



**Universidad de Barcelona  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Biología**

**Detección y caracterización de virus patógenos humanos  
en muestras ambientales y moluscos bivalvos**

**Sonia Pina Pedrero**

**Tesis doctoral**



**Universidad de Barcelona  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Biología**

# **Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos**

VºBº del director de la Tesis

Memoria presentada por  
Sonia Pina Pedrero  
para optar al grado de  
Doctor en Biología

Dra. Rosina Girones Llop

Barcelona, mayo de 2001

Programa de doctorado: Microbiología ambiental y Biotecnología  
Bienio: 1994-1996

***“Las ciencias aplicadas no existen,  
sólo las aplicaciones de la ciencia”***

*Louis Pasteur*

***“La ciencia se compone de errores  
que a su vez son los pasos hacia la verdad”***

*Julio Verne*

*A mi familia*

*A Miguel*

---



## *Agradecimientos*

---

Me gustaría dedicar las primeras páginas de este trabajo a todas aquellas personas que han colaborado en su realización, y al mismo tiempo agradecerles sinceramente la ayuda inestimable que en alguno u otro momento me han brindado.

En primer lugar he de agradecer a la Dra. Rosina Gironés por haberme acogido en su grupo de investigación como alumna interna durante el último curso de mi licenciatura, y por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis que aquí se presenta. Gracias por su confianza, las horas dedicadas, por la paciencia demostrada frente a mi ritmo de trabajo (a veces demasiado lento), y por animarme en todo momento.

Debo agradecer sin duda a Montse por ser mi *maestra* durante los primeros meses en el departamento, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia, y por introducirme en el mundo a veces *misterioso* de la Biología Molecular.

Gracias también a la Generalitat de Catalunya por concederme una beca pre-doctoral, apoyo económico indispensable sin el que probablemente no hubiera continuado este estudio.

Han sido fundamentales para la realización de este trabajo, una serie de investigadores e instituciones que colaboraron en parte del estudio y en la obtención de material indispensable para su consecución. Gracias a los Drs. Joan Jofre y Francisco Lucena por cedernos las muestras de agua de río, y al Dr. Anicet Blanch por el apoyo informático. Gracias a la Dra. Annika Allard de la Universidad de Umeå (Suecia) por proporcionarnos las líneas celulares para la obtención de los estocs de adenovirus. También a la Dra. Maria Buti y Dr. Rosend Jardí, del Hospital General Universitario Valle Hebrón, por facilitarnos las muestras de suero de pacientes con hepatitis agudas, y a Montse Cotrina por analizar la serología. De la misma manera agradecer a las Dras. Rosa Araujo y Anna Puig la cesión de algunas muestras de heces de animales y de aguas residuales de mataderos, y al Dr. Juan Piella por procurarnos muestras de heces y sueros de cerdo.

Mi reconocimiento sin duda a los Dr. Robert H. Purcell y Dra. Suzanne E. Emerson, del National Institutes of Health (NIH), por colaborar en la obtención de los estocs del virus de la hepatitis E, por proporcionarnos los sueros control y la proteína antigénica para los ensayos inmunoenzimáticos, y por su amable consejo en todo momento.

Mi agradecimiento a Ramón y Amaya del Servicio de Secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona por su apoyo técnico en la secuenciación del ADN.

Asimismo gracias al Dr. Miquel Calvo del departamento de Bioestadística por el análisis estadístico de los datos.

De los compañeros del departamento me gustaría dar las gracias a Jordi D. y Xavi M. sobretodo por su compañía muy especial en todo momento, por aguantar mis *neuras*. También gracias por su ayuda en la recogida de muestras y por realizar los análisis de bacteriófagos y enterovirus que se presentan en este trabajo, junto con Núria Q. y Laura. Gracias a Xavi M. por las discusiones científicas, aunque “no sepas trabajar en equipo”.

A Maite, Laura, Ana Emilia y Melanie, compañeras de sobremesa, gracias por los buenos momentos compartidos, por los consejos culinarios y por los cafés que me ofrecisteis (aunque nunca los tomé...). No me olvido de los compañeros del *ala Norte*, Yolanda, Cristina, Núria Q., Xavi V., Xavi B., Albert, ... ni de Olga. Gracias también a Xavi A., por prestarme tantas veces “cinco minutos de vitrina”. En general gracias a todos por el *buen rollo*. Un recuerdo para Marta C. y Françoise, con las que compartí una cuantas horas abriendo mejillones, y a los demás compañeros del grupo que ya dejaron el departamento.

Quiero desearles mucho animo a los *pre-doctores* Jordi, Xavi M., Ana Emilia y Melanie para que puedan acabar de escribir sus tesis pronto y comiencen una nueva etapa de su vida. Animo y suerte para Meritxell y Pili, para las que todavía les queda un largo camino por recorrer. Y a Rosa, por su ayuda técnica durante el último año.

He de dar las gracias también por su colaboración en las tareas administrativas a Alberto Martínez, Carmen y M<sup>a</sup> Rosa Blanes. Un recuerdo a Rosario Muñoz sobretodo por su buen sentido del humor.

Gracias a Sandra y Lidia, por haberme ofrecido vuestra amistad durante tantos años. Desde aquí me gustaría animaros y desearos mucha suerte para que podáis encaminar pronto vuestra vida.

Gracias a mi familia por su paciencia y comprensión.

Gracias a Miguel por quererme tal como soy.

*Índice*

---





---

**Capítulo 1.- INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS** **1**

---

|  |    |
|--|----|
| 1.1. Los orígenes de la virología ambiental  | 3  |
| 1.2. Origen y distribución de los virus en el ambiente   | 4  |
| 1.3. El agua como agente transmisor de enfermedades infecciosas: necesidad de control virológico | 6  |
| 1.3.1. Epidemiología de las enfermedades víricas de transmisión hídrica                          | 7  |
| 1.3.2. Normativa aplicable al control microbiológico del agua                                    | 8  |
| 1.4. Los moluscos bivalvos como agentes transmisores de enfermedades infecciosas                 | 10 |
| 1.4.1. Epidemiología de las infecciones atribuidas al consumo de moluscos bivalvos               | 12 |
| 1.4.2. Normativa aplicable a la producción y comercialización de moluscos bivalvos               | 13 |
| 1.5. Bacterias, protozoos y parásitos transmitidos por vía hídrica                               | 15 |
| 1.6. Virus transmitidos por vía hídrica  | 16 |
| 1.7. Adenovirus humanos  | 18 |
| 1.7.1. Historia  | 18 |
| 1.7.2. Clasificación   | 18 |
| 1.7.3. Oncogenicidad   | 19 |
| 1.7.4. Morfología y estructura   | 20 |
| 1.7.5. Estabilidad   | 21 |
| 1.7.6. Organización del genoma   | 21 |
| 1.7.7. Variabilidad genética   | 22 |
| 1.7.8. Replicación   | 22 |
| 1.7.9. Epidemiología   | 23 |

|  |    |
|--|----|
| 1.8. Género Enterovirus                                      | 25 |
| 1.8.1. Características biológicas                            | 25 |
| 1.8.2. Epidemiología   | 27 |
| 1.8.3. Clasificación   | 29 |
| 1.8.4. Poliovirus  | 30 |
| 1.8.5. Coxsackievirus  | 31 |
| 1.8.6. Echovirus   | 31 |
| 1.9. Género Hepatovirus                                      | 32 |
| 1.9.1. Antecedentes históricos                               | 32 |
| 1.9.2. Clasificación   | 34 |
| 1.9.3. Propiedades físico-químicas y estabilidad del virión  | 35 |
| 1.9.4. Organización genómica                                 | 36 |
| 1.9.5. Heterogeneidad genética                               | 37 |
| 1.9.6. Patogénesis y patología                               | 39 |
| 1.9.6.1. <i>Complicaciones de la infección por el VHA</i>    | 41 |
| 1.9.7. Rango de huéspedes y propagación vírica               | 41 |
| 1.9.8. Diagnóstico   | 42 |
| 1.9.9. Prevención y tratamiento                              | 43 |
| 1.9.10. Epidemiología  | 44 |
| 1.9.10.1. <i>Modelos epidemiológicos</i>                     | 44 |
| 1.9.10.2. <i>Epidemiología de la hepatitis A en Cataluña</i> | 46 |
| 1.10. Virus de la hepatitis E                                | 48 |
| 1.10.1. Antecedentes históricos                              | 48 |
| 1.10.2. Propiedades físico-químicas del virión               | 50 |
| 1.10.3. Organización genómica                                | 50 |
| 1.10.4. Heterogeneidad genética                              | 51 |
| 1.10.5. Clasificación taxonómica                             | 53 |
| 1.10.6. Replicación  | 53 |
| 1.10.7. Manifestaciones clínicas                             | 54 |
| 1.10.8. Histopatología                                       | 55 |

|  |    |
|--|----|
| 1.10.9. Rango de huéspedes   | 56 |
| 1.10.10. Diagnóstico   | 56 |
| 1.10.11. Prevención y control  | 57 |
| 1.10.12. Epidemiología   | 58 |
| 1.11. El desarrollo de métodos de detección de virus en el medio ambiente      | 61 |
| 1.11.1. Métodos de concentración de virus a partir de muestras ambientales     | 61 |
| <i>1.11.1.1. Concentración de virus por filtración–elución</i>                 | 62 |
| <i>1.11.1.2. Concentración de virus por floculación orgánica</i>               | 64 |
| <i>1.11.1.3. Concentración de virus por ultracentrifugación</i>                | 64 |
| <i>1.11.1.4. Concentración de virus por ultrafiltración</i>                    | 64 |
| 1.11.2. Métodos de detección e identificación de virus en muestras ambientales | 65 |
| 1.12. Microorganismos modelo para el control de la calidad del agua            | 68 |
| 1.12.1. El concepto de microorganismo índice e indicador                       | 68 |
| 1.12.2. Indicadores bacterianos  | 69 |
| 1.12.3. Indicadores víricos  | 70 |
| 1.13. Objetivos generales  | 72 |

## **Capítulo 2.- LA CONTAMINACIÓN VIRAL DE LAS AGUAS SUPERFICIALES Y RESIDUALES**

73

|  |    |
|--|----|
| <b>2.1. INTRODUCCIÓN</b>   | 75 |
| <b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | 78 |
| 2.2.1. Líneas celulares y cepas víricas                                      | 78 |
| 2.2.1.1. Descripción de las diferentes líneas celulares                      | 78 |
| 2.2.1.2. Mantenimiento de las líneas celulares                               | 79 |
| 2.2.1.3. Cepas víricas   | 80 |
| <i>2.2.1.3.1. Obtención de una suspensión de Ad2 o Ad12</i>                  | 80 |
| <i>2.2.1.3.2. Obtención de una suspensión de Poliovirus tipo 1 (LSc 2ab)</i> | 81 |
| <i>2.2.1.3.3. Obtención de una suspensión de VHA pHMI75</i>                  | 81 |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.2. Descripción de las muestras estudiadas   | 82 |
| 2.2.2.1. Muestras de agua residual urbana   | 82 |
| 2.2.2.2. Muestras de agua de río  | 83 |
| 2.2.2.3. Muestras de agua de mar  | 83 |
| 2.2.2.4. Muestras de origen animal  | 85 |
| 2.2.2.4.1. <i>Muestras de agua residual de mataderos de ganado</i>  | 85 |
| 2.2.2.4.2. <i>Muestras de heces de animales de granja</i>   | 85 |
| 2.2.3. Recuperación de partículas víricas   | 85 |
| 2.2.3.1. Recuperación de partículas víricas a partir de agua residual urbana  | 86 |
| 2.2.3.1.1. <i>Recuperación de partículas víricas por ultracentrifugación</i>  | 86 |
| 2.2.3.1.2. <i>Recuperación de partículas víricas por ultrafiltración</i>  | 86 |
| 2.2.3.1.3. <i>Evaluación de la eficiencia del método de recuperación de partículas víricas</i>                            | 88 |
| 2.2.3.2. Recuperación de partículas víricas a partir de agua de río   | 89 |
| 2.2.3.3. Recuperación de partículas víricas a partir de agua de mar   | 90 |
| 2.2.3.4. Recuperación de partículas víricas a partir de muestras de origen animal   | 90 |
| 2.2.4. Parámetros de contaminación fecal complementarios analizados en muestras de agua ambientales                       | 91 |
| 2.2.4.1. Cuantificación de enterovirus infecciosos  | 91 |
| 2.2.4.2. Cuantificación de colifagos somáticos y F-específicos  | 92 |
| 2.2.4.2.1. <i>Método 1</i>  | 92 |
| 2.2.4.2.2. <i>Método 2</i>  | 93 |
| 2.2.4.3. Cuantificación de bacteriófagos de <i>Bacteroides fragilis</i>   | 93 |
| 2.2.4.3.1. <i>Método A</i>  | 93 |
| 2.2.4.3.2. <i>Método B</i>  | 94 |
| 2.2.4.4. Cuantificación de coliformes fecales   | 94 |
| 2.2.5. Detección molecular de virus entéricos   | 94 |
| 2.2.5.1. Extracción de ácidos nucleicos   | 94 |
| 2.2.5.2. Diseño de iniciadores específicos para la detección de adenovirus humanos, enterovirus y virus de la hepatitis A | 95 |
| 2.2.5.2.1. <i>Iniciadores específicos de adenovirus humanos</i>   | 95 |
| 2.2.5.2.2. <i>Iniciadores específicos de enterovirus</i>  | 97 |

