a aquesta eren les europees (d'Holanda i Regne Unit), mentre que les més allunyades geogràficament també ho estaven filogenèticament.

Capítol 4. Reservoirs animals del VHE.

Finalment es van analitzar mostres de llots d'escorxador amb l'objectiu d'estudiar la presència de virus en diverses poblacions d'una manera general, ja que les partícules presents en l'aigua residual generada per aquestes en diferents moments s'acumulen als llots al sedimentar. La clonació de l'amplificat de la regió de l'ORF2 obtingut i la seqüenciació posterior dels clons permet veure les diferents seqüències retinudes. Es van obtenir 5 seqüències diferents (Ex1 a Ex5) totes elles amb un mínim d'un 95,0% d'identitat en el fragment de 101 nt amb alguna soca del VHE d'origen humà aïllada a Barcelona. Quan es van comparar amb altres soques d'origen porcí, la més similar en tots els casos va ser una soca holandesa (Holanda1), amb entre un 93,9% i un 95,9%, mentre que la seqüència Por1, de la mateixa regió, presentava més diferències (89,9% com a màxima identitat nucleotídica).

No ha estat possible aïllar cap soca del VHE d'origen boví en l'estudi preliminar realitzat, tal i com ja han descrit altres investigadors. Estudis serològics, però, han trobat anticossos anti-VHE en vaca (Arankalle i col., 2001; Wang i col., 2002). És necessari portar a terme més anàlisis que permetin la identificació de soques bovines del virus i la determinació del potencial paper d'aquests animals com a reservoris del VHE. Probablement la incapacitat per amplificar soques bovines sigui deguda a les diferències nucleotídiques entre aquestes i les soques del VHE d'origen humà i porcí descrites fins ara.

Malgrat que, com es va descriure a l'apartat anterior, no s'ha observat un increment de la seroprevalença entre veterinaris respecte a la població sana (donants de sang) a la regió estudiada, aquest col·lectiu ha estat apuntat, juntament amb treballadors en contacte amb porcs, com un grup de risc davant la infecció per VHE. Meng i col. (2002) observaren que els veterinaris de porcs de 8 estats dels EUA presentaven 1,51 vegades més possibilitat de ser anti-VHE positius que els donants de sang del país. A Taiwan (Hsieh i col., 1999) les persones que treballaven amb porcs presentaven uns nivells d'IgG anti-VHE més elevats que els controls (26,7% davant del 8% dels controls). Resultats similars s'han descrit a Moldàvia (Drobeniuc i col., 2001).

Un altre grup de risc descrit últimament pel seu contacte indirecte amb animals és el corresponent a persones que mengen carn crua. S'han descrit casos, sobretot al Japó, d'individus infectats pel VHE després d'haver ingerit carn crua. Dos homes d'edat avançada van haver de ser ingressats en hospitals després d'haver ingerit el fetge cru d'un porc senglar salvatge (Matsuda i col., 2003). Tots dos individus van desenvolupar hepatitis pel VHE, i un d'ells va morir. La soca del VHE aïllada del difunt pertanyia al genotip 4. No tenien cap altre factor de risc. L'any 2003, 6 membres de 2 famílies diferents es van infectar amb el

Capítol 4. Reservoirs animals del VHE.

VHE. Tots 6 havien ingerit carn d'un cérvol japonès (*Cervus nippon nippon*). La soca del VHE causant va poder ser aïllada dels pacients i de les restes congelades de l'animal (Tei i col., 2003). Malgrat que segons l'epidemiologia del VHE en porcs, gairebé tots els animals amb edat d'entrar a la xarxa comercial són seropositius però no presenten el virus, en una regió com Espanya, a on el consum de productes d'origen porcí està generalitzat, aquesta entrada pot ser un punt de risc important. En canvi les soques d'origen aviar descrites semblen ser suficientment diferents com per suposar que no hi pot haver infecció creuada d'humans amb aquestes soques.

Tots aquests resultats, juntament amb els estudis d'infectivitat en porcs amb soques humanes i amb soques porcines en primats no humans en condicions experimentals, semblen evidències clares de la possibilitat de què el VHE sigui una zoonosi amb el porc com un dels seus reservoris principals, però no l'únic. Altres poblacions animals com pollastres, gossos, gats, primats i principalment rosegadors han estat descrites com a portadors d'anticossos contra el virus (Kabrane-Lazizi i col., 1999b; Wang i col., 2002; Hirano i col., 2003a; Hirano i col., 2003b; Usui i col., 2004) i, per tant, com a possibles reservoris, encara que això no ha estat confirmat en cap estudi.