---

|  |     |
|--|-----|
| 2.2.5.2.3. <i>Iniciadores específicos del VHA</i>  | 98  |
| 2.2.5.3. Detección de ácidos nucleicos por amplificación enzimática  | 100 |
| 2.2.5.3.1. <i>Síntesis de ADNc</i>   | 100 |
| 2.2.5.3.2. <i>Reacción de amplificación</i>  | 100 |
| 2.2.5.3.3. <i>PCR anidada</i>  | 101 |
| 2.2.5.3.4. <i>Control de calidad del método de amplificación</i>   | 102 |
| 2.2.5.3.5. <i>Análisis de los resultados</i>   | 102 |
| <b>2.3. RESULTADOS</b>   | 104 |
| 2.3.1. Sensibilidad del método de detección molecular de virus entéricos de origen humano                              | 104 |
| 2.3.1.1. Sensibilidad en la detección de AdH   | 104 |
| 2.3.1.2. Sensibilidad en la detección de EV  | 105 |
| 2.3.1.3. Sensibilidad en la detección del VHA  | 106 |
| 2.3.1.4. Valoración de la sensibilidad del método de detección molecular en muestras de agua ambientales               | 107 |
| 2.3.1.4.1. <i>Muestras de agua residual suplementadas con Poliovirus tipo 1 y Ad2</i>                                  | 107 |
| 2.3.1.4.1.1. Recuperación de partículas víricas por ultracentrifugación <i>versus</i> ultrafiltración                  | 107 |
| 2.3.1.4.2. <i>Eficiencia en la recuperación de virus a partir de muestras de agua de mar</i>                           | 109 |
| 2.3.2. Evaluación de la especificidad en la detección molecular de virus de origen humano                              | 110 |
| 2.3.2.1. Agua residual de mataderos de ganado  | 110 |
| 2.3.2.2. Muestras de heces de origen animal  | 111 |
| 2.3.3. Contaminación vírica del medio ambiente de origen fecal humano  | 112 |
| 2.3.3.1. Presencia de virus entéricos en aguas residuales  | 112 |
| 2.3.3.1.1. <i>Concentración de virus entéricos de origen humano en agua residual no tratada y en efluente primario</i> | 115 |
| 2.3.3.1.2. <i>Análisis estadístico</i>   | 115 |
| 2.3.3.2. Presencia de virus entéricos en aguas naturales   | 116 |
| 2.3.3.2.1. <i>Contaminación vírica del agua del río Llobregat</i>  | 116 |

---

|   |            |
|---|------------|
| 2.3.3.2.2. Contaminación vírica del agua del río Ter  | 119        |
| 2.3.3.2.3. Contaminación vírica del agua de mar   | 121        |
| 2.3.3.3. Variación anual y estacional de la contaminación vírica en el ambiente                           | 122        |
| <b>2.4. DISCUSIÓN</b>   | 126        |
| <br>  |            |
| <b>Capítulo 3.- DETECCIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS DE ORIGEN HUMANO EN MOLUSCOS BIVALVOS</b>                    | <b>135</b> |
| <hr/>   |            |
| <b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>  | 137        |
| <b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | 139        |
| 3.2.1. Estudio de muestras de mejillones de mercado   | 139        |
| 3.2.1.1. Valoración de la eficiencia en recuperación de virus a partir de tejido de mejillón              | 139        |
| 3.2.2. Estudio de muestras de moluscos bivalvos naturales   | 140        |
| 3.2.2.1. Muestras de bivalvos naturales   | 140        |
| 3.2.2.2. Recuperación de virus a partir de muestras naturales   | 140        |
| 3.2.2.3. Indicadores clásicos de contaminación fecal  | 141        |
| 3.2.2.3.1. <i>Coliformes fecales</i>  | 141        |
| 3.2.2.3.2. <i>Enterovirus infecciosos</i>   | 141        |
| 3.2.2.4. Detección molecular de virus de origen humano  | 141        |
| 3.2.2.4.1. <i>Extracción de ácidos nucleicos</i>  | 141        |
| 3.2.2.4.2. <i>Amplificación enzimática</i>  | 142        |
| <b>3.3. RESULTADOS</b>  | 144        |
| 3.3.1. Valoración de la eficiencia de la recuperación y detección de virus a partir de mejillones dopados | 144        |
| 3.3.2. Contaminación vírica de los moluscos bivalvos naturales  | 145        |
| <b>3.4. DISCUSIÓN</b>   | 147        |

---

## **Capítulo 4.- EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A**

---

**151**

|  |     |
|--|-----|
| <b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>   | 153 |
| <b>4.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | 155 |
| 4.2.1. Identificación del VHA en el ambiente   | 155 |
| 4.2.2. Identificación del VHA en pacientes con hepatitis aguda   | 155 |
| 4.2.3. Detección y caracterización de ARN-VHA en muestras de agua ambientales y sueros humanos                   | 156 |
| 4.2.3.1. Extracción de ácidos nucleicos y amplificación enzimática   | 156 |
| 4.2.3.2. Purificación de fragmentos de ADN   | 157 |
| 4.2.3.2.1. <i>Purificación de fragmentos de ADN por electroelución</i>   | 157 |
| 4.2.3.2.1.2. <i>Purificación de fragmentos de ADN producto de PCR utilizando el kit QIAquick (Qiagen)</i>        | 158 |
| 4.2.3.2. Cuantificación de la concentración de ADN purificado  | 158 |
| 4.2.3.3. Reacción de secuenciación del ADN   | 159 |
| 4.2.3.4. Análisis de las secuencias  | 159 |
| <b>4.3. RESULTADOS</b>   | 161 |
| 4.3.1. Caracterización de cepas del VHA a partir de muestras ambientales   | 161 |
| 4.3.1.1. Región 5'NTR  | 161 |
| 4.3.1.2. Región VP1/2A   | 164 |
| 4.3.2. Caracterización de cepas del VHA en muestras clínicas   | 166 |
| 4.3.3. Análisis filogenético de las cepas del VHA identificadas en muestras de agua ambientales y sueros humanos | 169 |
| <b>4.4. DISCUSIÓN</b>  | 172 |

## **Capítulo 5.- EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E**

**175**

|   |     |
|---|-----|
| <b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>  | 177 |
| <b>5.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | 179 |
| 5.2.1. Detección e identificación del VHE en aguas residuales   | 179 |
| 5.2.1.1. Muestras de agua residual  | 179 |
| 5.2.1.2. Suspensiones víricas control   | 180 |
| 5.2.1.3. Detección de ARN de VHE en muestras de agua residual   | 180 |
| 5.2.1.4. Sensibilidad del método de detección y evaluación de la estabilidad del VHE en agua residual | 182 |
| 5.2.1.5. Secuenciación de los fragmentos de genoma viral amplificado                                  | 182 |
| 5.2.2. Estudio de las características de la infección producida por la cepa BCN del VHE               | 183 |
| 5.2.2.1. Cultivo de la cepa BCN del VHE en animales experimentales                                    | 183 |
| 5.2.2.2. Análisis bioquímico, serológico y virológico de la infección                                 | 183 |
| 5.2.3. Caracterización del genoma de la cepa BCN del VHE  | 184 |
| 5.2.3.1. Amplificación parcial del genoma de la cepa BCN del VHE                                      | 184 |
| 5.2.3.1.1. Región 5'ORF1 (Dominio metiltransferasa)   | 185 |
| 5.2.3.1.2. Región ORF1 (Dominio Y – Proteasa)   | 185 |
| 5.2.3.1.3. Región ORF1 (Anillo poli-Pro – Dominio X)  | 186 |
| 5.2.3.1.4. Región ORF1 (Dominio X–Helicasa–ARN polimerasa)  | 186 |
| 5.2.3.1.5. Región ORF1 (Helicasa – ARN polimerasa)  | 187 |
| 5.2.3.1.6. Región ORF1 (ARN polimerasa)   | 187 |
| 5.2.3.1.7. Región 3'ORF1 – ORF3 – 5'ORF2  | 187 |
| 5.2.3.1.8. Región 3'ORF2  | 188 |
| 5.2.3.1.9. Región 3'ORF2 – 3'NTR – pA   | 188 |
| 5.2.3.2. Purificación de fragmentos de ADN  | 191 |
| 5.2.3.3. Cuantificación de la concentración de ADN purificado   | 192 |
| 5.2.3.4. Secuenciación y análisis del ADN   | 192 |
| 5.2.4. Clonaje del genoma de la cepa BCN del VHE  | 193 |
| 5.2.4.1. Obtención de los fragmentos de ADN para clonar   | 193 |



---

|  |            |
|--|------------|
| 5.2.4.2. Cepas bacterianas y vector  | 195        |
| 5.2.4.3. Reacción de ‘ <i>tailing</i> ’  | 196        |
| 5.2.4.4. Reacción de ligación  | 196        |
| 5.2.4.5. Preparación de células competentes  | 196        |
| 5.2.4.6. Transformación de células competentes   | 197        |
| 5.2.4.7. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico  | 197        |
| 5.2.4.7.1. <i>Aislamiento de los clones</i>  | 197        |
| 5.2.4.7.2. <i>Purificación de ADN plasmídico</i>   | 198        |
| 5.2.4.8. Identificación del inserto  | 198        |
| 5.2.4.8.1. <i>Identificación del inserto mediante restricción enzimática</i>                                   | 199        |
| 5.2.4.8.2. <i>Identificación del inserto por PCR</i>   | 199        |
| 5.2.5. Descripción de nuevas cepas del VHE en muestras clínicas humanas  | 200        |
| 5.2.5.1. Muestras de suero humano  | 200        |
| 5.2.6. Detección de cepas relacionadas con el VHE en cerdos  | 201        |
| 5.2.6.1. Muestras de suero porcino   | 201        |
| 5.2.6.2. Muestras de heces de cerdo  | 201        |
| 5.2.6.3. Muestras de agua residual de mataderos porcinos   | 201        |
| 5.2.6.4. ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-VHE en muestras de suero porcino                      | 202        |
| 5.2.7. Análisis genético de nuevas cepas del VHE en muestras clínicas y de origen animal                       | 204        |
| 5.2.7.1. Extracción de ácidos nucleicos  | 204        |
| 5.2.7.2. Síntesis de ADNc, amplificación enzimática y secuenciación  | 204        |
| 5.2.7.3. Evaluación de la sensibilidad de la reacción de RT-PCR anidada en muestras de suero y heces           | 205        |
| 5.2.7.4. Análisis del genoma de las nuevas cepas del VHE   | 206        |
| <b>5.3. RESULTADOS</b>   | <b>208</b> |
| 5.3.1. Aislamiento y caracterización molecular de una cepa infecciosa del VHE a partir de agua residual urbana | 208        |
| 5.3.1.1. Detección de cepas del VHE en muestras de agua residual urbana  | 208        |
| 5.3.1.2. Sensibilidad del método de detección de VHE en muestras de agua residual urbana                       | 209        |

---

|   |            |
|---|------------|
| 5.3.1.3. Evaluación de la estabilidad del VHE en agua residual                              | 209        |
| 5.3.1.4. Caracterización de la infección producida por la cepa BCN del VHE en primates      | 212        |
| 5.3.1.5. Caracterización molecular de la cepa BCN del VHE                                   | 213        |
| 5.3.1.5.1. Fragmento <i>Bcn1</i>  | 213        |
| 5.3.1.5.2. Fragmento <i>Bcn2</i>  | 213        |
| 5.3.1.5.3. Fragmento <i>Bcn3</i>  | 214        |
| 5.3.1.5.4. Fragmento <i>Bcn4</i> y <i>Bcn5</i>  | 214        |
| 5.3.1.5.5. Fragmento <i>Bcn6</i>  | 215        |
| 5.3.1.5.6. Fragmento <i>Bcn7</i>  | 215        |
| 5.3.1.5.7. Análisis de la secuencia de aminoácidos  | 217        |
| 5.3.1.5.8. Análisis filogenético  | 218        |
| 5.3.2. Muestras clínicas humanas  | 220        |
| 5.3.3. Infección natural de la población de cerdos por cepas relacionadas con el VHE        | 221        |
| 5.3.3.1. Prevalencia de anticuerpos en suero de cerdo                                       | 221        |
| 5.3.3.2. Detección de cepas del VHE de origen porcino                                       | 221        |
| 5.3.3.2.1. Sensibilidad en la detección de ARN de VHE en muestras de suero y heces de cerdo | 222        |
| 5.3.3.2.2. Análisis de muestras de heces de cerdo   | 223        |
| 5.3.3.2.3. Análisis de muestras de suero porcino  | 223        |
| 5.3.3.2.4. Análisis de aguas residuales de mataderos porcinos                               | 223        |
| 5.3.4. Caracterización genética de las cepas de VHE de origen clínico y animal              | 224        |
| 5.3.4.1. Fragmento del ORF2   | 224        |
| 5.3.4.2. Fragmento del ORF1   | 227        |
| 5.3.4.3. Análisis filogenético  | 231        |
| <b>5.4. DISCUSIÓN</b>   | <b>233</b> |
| <b>Conclusiones</b>   | <b>237</b> |
| <b>Soluciones, tampones y medios de cultivo</b>   | <b>241</b> |
| <b>Bibliografía</b>   | <b>257</b> |

---

**Listado de abreviaturas**

|                   |   |
|-------------------|---|
| ABTS              | Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)   |
| Ad                | Adenovirus  |
| AdH               | Adenovirus humanos                                      |
| ADN               | Ácido desoxirribonucleico                               |
| ADNc              | Ácido desoxirribonucleico copia                         |
| amp               | Ampicilina  |
| ARN               | Ácido ribonucleico                                      |
| ARNasa            | Ribonucleasa  |
| ATCC              | Colección Americana de Cultivos Tipo                    |
| BGM               | Línea celular de riñón de mono verde de Buffalo         |
| BPRM              | Medio de recuperación de fagos de <i>Bacteroides</i>    |
| CV                | Coxsackievirus  |
| Da                | Dalton  |
| DO <sub>(1)</sub> | Densidad óptica a una longitud de onda 1                |
| DTT               | Ditiotreitol  |
| EDAR              | Estación Depuradora de Aguas Residuales                 |
| EDTA              | Ácido etilen-diamin-tetraacético                        |
| EG                | Equivalente genómico                                    |
| ELISA             | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>                |
| EMBL              | European molecular biology library                      |
| ETAP              | Estación de Tratamiento de Aguas Potables               |
| EV                | Enterovirus   |
| FBS               | Suero fetal bovino                                      |
| FRhK              | Línea celular de riñón fetal de mono rhesus             |
| GenBank           | Base de datos moleculares de Estados Unidos             |
| GuSCN             | Guanidinium isotiocianato                               |
| HCl               | Ácido clorhídrico                                       |
| HEPES             | Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico     |
| HSP               | Hospital de San Pablo (Barcelona)                       |
| IgG               | Inmunoglobulina tipo G                                  |
| IgM               | Inmunoglobulina tipo M                                  |
| IPTG              | Isopropyl- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido              |
| LB                | Medio Luria-Bertani                                     |
| log               | Logaritmo   |
| MEM               | Medio esencial mínimo                                   |
| MMLV              | Moloney murine leukemia virus                           |
| NCTC              | Colección Británica de Cultivos Tipo                    |
| NMP               | Número más probable                                     |
| NMWL              | Peso molecular nominal límite                           |
| °C                | Grado Centígrado  |
| ORF               | Pauta de lectura abierta                                |
| p/v               | Peso/volumen  |
| PBS               | Tampón fosfato salino                                   |
| PCR               | Reacción en cadena de la polimerasa                     |
| pH                | -Log <sub>10</sub> de la concentración de hidrogeniones |
| pHi               | pH isoelectrico   |
| PV                | Partícula vírica  |
| RT                | Retrotranscripción                                      |
| RYC               | Hospital Ramón y Cajal (Madrid)                         |
| TSB               | Caldo de triptona de soja                               |
| U                 | Unidades  |
| ufc               | Unidades formadoras de colonias                         |
| UFC               | Unidades formadoras de calvas                           |
| V                 | Voltio  |
| v/v               | Volumen/volumen   |

|       |   |
|-------|---|
| VHA   | Virus de la Hepatitis A                         |
| VHE   | Virus de la Hepatitis E                         |
| ×g    | Fuerza centrifuga relativa                      |
| X-gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido |

En este listado no se incluyen unidades de medida, ni otras abreviaturas de términos científicos utilizados de forma convencional en publicaciones internacionales.

*Capítulo 1.*

*Introducción general y objetivos*

---



## **1.1. LOS ORÍGENES DE LA VIROLOGÍA AMBIENTAL**

La Virología Ambiental como ciencia apareció hace más de 50 años, a partir de la detección de poliovirus en aguas contaminadas.

Durante 30 años, desde su descubrimiento en 1908, se había pensado que las infecciones por poliovirus se iniciaban por vía nasal, multiplicándose en el bulbo olfatorio, y trasladándose a través de las fibras nerviosas directamente hacia el sistema nervioso central (Metcalf y col., 1995). La poliomielitis fue considerada estrictamente una enfermedad neurotrópica, aunque no se conocía bien la naturaleza de su patogénesis ni el modo de transmisión.

A finales de la década de los 30 se demostró que los virus no sólo se podían aislar a partir de la médula espinal, sino que se excretaban durante semanas en grandes cantidades a través de las heces de individuos infectados. A partir de entonces comenzó a considerarse como una enfermedad entérica, posiblemente transmitida por el agua contaminada. Durante 1940-1945 se estudió la posibilidad de transmitir la infección a primates mediante inoculación de concentrados de aguas residuales, demostrando así la presencia de partículas infecciosas en el ambiente, aunque no la vía de transmisión fecal-oral.

A finales de los años 40, se identificaron los coxsackievirus A y B, y posteriormente los echovirus, que junto con poliovirus fueron reconocidos como familia. Todos los miembros comparten similares propiedades químicas y físicas, tiene como hábitat el tracto intestinal humano, y se encuentran regularmente en aguas contaminadas. A pesar de esto hay pocas evidencias directas que relacionen la presencia de enterovirus en aguas residuales como causante de enfermedades de transmisión hídrica.

Se han descrito importantes brotes de hepatitis víricas en diversos países, como el acontecido en Nueva Delhi entre diciembre de 1955 y enero de 1956, que afectó a 230.000 personas. El origen de la epidemia fue la contaminación del río que servía de fuente de abastecimiento de la planta potabilizadora de aguas para el consumo doméstico, seis semanas antes de la aparición del brote epidémico. Durante el período de la contaminación el agua fue tratada con altas dosis de alúmina y cloración posterior para prevenir la aparición de enfermedades infecciosas de origen bacteriano y algunas de origen vírico, aunque no se pudo impedir la propagación de la hepatitis vírica. A raíz de la aparición de este brote se iniciaron estudios virológicos de las muestras de agua contaminada, aunque el agente etiológico no

pudo ser caracterizado hasta años después. La trascendencia sanitaria de este brote epidémico estimuló el nacimiento de una nueva disciplina a finales de los años 50, con la creación en la India del Instituto Nacional de Investigaciones de Ingeniería y Medio Ambiente, y posteriormente el grupo de Virología Ambiental del “Baylor College of Medicine” en Houston. Desde entonces hasta ahora han ido apareciendo en todo el mundo grupos especializados en la investigación de la contaminación vírica del medio ambiente.

## **1.2. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS VIRUS EN EL AMBIENTE**

Los ecosistemas acuáticos contienen cantidades variables de virus de forma natural, que constituyen un componente universal de la comunidad planctónica microbiana. La concentración de virus en aguas naturales no contaminadas (aguas marinas y lagos) se ha estimado entre  $10^5$  y  $10^8$  partículas por ml (Berg y col., 1989; Børsheim, 1993; Maranger y Bird, 1995; Pina y col., 1998a).

En las zonas cercanas a núcleos de población adicionalmente el medio acuático recibe aportes de grandes concentraciones de virus que son excretados por el hombre y otros animales a través de las heces y la orina de individuos infectados, incluso sin que presenten signos de enfermedad aparentes. La duración del periodo de excreción fecal depende del virus. Los adenovirus entéricos se encuentran en las heces 7–14 días después del inicio de la sintomatología clínica, entre 3–4 días en el caso de rotavirus pudiendo llegar a excretarse hasta  $10^{11}$  partículas de rotavirus por gramo. En el caso de poliovirus, la excreción comienza a las 24 h del inicio de la infección y se prolonga durante varios meses (Melnick, 1984; Schwatzbrod, 1995). La concentración de estos virus en las aguas residuales puede llegar a ser de  $10^5$  UFC/l. En las aguas superficiales la concentración de virus es lógicamente dependiente del grado de contaminación fecal, habiéndose detectado  $10$ – $10^2$  UFC/l de agua de río (World Health Organization, 1979) y entre  $1$ – $10$  UFC/l en agua de mar (Schwatzbrod, 1995).

Estos virus pueden sobrevivir durante varios meses en el medio, pueden resistir los procesos de tratamiento convencionales del agua, incluso la cloración con un nivel de supervivencia superior al de las bacterias, pudiendo así encontrarse lejos de la fuente original de contaminación, constituyendo un riesgo potencial de nuevas infecciones (World Health Organization, 1979).



Las vías de transmisión de los virus en el medio ambiente son muy diversas (Figura 1.1.). Su conocimiento ha provocado una creciente alarma al comprobarse que la población está expuesta a una gran variedad de posibilidades para adquirir una infección. Las distintas vías de transmisión incluyen:

- ↪ Ingestión de agua contaminada
- ↪ Ingestión de moluscos bivalvos o mariscos crudos o poco cocinados, que hayan crecido en aguas que reciben aporte de aguas residuales
- ↪ Ingestión de vegetales que se han regado con aguas insuficientemente tratadas o que se han cultivado en terrenos abonados con lodos de depuradora que contenían virus infecciosos
- ↪ Contacto con aguas de baño que han recibido aporte de aguas contaminadas
- ↪ Contacto con aerosoles generados a partir de aguas contaminadas

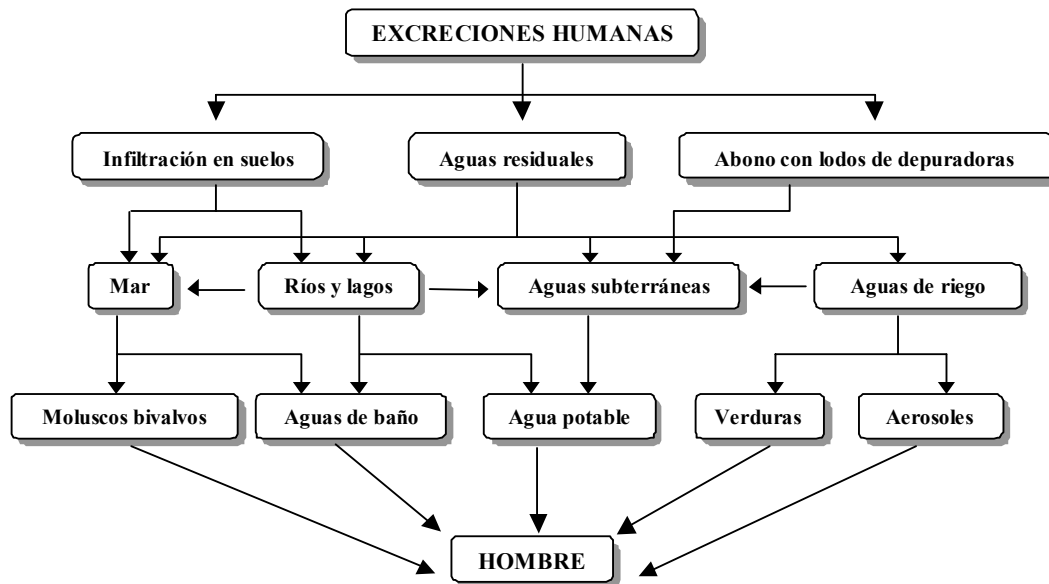


Figura 1.1. Ruta de transmisión fecal-oral de los virus entéricos humanos en el medio ambiente. Modificado de Melnick y col., 1978.

### **1.3. EL AGUA COMO AGENTE TRANSMISOR DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS: NECESIDAD DE CONTROL VIROLÓGICO**

Cada vez se manifiesta un mayor interés por la contaminación del agua y el suelo por virus. Este problema, como factor en la diseminación de virosis, tiene consecuencias trascendentes que aún no han sido plenamente evaluadas. La mayoría de los ríos que sirven como fuentes de agua potable transportan cantidades variables de aguas de desecho, que se ven incrementadas en los periodos en que disminuye el caudal. La urbanización rápida tanto de los países desarrollados como de los países en vías de desarrollo ha dado lugar a problemas críticos en el suministro de agua y en la eliminación de desechos. Las crecientes demandas de fuentes de agua disponibles debidas al aumento de la población mundial y a la concurrente expansión de la industria hacen inevitable el aprovechamiento de las aguas residuales domésticas.

Se ha estimado que aproximadamente 3.000 millones de personas en todo el mundo carecen de sistemas de saneamiento. El 95% de las aguas residuales domésticas son vertidas al medio sin ser tratadas. Como consecuencia de estas deficiencias sanitarias y de la falta de aguas de bebida limpias, se ha estimado que cada año 3.500 millones de personas contraen alguna enfermedad de transmisión hídrica, y 3,3 millones de personas mueren anualmente de enfermedades entéricas. La razón principal de esta situación es el alto coste que supone la puesta a punto de procesos de tratamiento, y el mantenimiento infraestructuras apropiadas que permitan el control sanitario, de los que solamente se benefician el 6% de la población mundial (Niemiczynowicz, 1997).

Para evaluar los riesgos causados por los virus presentes en el agua y en el suelo, hay que considerar la dosis mínima infecciosa para el hombre cuando estos virus son ingeridos, además de otros factores como son el tipo de virus, la vía de penetración y la susceptibilidad del huésped. Los datos disponibles demuestran que para una gama de virus de origen humano, entre los que se incluye los enterovirus, dosis de 1–2 unidades infecciosa pueden producir enfermedad (Schiff y col., 1984; Gerba y Haas, 1988). El hecho de que se produzca infección no implica en todos los casos que se desarrolle enfermedad. En el caso de la hepatitis A el porcentaje de individuos con sintomatología clínica aumenta con la edad (<5% en niños, 75% en adultos), contrariamente a la incidencia de la infección por rotavirus que afecta mayoritariamente a niños.

La probabilidad de contraer una infección derivada de la exposición a bajas dosis de virus se ha evaluado asumiendo una distribución aleatoria de los virus en el agua de bebida. El riesgo anual de infección por enterovirus a una concentración de 1 UFC/1000 l suponiendo un consumo de agua por individuo de 2 l/día se ha estimado en más de un caso por cada 10000 personas (Gerba y Haas, 1988).

### **1.3.1. Epidemiología de las enfermedades víricas de transmisión hídrica**

Se ha descrito una incidencia de un 4,7% de brotes epidémicos de origen vírico transmitidos por el agua en USA entre 1975 y 1979, frente a un 56,3% de brotes relacionados con aguas contaminadas de etiología desconocida (Cliver, 1984). Se han documentado brotes producidos coxsackievirus, echovirus, los virus de la hepatitis A y E, rotavirus y virus de Norwalk relacionados con aguas de distribución (Hejkal y col., 1982; Kaplan y col., 1982; Hopkins y col., 1984; Gerba y col., 1984; Rab., y col., 1997), que se han vinculado al mal funcionamiento de los sistemas de depuración aplicados o a la contaminación del sistema de distribución con aguas residuales. Gerba y col. en 1984, demostraron la presencia de rotavirus y enterovirus en aguas sometidas a un proceso de potabilización en los que se cumplían con los valores estándar de calidad para aguas potables (0 UFC coliformes/100 ml, concentración de cloro libre superior a 0,5 mg/l). En el mismo estudio se describe un brote de gastroenteritis que afectó a 7900 individuos, y 36 casos de hepatitis A relacionados con la contaminación de los pozos de suministro con aguas residuales. El agua de los pozos se sometía habitualmente a un proceso de cloración antes de distribuirse por la red. Los exámenes virológicos permitieron identificar coxsackievirus B2 y B3, y VHA en el agua residual de la comunidad y en el agua de pozo, así como coxsackievirus B3 en el agua de distribución clorada. Los exámenes bacteriológicos no indicaban contaminación fecal en el agua clorada, aunque los virus podían sobrevivir al proceso (Gerba y col., 1984).

El riesgo relacionado con el uso de aguas recreativas (aguas de mar, ríos y lagos, piscinas) se asocia principalmente a la presencia de adenovirus, que provocan infecciones oculares o respiratorias, de poco significado epidemiológico.

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales pueden general aerosoles que se transportan por el aire, y que actúan como vehículo de transmisión de virus al ser inhalados (Carducci y col., 1995; DeSerres y Lalibert, 1997). Esto puede tener consecuencias epidemiológicas importantes en personas expuestas a aerosoles (trabajadores de plantas de

tratamiento de aguas residuales, agricultores que utilizan aguas residuales o lodos en sus campos). En el caso de la agricultura la utilización de aguas residuales depuradas o no, y la utilización de lodos como abono podría conducir a la contaminación de los vegetales cultivados ya sea por contacto directo o con aerosoles. Además, se ha descrito la incorporación de virus por parte de las plantas irrigadas con aguas residuales a través de raíces o tallos dañados. Los virus son transportados de forma pasiva a través del sistema conductor de la planta hacia las partes aéreas (Katzenelson y Mills, 1984). La concentración de virus de origen humano es elevada en las capas superiores de suelos irrigados con aguas residuales o abonados con lodos, y la tasa de supervivencia de los virus puede llegar a ser de varios meses, como en el caso de poliovirus (Tierney y col., 1977), así pues las plantas cultivadas podrían incorporar virus a sus tejidos.

### **1.3.2. Normativa aplicable al control microbiológico del agua**

La importancia para la salud pública de las aguas destinadas al consumo humano hace necesaria la fijación de normas de calidad. Con este fin se ha establecido la reglamentación técnico sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público (Directiva del Consejo 80/778/CEE Real Decreto 1138/1990). Esta normativa es aplicable a todas las aguas destinadas al consumo humano, salvo las minerales naturales y las medicinales, y establece que deben controlarse los siguientes parámetros microbiológicos determinados por métodos analíticos estandarizados:

- Coliformes totales (concentración máxima admisible  $<1$  NMP/100 ml)
- Coliformes fecales (concentración máxima admisible  $<1$  NMP/100 ml)
- *Streptococos* fecales (concentración máxima admisible  $<1$  NMP/100 ml)
- *Clostridios* sulfitoreductores (concentración máxima admisible  $\leq 1$  NMP/20 ml)

En situaciones particulares que requieran una especial vigilancia sanitaria del agua del sistema conviene completar los análisis con la determinación de bacteriófagos fecales, salmonela, estafilococos patógenos y enterovirus. Además, el agua no debe contener organismos parásitos, ni algas, ni otros elementos figurados.

Asimismo, con el objetivo de controlar el riesgo sanitario que las aguas recreativas representan para la salud humana, se aprobó la normativa que establece los estándares de calidad relativos a las aguas de baño (Directiva del Consejo 76/160/CEE; Real Decreto

734/1988). En esta legislación se establecen unos valores guía que deben cumplir el 80-90% de las muestras analizadas:

- Coliformes totales (<500 ufc/100 ml en el 80% de las muestras)
- Coliformes fecales (<100 ufc/100 ml en el 80% de las muestras)
- Estreptococos fecales (<100 ufc/100 ml en el 90% de las muestras)
- Salmonela (0 ufc/l en el 95% de las muestras)
- Enterovirus (0 UFC/ 10 l en el 95% de las muestras)

La valoración de la calidad del agua que se lleva a cabo actualmente se basa fundamentalmente en parámetros bacterianos. El control rutinario de estos parámetros puede significar una mejora, aunque las limitaciones que presentan dichos estándares conducen a una revisión de la normativa y a considerar alternativas. En concreto, los indicadores bacterianos no son un reflejo de la calidad virológica del agua, ya que presentan una menor supervivencia y una menor resistencia a los procesos de tratamiento de agua y a la autodepuración natural que los virus. Por otro lado, el control rutinario de enterovirus por las técnicas clásicas de aislamiento en cultivo celular es laborioso, y conduce a resultados poco fiables en cuanto a la baja sensibilidad de la técnica. Además, varias razones han permitido concluir en que no es un buen parámetro indicador:

- ⇒ Gran parte de los enterovirus aislados del ambiente eran cepas de poliovirus vacunal. En la actualidad la vacunación se realiza en niños de muy corta edad y, por tanto, las heces no llegan a las aguas residuales sino que se eliminan en los pañales.
- ⇒ Los enterovirus son menos resistentes que otros virus patógenos como el VHA cuando se someten a determinados tratamientos.
- ⇒ Los resultados que se presentan en esta tesis y otros que la han seguido han demostrado la presencia de virus de origen humano en aguas residuales y naturales incluso en muestras que no presentaban enterovirus.

Los datos existentes aprueban la necesidad de evaluar indicadores víricos alternativos.

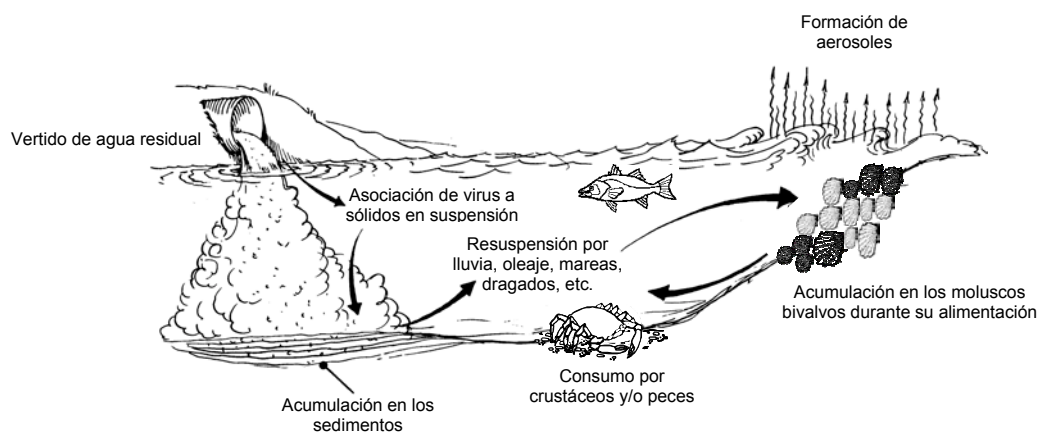
## **1.4. LOS MOLUSCOS BIVALVOS COMO AGENTES TRANSMISORES DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Los productos extraídos del mar constituyen una proporción muy importante de los recursos alimenticios a escala mundial. La actividad económica relacionada con la explotación de los criaderos naturales de moluscos bivalvos y el cultivo artificial tiene una gran importancia en la Comunidad Europea. En nuestro país, esta actividad económica de gran trascendencia se ha desarrollado principalmente en el noroeste español, en el que las rías gallegas constituyen un ecosistema muy propicio para su desarrollo. Las especies explotadas comercialmente incluye la ostra plana (*Ostrea edulis*), ostrón (*Crassostrea gigas*), el mejillón común mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) y atlántico (*Mytilus edulis*), varias especies de almeja (*Tapes* spp., *Mercenaria mercenaria*), el berberecho (*Cerastoderma edule*), la navaja (*Ensis* spp.), la vieira (*Pecten maximus*) (Lees, 2000). También existe una producción constante en el área del Delta del Ebro, dónde se cultiva ostrón y mejillón principalmente.

El aumento de los aportes de aguas residuales al mar, debido al fuerte incremento de la población y a la actividad industrial han comprometido la calidad sanitaria de las zonas costeras (Figura 1.2.). Esta situación no solo conlleva cambios importantes en las características físico-químicas y biológicas del ecosistema marino, sino que constituye un riesgo potencial para la salud pública derivado del consumo directo de organismos marinos y de las actividades recreativas que se realizan en las aguas costeras contaminadas por aguas residuales. Independientemente del comercio, la recolección no controlada se desarrolla a lo largo de todo el litoral, y es precisamente esta actividad, con el consiguiente consumo directo sin los debidos controles sanitarios y sin ser sometidos a depuración, la que pueden representar una vía de transmisión de ciertas enfermedades.

Los moluscos bivalvos son animales de carácter sedentario y de régimen alimentario exclusivamente filtrador. Las branquias cubiertas de mucus y cilios vibrátiles, además de cumplir con la función respiratoria, retienen las partículas en suspensión, entre ellas, bacterias, virus y protistas planctónicos (Di Girolamo y col., 1977). Asimismo las materias en solución contenidas en el agua también son absorbidas e incorporadas a su organismo. Los productos ingeridos siguen diferentes caminos:

- A) la materia orgánica, ciertos protistas planctónicos, sales minerales, factores de crecimiento, constituyen su propio alimento que es asimilado por el animal, distribuyéndose por toda su anatomía.
- B) otros microorganismos son retenidos en el tracto digestivo o en el aparato filtrador, y generalmente no suelen ser nocivos para el animal, si bien en algunas ocasiones pueden representar un riesgo para la salud del hombre en el caso de que hayan acumulado bacterias patógenas, virus animales o biotoxinas producidas por dinoflagelados.



**Figura 1.2.** Destino de los virus en los ecosistemas marítimos. Modificado de Melnick y Gerba, 1980.

Estos moluscos poseen un elevado ritmo de bombeo, que se ha estimado entre 0,5 y 4 litros por hora, dependiendo de su tamaño y de las condiciones ambientales, por lo que constituyen verdaderos concentradores biológicos. Los animales fisiológicamente activos son capaces de acumular virus muy rápidamente. Mitchell y col. en 1966 observaron que en agua de mar conteniendo  $10^3$  UFC de Poliovirus tipo 1 por mililitro, la concentración de virus en las ostras podía ser 27 veces superior a la del agua de mar tras un tiempo de exposición de 1 h. Sin embargo, varios factores afectan la tasa de filtración y la capacidad de bioacumulación de virus por los moluscos bivalvos:

1. El tipo de molusco y sus características anatómicas tienen una gran influencia en la retención de virus. Así pues, aquellos que viven en los sedimentos, que constituyen un reservorio de microorganismos, suelen estar más contaminados que moluscos que viven en aguas abiertas.

2. El estado en el que se encuentra el virus (libre o adsorbido a partículas) juega también un papel muy importante, siendo más fácil de acumular si está unido a material suspendido (Metcalf y col., 1979)
3. Se ha observado una mayor tasa de acumulación cuando la concentración de virus en el agua es alta. Varios estudios se han hecho en agua de mar con unas concentraciones de virus de  $10^2$ – $10^6$  UFC/ml (Mesquita, 1988). Utilizando niveles de contaminación similares a los naturales ( $10^{-2}$ – $10^1$  UFC/ml) se han observado factores de bioacumulación entre 19 y 34 (Metcalf y col., 1979). A concentraciones de  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  UFC/ml existe un equilibrio entre la tasa de acumulación y la tasa de depuración (Landry y col., 1982).

En cuanto a la localización de los virus, estos se acumulan en el tracto digestivo. Otras partes del cuerpo (branquias, manto, pie) tiene niveles de contaminación similares al del agua circundante (Power y Collins, 1990).

Los virus acumulados en los tejidos de los moluscos bivalvos pueden persistir y permanecen viables durante mucho tiempo una vez que han sido recolectados hasta que son consumidos (Tierney y col., 1982). Es por esto necesario procesos de descontaminación basados en la inmersión de los moluscos en agua de mar microbiológicamente limpia, desinfectada con ozono o radiación ultravioleta, durante un periodo de 24 a 72 h. Las bacterias fecales utilizadas como indicadores son eliminadas más rápidamente que los virus (Mesquita, 1988; Power y Collins, 1989), por tanto su ausencia no puede indicar que la depuración sea completa.

#### **1.4.1. Epidemiología de las infecciones atribuidas al consumo de moluscos bivalvos**

Varios patógenos bacterianos están involucrados en toxi-infecciones alimentarias asociadas con el consumo de mariscos (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*), aunque son los virus la causa más frecuente (Lipp y Rose, 1997). Se han descrito en todo el mundo numerosos brotes de hepatitis A asociados al consumo de bivalvos (Lipp y Rose, 1997; Lees, 2000) (Tabla 1.1.), entre ellos el ocurrido en Shanghai (China) en 1988 donde se documentaron 300.000 casos relacionados con la ingestión de almejas recogidas en una zona que recibía aportes de agua residual (Halliday y col., 1991). El consumo de bivalvos se ha relacionado con el 70% de las



hepatitis de tipo A diagnosticadas en Italia, 19% en Alemania, 25% en el Reino Unido o el 11% en Japón (Lees, 2000).

Las gastroenteritis a menudo son también una consecuencia directa del consumo de moluscos bivalvos contaminados con virus de Norwalk (Tabla 1.1.). En el Reino Unido, entre 1965 y 1983, el 37% de los brotes infecciosos declarados relacionados con el consumo de bivalvos fueron causados por virus pequeños redondos, el 17% por el virus de la hepatitis A y en el 43% no se identificó el agente (Lees, 2000).

Los datos epidemiológicos recogidos han demostrado estacionalidad en la aparición de infecciones producidas por el consumo de moluscos bivalvos, siendo más predominantes en los meses fríos (Lees, 2000).

**TABLA 1.1.**  
**Infecciones víricas atribuidas al consumo de moluscos bivalvos<sup>a</sup>**

| Virus                | Año       | Lugar               | Nº casos | Causa               |
|----------------------|-----------|---------------------|----------|---------------------|
| VHA                  | 1955      | Suecia              | ?        | almejas             |
|                      | 1961      | Mississippi (USA)   | 84       | ostras              |
|                      | 1973      | Luisiana (USA)      | 263      | ostras              |
|                      | 1978      | Reino Unido         | 41       | mejillones          |
|                      | 1984      | Livorno (Italia)    | 75       | mejillones, almejas |
|                      | 1988      | Shanghai (China)    | 300.000  | almejas             |
|                      | 1994      | Italia              | 620      | mejillones          |
|                      | 1996      | Puglia (Italia)     | 271      | varias especies     |
| Virus de Norwalk     | 1976-1977 | Reino Unido         | 800      | berberechos         |
|                      | 1978      | Sydney (Australia)  | 2000     | ostras              |
|                      | 1982      | USA                 | 1472     | almejas, ostras     |
|                      | 1983      | USA                 | 2000     | almejas             |
|                      | 1991      | Canadá              | 200      | Ostras              |
| Agente Snow Mountain | 1977      | Massachusetts (USA) | 83       | almejas             |
|                      | 1980-1994 | Nueva York (USA)    | 126      | almejas             |

<sup>a</sup> Datos recogidos por LeGuyader y col., 1996; Lipp y Rose 1997; Wallace y col., 1999; Croci y col., 2000; Lees, 2000.

### 1.4.2. Normativa aplicable a la producción y comercialización de moluscos bivalvos

Resulta indispensable aplicar una normativa para controlar la calidad sanitaria de las aguas destinadas a la producción, así como un reglamento de salubridad de los moluscos

bivalvos. Como consecuencia de la adhesión de España a la Comunidad Europea, se ha efectuado la adecuación de la normativa nacional sobre la materia a lo establecido por la Directiva del Consejo 91/492/CEE. Así pues, se ha establecido el Real Decreto 308/1993 y 571/1999 en los que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos, gasterópodos y equinodermos destinados al consumo humano directo o a la transformación previa a su consumo.

Las zonas de producción se han clasificado de acuerdo a las siguientes categorías:

- ↪ Zonas “tipo A”: en dichas zonas, los moluscos bivalvos vivos tendrán menos de 300 coliformes fecales o menos de 230 *E. coli* por cada 100 g de carne de molusco y líquido intervalvar. Los moluscos extraídos de estas regiones podrán ser destinados al consumo humano directo.
- ↪ Zonas “tipo B”: los moluscos bivalvos en estas zonas presentarán un índice igual o inferior a 6000 coliformes fecales o 4600 *E. coli* por cada 100 g de carne en el 90% de las muestras. Los animales procedentes de estas zonas destinarán al consumo humano tras someterse a un tratamiento de depuración o reinstalación.
- ↪ Zonas “tipo C”: los moluscos bivalvos de estas zonas presentarán un índice inferior a 60.000 coliformes fecales por cada 100 g de carne. Los moluscos extraídos de estas zonas podrán ser destinados al consumo humano tras su reinstalación durante un periodo mínimo de 12 meses, o tras una depuración intensiva a fin de cumplir las condiciones mencionadas anteriormente.

A falta de métodos habituales de detección de virus y de normativa en cuanto a la calidad virológica, el control sanitario se basa en el recuento de bacterias fecales. Así pues, los moluscos bivalvos destinados al consumo humano inmediato deben cumplir básicamente con niveles establecidos para una zona de categoría A, y no contener salmonela en 25 g de carne. Además, deben cumplir con las características visuales propias de frescura y viabilidad y no contener compuestos tóxicos o nocivos (toxinas, metales pesados, pesticidas).

## 1.5. BACTERIAS, PROTOZOOS Y PARÁSITOS TRANSMITIDOS POR VÍA HÍDRICA

Además de los virus otros microorganismos patógenos tales como bacterias, protozoos y parásitos, y toxinas producidas por cianobacterias, se transmiten por vía hídrica o están asociados al consumo de moluscos bivalvos (Tabla 1.2.).

**TABLA1.2.**  
**Microorganismos transmitidos por vía hídrica**

| Tipo                             | Especie   | Patología   |
|----------------------------------|---|---|
| <b>Bacterias</b>                 | <i>Salmonella</i> spp.  | Gastroenteritis                                   |
|                                  | <i>Shigella</i> spp.  | Disentería  |
|                                  | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva  | Disentería  |
|                                  | <i>E. coli</i> enterohemorrágica  | Diarrea con sangre                                |
|                                  | <i>E. coli</i> enterotoxigénica   | Diarrea   |
|                                  | <i>Campylobacter</i> spp.   | Gastroenteritis                                   |
|                                  | <i>Vibrio cholerae</i> O1   | Cólera  |
|                                  | <i>V. cholerae</i> no O1  | Diarrea   |
|                                  | <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i><br><i>Yersinia enterocolitica</i>             | Gastroenteritis<br>Diarrea con sangre             |
| <b>Patógenos oportunistas</b>    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | Infecciones oculares y del oído, dermatitis       |
|                                  | <i>Mycobacterium</i> spp.   | Lesiones en la piel                               |
|                                  | <i>Aeromonas</i> spp.   | Infecciones de heridas, diarrea                   |
|                                  | <i>Flavobacterium</i> spp.  | Meningitis  |
|                                  | <i>Acinetobacter</i> spp.   | Meningitis, infecciones de heridas                |
|                                  | <i>Klebsiella</i> spp.<br><i>Legionella</i> spp.  | Neumonía<br>Enfermedad del legionario             |
| <b>Protozoos</b>                 | <i>Entamoeba histolytica</i>  | Disentería  |
|                                  | <i>Giardia intestinalis</i> , <i>G. lamblia</i>   | Giardiasis  |
|                                  | <i>Cryptosporidium parvum</i>   | Diarrea   |
|                                  | <i>Naegleria fowleri</i>  | Meningoencefalitis                                |
|                                  | <i>Acanthamoeba</i> spp.  | Lesiones en la piel, conjuntivitis                |
|                                  | <i>Gonyaulax</i> spp., <i>Pyrodinium</i> spp.<br><i>Procentrum</i> spp., <i>Dinophysis</i> spp. | Intoxicación paralítica<br>Intoxicación diarreica |
| <b>Parásitos</b>                 | <i>Schistosoma</i> spp.   | Esquistosomiasis, dermatitis                      |
|                                  | <i>Dracunculus medinensis</i>   | Dracunculiasis                                    |
|                                  | <i>Ancylostoma</i>  | Trastornos gastrointestinales                     |
|                                  | <i>Ascaris</i>  | Trastornos gastrointestinales                     |
|                                  | <i>Taenia</i>   | Trastornos gastrointestinales                     |
| <b>Toxinas de cianobacterias</b> | <i>Microcystis aeruginosa</i>   | Envenenamiento                                    |

Las infecciones por bacterias se relacionan con el consumo de alimentos o agua contaminados fecalmente, o la exposición a aerosoles. Estas producen enfermedades del tracto digestivo cuyo índice de gravedad va desde una ligera gastroenteritis hasta casos graves, y a veces fatales, de disentería, cólera o fiebre tifoidea. Otros microorganismos cuya presencia en el ambiente puede ser natural pueden producir graves enfermedades, e incluso algunos microorganismos acuáticos considerados como no patógenos, pueden llegar a causar enfermedades de tipo oportunista, sobre todo en personas inmunodeprimidas, hospitalizadas, ancianos o niños, en los que puede ocasionar infecciones de la piel y mucosas.

La dosis infecciosa es variable según el microorganismo y el estado del hospedador. En el caso de *Salmonella typhi*, la ingestión de unos pocos organismos puede causar enfermedad; cuando se trata de *Shigella flexneri*, se requieren varios cientos de células, en tanto que serán necesarios alrededor de  $10^8$  microorganismos en el caso de *E. coli* enterotoxigénica o en *Vibrio cholerae* (Organización Panamericana de la Salud, 1987).

Los cistes y oocistes de parásitos intestinales tales como *Giardia* y *Cryptosporidium* son excepcionalmente resistentes. Generalmente se encuentran en números bajos en los ambientes acuáticos, y normalmente no son detectables. Sin embargo, la dosis mínima infecciosa suele ser de un ciste o oociste, así pues su presencia en aguas naturales constituye un riesgo sanitario. Ciertos dinoflagelados de origen marino son capaces de producir toxinas que se acumulan en los moluscos filtradores al ser ingeridos, sin que ello sea pernicioso para el animal, pero que puede producir graves intoxicaciones en el hombre que pueden tener desenlace fatal (López, 1987).

## **1.6. VIRUS TRANSMITIDOS POR VÍA HÍDRICA**

El hombre excreta una gran cantidad de virus distintos a través de las heces, la orina y otras secreciones, que constituyen contaminantes del medio acuático. Son causantes de una gran variedad de enfermedades que afectan principalmente al tracto gastrointestinal, hígado, piel y mucosas, y sistema nervioso (Tabla 1.3.).

**TABLA 1.3.**  
**Grupos de virus de origen humano excretados al ambiente**

| Familia               | Género  | Genoma  | Tamaño de la partícula | Principales especies   | Número de serotipos     | Enfermedades asociadas   |
|-----------------------|---|---|------------------------|--|-------------------------|--|
| <i>Adenoviridae</i>   | Mastadenovirus  | ADNdc lineal 33-39 Kb   | 70-90 nm               | Adenovirus humanos   | 47                      | Infecciones respiratorias, oculares, urinarias, gastroenteritis              |
| <i>Parvoviridae</i>   | Parvovirus<br>Dependovirus  | ADNcs   | 18-26 nm               |  |                         | Enfermedades respiratorias?<br>Asociados con otros virus                     |
| <i>Polyomaviridae</i> | Poliomavirus  | ADNdc circular 5 Kb   |                        | JC<br>BK, SV40   | 2                       | Infecciones del riñón y tracto urinario,<br>infecciones del sistema nervioso |
| <i>Picornaviridae</i> | Enterovirus   | ARNcs(+) lineal 7-8 Kb  | 25-30 nm               | Poliovirus<br>Coxsackievirus A<br>Coxsackievirus B<br>Echovirus<br>Enterovirus 68-71 | 3<br>23<br>6<br>32<br>4 | Infecciones del sistema nervioso,<br>oculares y respiratorias                |
| <i>Caliciviridae</i>  | Hepatovirus<br>Virus <i>Norwalk-like</i><br>Virus <i>Sapporo-like</i> | ARNcs(+) lineal 7,8 Kb<br>ARNcs(+) lineal<br>ARNcs(+) lineal 7,2 Kb | 35-40 nm<br>28-32 nm   | Virus de la hepatitis A<br>Virus de Norwalk<br>Virus de Sapporo                      | 1                       | Hepatitis tipo A<br>Gastroenteritis  |
| -----                 | Virus <i>hepatitis E-like</i>   | ARNcs(+) lineal 7,2 Kb  | 28-32 nm               | Virus de la hepatitis E  | 1                       | Hepatitis tipo E   |
| <i>Reoviridae</i>     | Ortoevirus<br>Rotavirus   | ARNdc segmentado  | 65-80 nm               | Reovirus<br>Rotavirus humanos  | 3<br>14                 | Gastroenteritis?<br>Gastroenteritis  |
| <i>Astroviridae</i>   | Astrovirus  | ARNcs(+) lineal 6,8-7,9 Kb  | 28 nm                  | Astrovirus   |                         | Gastroenteritis  |
| <i>Coronaviridae</i>  | Coronavirus<br>Torovirus  | ARNcs(+) lineal 27-32 Kb  | 100 nm                 | Coronavirus<br>Virus tipo Breda y Berna  | 2<br>?                  | Gastroenteritis, enterocolitis<br>Gastroenteritis                            |
| <i>Birnaviridae</i>   | Picobirnavirus  | ARNdc   | 32-35 nm               |  |                         | Gastroenteritis?   |

## **1.7. ADENOVIRUS HUMANOS**

### **1.7.1. Historia**

Los primeros adenovirus humanos fueron aislados por Rowe y col., en 1953 a partir de las glándulas adenoides. En estos tejidos se observaban cambios degenerativos resultantes de la replicación de un agente no identificado que se denominó “*adenoid degeneration agent*”. En 1954, Hilleman y Werner consiguieron aislar un agente infeccioso a partir de secreciones respiratorias, que inducía cambios citopáticos sobre líneas celulares de origen humano. Los adenovirus fueron descritos como agentes etiológicos de enfermedades respiratorias agudas (Hilleman y Werner, 1954), infecciones gastrointestinales, urinarias y oculares. También suponen un problema como patógenos oportunistas en individuos inmunodeprimidos. Estudios epidemiológicos confirmaron que los adenovirus provocan una pequeña proporción de las enfermedades respiratorias en la población general y un 5-10% en niños.

El grupo “adenovirus” fue propuesto en 1956 por Enders y col., y posteriormente aceptado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (Wildy, 1971).

### **1.7.2. Clasificación**

Los adenovirus constituyen una familia de virus de ADN (familia *Adenoviridae*) que infectan al hombre y a un amplio rango de especies animales. El género Mastadenovirus comprende virus que infectan a mamíferos (hombre, mono, cerdo, oveja, caballo, ciervo, perro, gato, tupaia, ratón, ballena, etc.).

Los 47 serotipos adenovirus humanos (AdH) se clasifican en siete subgéneros, A-F, en función de sus características fisicoquímicas, biológicas e inmunológicas. El estudio del genoma mediante hibridación, restricción enzimática y secuenciación corroboran esta clasificación. Algunas propiedades de los adenovirus humanos se describen en la Tabla 1.4.

**TABLA 1.4.**  
**Clasificación de los adenovirus humanos<sup>a</sup>**

| Subgénero | Serotipo  | Homología de secuencia (%) |               | Oncogenicidad | Enfermedad asociada   |
|-----------|---|----------------------------|---------------|---------------|---|
|           |   | Intragenérico              | Intergenérico |               |   |
| A         | 12, 18, 31  | 48-69                      | 8-20          | Elevada       | Meningoencefalitis, infecciones entéricas   |
| B1        | 3, 7, 16, 21  | 89-94                      | 9-20          | Débil         | Faringitis aguda, neumonía, conjuntivitis, infecciones fatales en neonatos  |
| B2        | 11, 14, 34, 35  |                            |               | Nula          | Conjuntivitis, infecciones del riñón y tracto urinario, infecciones respiratorias, infecciones en individuos inmunodeprimidos |
| C         | 1, 2, 5, 6  | 99-100                     | 10-16         | Nula          | Faringitis aguda, neumonía, infecciones en individuos inmunodeprimidos  |
| D         | 8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47 | 94-99                      | 4-17          | Nula          | Queratoconjuntivitis epidémica, infecciones fatales en neonatos, infecciones en individuos inmunodeprimidos                   |
| E         | 4   |                            | 4-23          | Nula          | Infección respiratoria, conjuntivitis   |
| F         | 40, 41  | 62-69                      | 15-22         | Nula          | Diarrea   |

<sup>a</sup> Modificado de Wadell, 1984; Sharp y Wadell 1995; Hunter, 1997.

### 1.7.3. Oncogenicidad

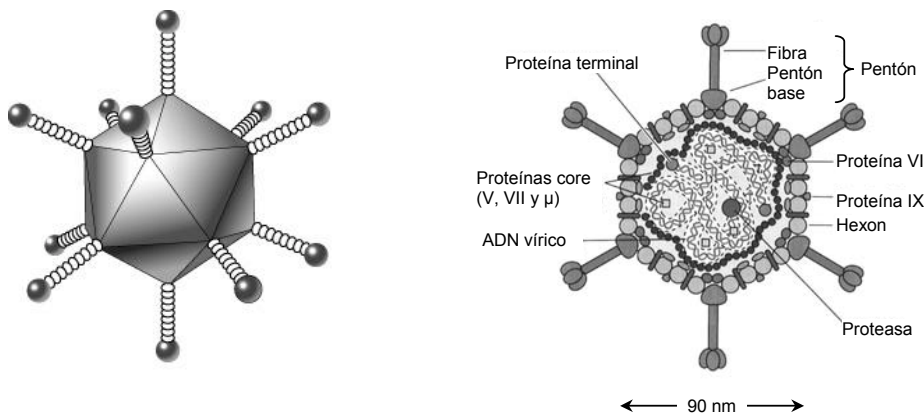
Los diferentes serotipos se ha dividido en tres grupos en función de su capacidad oncogénica observada en animales de experimentación (Tabla 1.4.):

- ⇒ Altamente oncogénicos: subgénero A, producen tumores en la mayoría de animales infectados en un plazo de 4 meses.
- ⇒ Débilmente oncogénicos: subgénero B, producen tumores en algunos animales en un plazo de 4-18 meses.
- ⇒ No oncogénicos: subgéneros C, D, E y F.

Todos los AdH tienen la capacidad de transformar células de ratón *in vitro*. Las células transformadas están libres de virus infecciosos pero sintetizan proteínas víricas que pueden detectarse mediante ensayos inmunológicos (Li, 1988).

### 1.7.4. Morfología y estructura

Las partículas víricas presentan una cápside desnuda de simetría icosaédrica (Figura 1.3.) con un diámetro entre 70 y 90 nm, con un peso molecular de 175-185 KDa y una densidad de flotación de 1,33-1,34 g/cm en cloruro de cesio (Li, 1988). El virión contiene un 13% de ADN y un 87% de proteína (Green y col., 1963).



**Figura 1.3.** Diagrama de la partícula vírica de Ad2, mostrando las proteínas mayoritarias de la cápside, proteínas estabilizadoras de la cápside y las proteínas core asociadas al ADN.

La partícula está formada por al menos 10 polipéptidos estructurales diferentes (Tabla 1.5.). La cápside está constituida por 252 capsómeros, y de la que surgen proyecciones filamentosas con propiedades hemoaglutinantes. Los 240 hexones que forman las 20 caras triangulares del icosaedro, están dispuestos simétricamente de forma que cada uno queda rodeado por otros 6 capsómeros. Los 12 vértices del virión contienen un capsómero con una proyección en forma de antena (fibra), y que está rodeado por otros 5 capsómeros formando un pentón.



**TABLA 1.5.**  
**Proteínas integrantes de la cápside de los adenovirus**

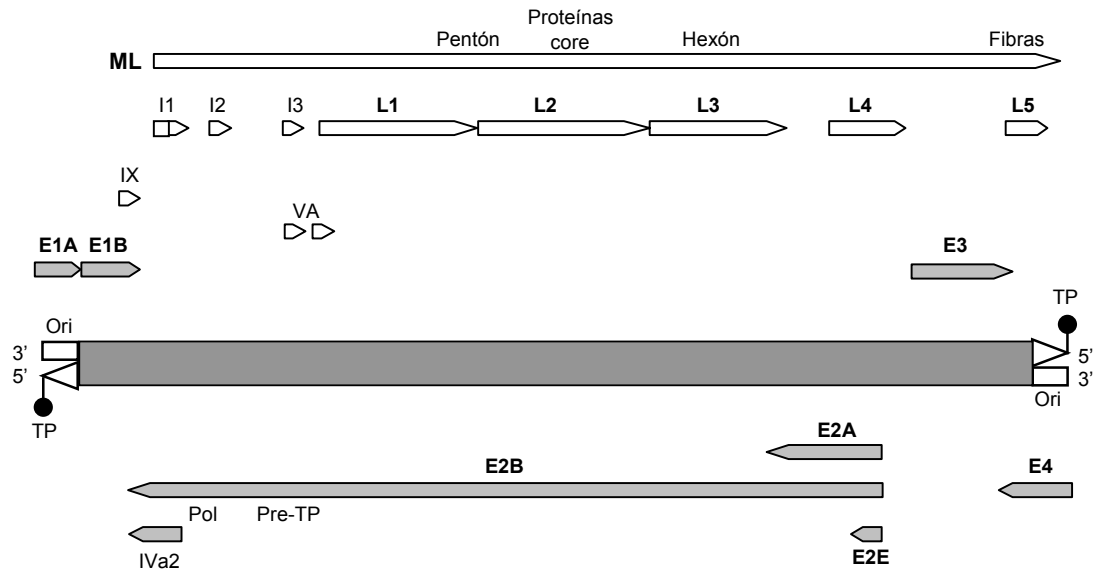
| <b>Nombre</b> | <b>Localización</b>                    | <b>Función</b>                                    |
|---------------|--|---|
| II            | Monómero del hexon                     | Estructural                                       |
| III           | Pentón base                            | Penetración                                       |
| IIIa          | Asociada al pentón base                | Penetración                                       |
| IV            | Fibra                                  | Unión al receptor, hemoaglutinación               |
| V             | Core: asociada al ADN y al pentón base | Empaquetamiento del ADN? (similar a las histonas) |
| VI            | Polipéptido minoritario del hexon      | Estabilización/ensamblaje de la partícula?        |
| VII           | Core: asociada al ADN y al pentón base | Similar a las histonas                            |
| VIII          | Polipéptido minoritario del hexon      | Estabilización/ensamblaje de la partícula?        |
| IX            | Polipéptido minoritario del hexon      | Estabilización/ensamblaje de la partícula?        |
| TP            | Proteína terminal unida al ADN         | Replicación del ADN                               |

### 1.7.5. Estabilidad

La partícula vírica es resistente a pH ácido, a la bilis y enzimas proteolíticos, lo que permite la multiplicación en el intestino humano (Allard, 1992). Asimismo, la ausencia de membranas o estructuras lipídicas hacen que sean resistentes a disolventes orgánicos (Green y col., 1963).

### 1.7.6. Organización del genoma

El genoma esta constituido por una molécula de ADN de bicatenario lineal de 36-38 Kb (Figura 1.4.), que codifica al menos 10 polipéptidos estructurales diferentes y 35 proteínas no estructurales (Pettersson, 1984). Presenta una proteína de 55 KDa unida covalentemente al extremo 5' de cada una de las cadenas (Rekosh y col., 1977), y repeticiones invertidas redundantes de 103-165 pb en los extremos (Shinagawa y col., 1987). Los dos extremos de la molécula pueden funcionar como origen de replicación. Las dos cadenas del ADN son transcritas.



**Figura 1.4.** Organización del genoma de adenovirus. Las flechas indican la dirección de la transcripción de las diferentes unidades. Ori, origen de replicación; TP, proteína terminal; Pol, polimerasa; E1A, E1B, E2A, E2B, E2E, E3, E4 genes tempranos; L1, L2, L3, L4, L5, I1, I2, I3, IX, genes tardíos; ML, genes tardíos mayoritarios.

### 1.7.7. Variabilidad genética

Se ha podido observar una variabilidad genética que oscila entre un 48-99% de homología dentro de cada serotipo y un 4-20% entre diferentes serotipos (Tabla 1.4.). El método utilizado comúnmente para identificar diferencias genómicas entre adenovirus se basa en el análisis mediante enzimas de restricción. Según este análisis se han podido definir más de 200 tipos genómicos que se diferencian en el patrón de restricción (Li, 1988). La secuenciación del ADN de representantes de diferentes serotipos ha demostrado deleciones e inserciones, y mutaciones puntuales (transiciones, transversiones) silenciosas.

### 1.7.8. Replicación

La infección se inicia con la unión de las fibras al receptor de la superficie de células permisivas, y la internalización posiblemente por endocitosis. Una vez en el endosoma, una bomba proteica dependiente de ATP hace que disminuya el pH, con lo que se altera la carga neta de la capsida vírica. La interacción de la capsida vírica con la membrana lipídica produce la ruptura del endosoma, permitiendo el transporte del virión hasta el núcleo celular. La

cápside remanente se pierde durante la liberación del core dentro del núcleo. La replicación del ADN, la transcripción y la maduración de los adenovirus tiene lugar en el núcleo celular (Sharp y Wadell, 1995).

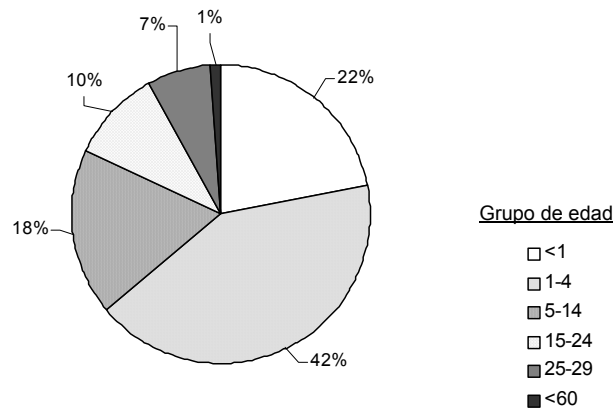
Durante el ciclo lítico los genes víricos se expresan en tres fases (Li, 1988):

- i) *Fase temprana*, que ocurre antes de la replicación del ADN vírico. Los genes tempranos (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4) codifican proteínas esenciales involucradas en la regulación de la transcripción viral, replicación del ADN y responsables de la transformación celular. El procesamiento post-transcripcional de los ARNm es complejo. Los ARNm maduros migran al citoplasma donde son traducidos a proteína.
- ii) *Fase intermedia*, durante la cual se expresan las proteínas estructurales pIX y pIVa2 que intervienen en la estabilización de la estructura de la cápside.
- iii) *Fase tardía*, caracterizada por la inhibición de la replicación y expresión de proteínas celulares, y la expresión de los genes víricos que codifican las proteínas estructurales (L1, L2, L3, L4 y L5). El procesamiento de los transcritos es complejo, y los ARNm maduros se traducen en el citoplasma. Los polipéptidos estructurales son transportados hasta el núcleo donde se inicia el ensamblaje de las partículas víricas. Treinta horas después de la infección pueden haberse producido  $10^5$  partículas por célula que forman cuerpos de inclusión cristalinos en el núcleo. La proporción de partículas infectivas varía entre 1/10 y 1/1000 según los serotipos. Estas son liberadas de la célula por mecanismos desconocidos.

### **1.7.9. Epidemiología**

Las infecciones por AdH están muy extendidas a escala mundial. Entre 1967 y 1976 el 13% de los 135.702 aislados víricos asociados a enfermedades respiratorias en todo el mundo se identificaron como adenovirus (Schmitz y col., 1983), ocupando el segundo lugar después del virus de la gripe que representó un 28% de los casos descritos.

Aproximadamente el 60% de las infecciones por AdH se producen en niños menores de 4 años (Figura 1.5.). El 47-55% de las infecciones son asintomáticas. Estudios seroepidemiológicos sugieren que la incidencia real de las infecciones por AdH podría ser el doble que las estimaciones hechas a partir de los aislados víricos (Sharp y Wadell, 1995).



**Figura 1.5.**  
Distribución por edades de las infecciones por AdH (Sharp y Wadell, 1995).

La transmisión de los AdH puede ocurrir en forma de casos esporádicos o en brotes epidémicos. La vía de transmisión depende en gran medida del serotipo y de la enfermedad asociada, pudiendo transmitirse a través de secreciones orgánicas, transmisión aérea (p.e. aerosoles generados por tos o estornudos), transmisión hídrica (p.e. brotes de conjuntivitis asociados a piscinas), transmisión fecal-oral (Hunter, 1997).

El subgénero A representa el 0,5% de los aislados, la mayoría a partir de niños de 0-11 meses de vida con enfermedad gastrointestinal. El 91% se han recuperado a partir de las heces (Schmitz y col., 1983, Sharp y Wadell, 1995).

Los miembros del subgénero B1 se han asociado a enfermedades respiratorias. Ad3 y Ad7 representan el 13% y el 19,7% de los aislados reportados a la Organización Mundial de la Salud respectivamente. Ambos serotipos aparecen en brotes epidémicos a intervalos de 4-5 años, en niños menores de 4 años.

Los serotipos pertenecientes al subgénero B2 representan el 1% de los aislados. Producen infecciones persistentes del riñón y del tracto urinario, pudiéndose excretar a través de la orina durante periodos de seis meses de forma asintomática (Sharp y Wadell, 1995).

Los aislados del subgénero C (Ad1, Ad2, Ad5, Ad6) representan el 50% de las cepas aisladas reportadas a la Organización Mundial de la Salud. Producen brotes epidémicos en niños menores de 4 años. Las infecciones pueden ser persistentes, pudiéndose multiplicar en las amígdalas y excretarse en las heces durante años. En ocasiones las infecciones pueden perpetuarse dentro de familias enteras (Sharp y Wadell, 1995).

El subgénero D (23 serotipos) representa el 4,1% de los casos documentados, siendo más comunes las infecciones en Asia y Africa, dónde producen infecciones oculares y del tracto digestivo.

El subgénero E (Ad4) representa el 2,4% de los aislados reportados a la Organización Mundial de la Salud. La mayoría de los casos descritos se producen en adultos, en los que produce infecciones oculares y respiratorias.

El subgénero F comprende a Ad40 y Ad41, llamados adenovirus entéricos. Se excretan en gran cantidad a través de las heces de niños infectados ( $10^{11}$  partículas víricas/g heces). A diferencia de los rotavirus, no existe estacionalidad pudiendo producir infecciones en niños durante todo el año.

## **1.8. GÉNERO ENTEROVIRUS**

### **1.8.1. Características biológicas**

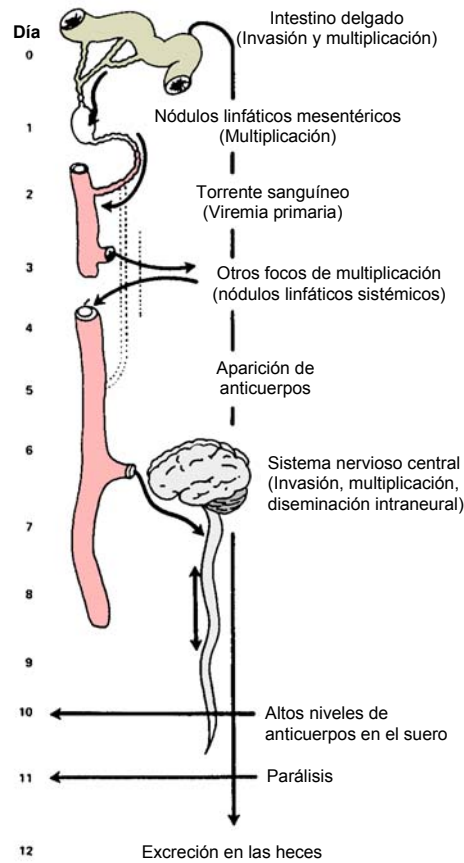
Los Enterovirus fueron reconocidos como grupo en 1957 (Committee on the Enteroviruses, 1957), englobando a Poliovirus, Coxsackievirus y Echovirus, cuyo hábitat natural era el intestino humano. Se definen como un grupo de virus pequeños, con una cápside de simetría icosaédrica, no envueltos, con un diámetro que oscila entre 27 y 30 nm. El genoma está formado por una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva poliadenilada. Los viriones son resistentes en medio ácido (pH 3-5 durante 1-3 h), lo que hace posible su supervivencia en el tubo digestivo. Su estabilidad frente a diferentes agentes se describe en la Tabla 1.6.

**TABLA 1.6.**  
**Estabilidad de los enterovirus frente a diferentes agentes**

| <b>Resistente</b>       | <b>Sensible</b>                  |
|-------------------------|----------------------------------|
| ✓ antibióticos          | ✓ 0,3% formaldehído              |
| ✓ desinfectantes        | ✓ 0,1 N HCl                      |
| ✓ disolventes orgánicos | ✓ 0,3-0,5 ppm cloro residual     |
| ✓ temperatura baja      | ✓ 2-a-hidroxibencil-bencimidazol |
|                         | ✓ guanidina                      |
|                         | ✓ temperatura alta               |
|                         | ✓ ultravioleta                   |
|                         | ✓ desecación                     |
|                         | ✓ colorantes vitales             |

Los enterovirus son excretados abundantemente y regularmente a través de las heces (hasta  $10^{10}$  partículas por gramo de material fecal), y su presencia en las aguas contaminadas puede proporcionar mucha información sobre la circulación de los diferentes serotipos de estos virus en la comunidad. Diversos estudios han demostrado la distribución estacional de los enterovirus en las aguas contaminadas y su persistencia durante períodos de tiempo prolongados (Melnick, 1984). Además, su resistencia a procesos de tratamiento de aguas hacen que puedan encontrarse en el efluente en concentraciones similares a las iniciales.

La vía de entrada al organismo varía según el virus y según la patología producida. La infección puede producirse por vía fecal-oral, respiratoria-oral, a través de secreciones oculares y respiratorias, o a través de lesiones en la piel. El mecanismo de replicación en las células diana es el típico de los virus con genoma de ARN de polaridad positiva: unión al receptor celular y entrada en la célula huésped, liberación del ARN genómico, síntesis de proteínas, replicación del genoma y encapsidación.



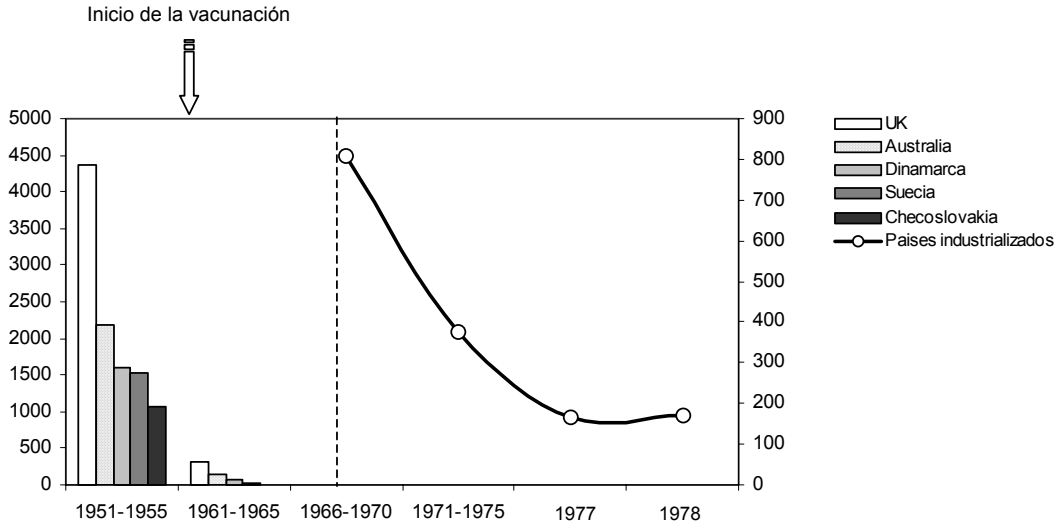
**Figura 1.6.** Patogénesis de la poliomielitis. Modificado de Melnick, 1997.

En el caso de poliovirus la vía de entrada es el tracto alimentario. El virus se multiplica localmente en las amígdalas, placas de Peyer, intestino delgado y los nódulos linfáticos que drenan esos tejidos, lo que conduce a la aparición de virus en la garganta durante 1-2 semanas tras la infección, y en las heces durante varias semanas. A partir de estos órganos se produce la diseminación del virus hacia el torrente sanguíneo, proliferando en los nódulos linfáticos sistémicos. La invasión del sistema nervioso central (SNC) se produce a través de la sangre o a través de los axones de las fibras nerviosas periféricas. Una vez en el SNC, el virus se propaga a través de la médula espinal y hasta el cerebro, pudiendo llegar a multiplicarse activamente, lo que conduce a la destrucción de neuronas motoras y a parálisis (Figura 1.6.).

### **1.8.2. Epidemiología**

Los enterovirus son ubicuos en las zonas tropicales y subtropicales. En zonas cálidas donde prevalecen unas condiciones higiénico-sanitarias deficientes, el grado de infección en niños puede superar el 50% (Melnick, 1984), apareciendo durante todo el año. En áreas de clima templado suelen encontrarse a finales del verano y principios del otoño. Los niños son los primeros individuos diana y actúan como vehículo de dispersión de la infección. Esta suele producirse fácilmente en el ámbito familiar o en comunidades cerradas, donde el grado de infección puede superar el 80%. Al mejorar las condiciones sanitarias en una comunidad se limita la dispersión de los enterovirus aumentando así la población no inmunizada durante la niñez, que constituyen un grupo susceptible de infección durante la edad adulta.

La estrategia adoptada por la Organización Mundial de la Salud para la erradicación de la poliomielitis se basa en la inmunización masiva (Dowdle y Birmingham, 1997; Minor, 2000). Los patrones epidemiológicos de la poliomielitis se han alterado en la mayor parte del mundo a raíz del inicio de la vacunación a partir de 1955 (Figura 1.7.) consiguiendo eliminar los casos producidos por cepas salvajes en muchos países, incluyendo el continente americano (Robbins y de Quadros, 1997).

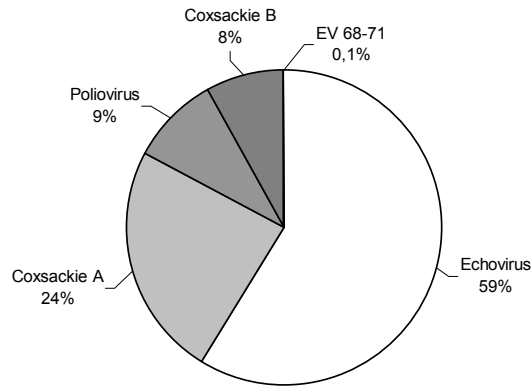


**Figura 1.7.** Reducción en el número de casos de poliomielitis anuales a partir de la administración de vacunas (Melnick, 1997).

A pesar de estas medidas, la poliomielitis sigue siendo endémica en algunas partes del mundo, dónde ocurren miles de casos anualmente. Los marcadores epidemiológicos de la enfermedad producida por enterovirus se basan en la aparición de síntomas clínicos asociables con patologías típicas causadas por estos virus. La información sobre la abundancia relativa de los diferentes serotipos de enterovirus que circulan en la población se basa en el aislamiento e identificación de los virus a partir de especímenes clínicos (Hovi y col., 1996; Grabow y col., 1999). Sin embargo, en muchas ocasiones las infecciones son subclínicas o están producidas por cepas no citopatogénicas. Como marcadores de la presencia de infecciones en la población deberían incluirse, además, la prevalencia de virus en las heces de personas sanas y en las aguas residuales de la zona.

Se han descrito una gran diversidad de serotipos que pueden circular al mismo tiempo entre la población de un área determinada (Figura 1.8.), y variaciones anuales y estacionales en la abundancia relativa de los diferentes serotipos (Hovi y col., 1996), pudiendo aparecer de forma cíclica.





**Figura 1.8.**  
Identificación de los casos producidos por enterovirus durante 1970-1979 en Estados Unidos (Moore y col., 1982)

### 1.8.3. Clasificación

Se han reconocido 66 serotipos diferentes de Enterovirus que se han clasificado en 5 subgrupos basándose en la patogenidad en animales de experimentación (Tabla 1.7.).

**TABLA 1.7.**  
**Clasificación de los enterovirus humanos y enfermedades asociadas<sup>a</sup>**

| Subgrupo         | Serotipo                 | Enfermedad asociada   |
|------------------|--------------------------|---|
| Poliovirus       | 1-3                      | Meningitis, encefalitis, poliomielitis  |
| Coxsackievirus A | 1-22 y 24                | Meningitis, encefalitis, parálisis, fiebre aftosa, herpangina, pleuritis, estomatitis ulcerosa, catarro, faringitis, hepatitis, conjuntivitis, linfadenopatias, esplenomegalia  |
| Coxsackievirus B | 1-6                      | Meningitis, encefalitis, parálisis, catarro, mialgia, pericarditis, miocarditis, pleuritis, gastroenteritis, hepatitis, conjuntivitis, orquitis, linfadenopatía, esplenomegalia |
| Echovirus        | 1-9, 11-21, 24-27, 29-34 | Meningitis, encefalitis, parálisis, pleuritis, gastroenteritis, conjuntivitis   |
| Enterovirus      | 68-71                    | Meningitis, encefalitis, parálisis, conjuntivitis, fiebre aftosa, neumonía, faringitis, bronquiolitis   |

<sup>a</sup> Hunter, 1997.

### 1.8.4. Poliovirus

La poliomielitis es una enfermedad infecciosa aguda que puede afectar seriamente al sistema nervioso central, provocando la destrucción de las neuronas motoras de la médula espinal que da lugar a parálisis flácida. Las primeras descripciones de esta enfermedad se han encontrado en textos de la antigüedad, pero no fue reconocida su importancia hasta finales del siglo XVIII y principios del XIX, después de un incremento en las epidemias en Europa y Norte América.

Los tres serotipos de poliovirus comparten algunos determinantes antigénicos, y existen diferencias antigénicas entre cepas del mismo serotipo. Los epítomos responsables de la inducción de la respuesta inmune están localizados en las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3.

El rango de huéspedes incluye al hombre y a algunos primates no humanos. La mayoría de las cepas infectan y causan parálisis en monos infectados por inoculación directa en el sistema nervioso o por vía oral.

En los años 50 se desarrollaron dos tipos de vacunas con la finalidad de minimizar la incidencia de las infecciones provocadas por los tres tipos de poliovirus:

- ⇒ Vacuna de virus inactivados (IPV) desarrollada por J.E. Salk, obtenida a partir de los tres serotipos de poliovirus multiplicados sobre líneas celulares inactivados con formol. Se utilizan extensivamente en algunos países europeos (Finlandia, Suecia, Holanda, Francia). Inducen buenos niveles de respuesta humoral tras la administración de la dosis apropiada, pero se requiere dosis de recuerdo para mantener niveles adecuados de anticuerpos. Al estar inactivados no existe la posibilidad de mutar o revertir hacia cepas virulentas, ni producir enfermedad en individuos inmunodeprimidos.
- ⇒ Vacuna de virus vivos atenuados (OPV) desarrollada por A.B. Sabin, se administra por vía oral y confiere inmunidad humoral e intestinal de larga duración. Los virus se multiplican en el intestino y se excretan en grandes cantidades a través de las heces. La multiplicación de los virus vacunales en las células intestinales impediría la proliferación de cepas salvajes. Al contener virus vivos existe la posibilidad de que aparezcan mutaciones que les devuelvan características virulentas, como fue el caso de la epidemia de poliomielitis tipo 3 ocurrida en Polonia en 1968 con 464 casos (Martín y col., 2000).

### 1.8.5. Coxsackievirus

El primer coxsackievirus fue aislado en 1948 en Nueva York a partir de las heces de individuos con poliomielitis parálitica (Dalldorf y Sickles, 1948). Basándose en la histopatología producida en ratones lactantes se han clasificado en dos subgrupos antigénicamente no relacionados: coxsackievirus A (CA) con 23 serotipos (1-22 y 24), y coxsackievirus B (CB) con 6 serotipos. Las mutaciones puntuales y los fenómenos de recombinación son responsables de la diversidad genética y la variabilidad antigénica, al igual que en otros virus con genoma de ARN (Santti y col., 1999; Halim y Ramsingh, 2000).

Los coxsackievirus están distribuidos por todo el mundo, siendo cada serotipo específico de cada área geográfica. En zonas de clima templado circulan durante el verano y otoño. En zonas tropicales aparece durante todo el año de forma endémica.

El reservorio natural son los niños, en los que a menudo produce infecciones asintomáticas, pudiendo excretarse en las heces durante semanas. La transmisión se produce principalmente por vía fecal-oral, o a través de aerosoles cuando aparecen síntomas pulmonares, durante brotes de conjuntivitis. La multiplicación tiene lugar en la garganta, intestino delgado y nódulos linfáticos.

Pueden crecer en líneas celulares derivadas de primates (del hombre o de monos), a excepción de algunos CA (serotipos 1–6). Producen efecto citopático visible con aglobamiento celular y aspecto dendrítico, completándose el ciclo celular en 7-8 h. La mayoría de las infecciones en el hombre son asintomáticas, pero puede llegar a producir un amplio espectro de manifestaciones clínicas en el hombre y en animales (Tabla 1.7.), que pueden afectar al sistema nervioso, piel y mucosas, músculo estriado, corazón, tracto gastrointestinal, páncreas (asociado por datos epidemiológicos con la diabetes tipo I insulino-dependiente), tracto respiratorio y ojos.

### 1.8.6. Echovirus

Los Echovirus (*enteric cytopathogenic human orphan virus*) fueron definidos en 1955 como un grupo de virus no patogénicos para ratones (Committee on ECHO Viruses, 1955).

Se ha identificado 31 tipos: tipos 1–9, 11–27 y 29–33. Los tipos 22 y 23 han demostrado diferencias biológicas en cuanto a la estrategia de replicación y diferente epidemiología (Stanway y col., 1994). Estudios moleculares recientes han demostrado que la

secuencia de nucleótidos y aminoácidos difiere de la de los demás echovirus (Hyypiä y col., 1992; Stanway y col., 1994), habiéndose clasificado en el nuevo género Parechovirus (Stanway y Hyypiä, 1999).

En ensayos sobre líneas celulares producen efecto citopático sobre una gama de células de origen humano y de otros primates, a excepción de los tipos 22 y 23. Se han descrito mutaciones y fenómenos de recombinación que pueden alterar la patogenicidad y la especificidad de huésped, y que tienen una función importante en la evolución de estos virus (Santti y col., 1999).

Los echovirus tienen una distribución mundial. En áreas de clima templado pueden aislarse durante los meses de verano y principios del otoño, pudiendo producirse epidemias cíclicas. En las regiones tropicales y subtropicales circula de forma endémica, dando lugar a brotes asociados con la estación de lluvias. Entre 1975 y 1983 la prevalencia de las infecciones por echovirus fue de un 64%, de un total de 60.000 infecciones por enterovirus no producidas por poliovirus (Kopecka, 1999). La transmisión se produce por vía fecal-oral, multiplicándose primeramente en la orofaringe, pasando al estómago y implantándose en el tracto intestinal. La excreción de virus puede persistir durante meses, y en casos de infección persistente puede excretarse durante años.

Las mayoría de las infecciones son asintomáticas, pero puede llegar a producir un amplio espectro de manifestaciones clínicas que se resumen en la Tabla 1.7.

## **1.9. GÉNERO HEPATOVIRUS**

### **1.9.1. Antecedentes históricos**

La hepatitis viral es una enfermedad conocida desde la antigüedad. Las primeras descripciones de epidemias de ictericia se encuentran en la literatura china y en los trabajos de Hipócrates, que datan del siglo V a. de C. La naturaleza infecciosa de la enfermedad también se reconoció en el siglo VIII cuando el Papa Zacarías aludía el carácter aparentemente transmisible de la ictericia y la necesidad de mantener apartados a los enfermos.

Durante los siglos XVII y XVIII fueron frecuentes las epidemias en Europa entre la población civil y militar. En el siglo XIX se especuló con que la posible causa de la ictericia era la obstrucción biliar con un tapón de moco, por lo que se llamó “ictericia catarral”. A

principios del siglo XX algunos científicos empezaron a sospechar que el agente infeccioso responsable de la enfermedad podría ser un virus. Durante esta época aparecieron evidencias de una segunda forma de hepatitis transmitida aparentemente a través del suero humano: la “hepatitis sérica”. El agente etiológico se denominó virus de la hepatitis B (VHB). Ésta enfermedad era claramente diferente de la hepatitis infecciosa, llamada hepatitis A, y su agente etiológico se denominó virus de la hepatitis A (VHA) (Melnick, 1995; Sánchez-Tápias, 1995; Hollinger y Ticehurst, 1990). Las dos enfermedades se diferenciaban claramente en el período de incubación (2-4 semanas en la hepatitis A *versus* 1-3 meses en la hepatitis B) y en la vía de transmisión (fecal-oral en la hepatitis A *versus* transmisión parenteral/sexual en la hepatitis B) (Hunter, 1997).

El virus responsable de la hepatitis A se consiguió propagar en primates no humanos en 1967. Estos estudios proporcionaron los primeros datos sobre las alteraciones que la infección producía en el hígado (Deinhardt y col., 1967).

En 1973 se consiguió visualizar por microscopía inmunoeléctrica partículas víricas de 27 nm a partir de heces pacientes, que reaccionaban con un anticuerpo específico procedente de suero de un persona convaleciente (Feinstone y col., 1973). Esta partícula se identificó como el virus de la hepatitis A. Numerosos intentos para cultivar el virus sobre líneas celulares fracasaron. Únicamente los modelos animales permitían obtener virus purificados para poder iniciar estudios genéticos y realizar pruebas de estabilidad frente a diferentes agentes físico-químicos. Al mismo tiempo se comenzaron a desarrollar ensayos que permitían diagnosticar la enfermedad y que hicieron posible iniciar estudios seroepidemiológicos.

En 1979 se consiguió la multiplicación *in vitro* del VHA sobre células derivadas de hígado o de riñón de mono (Provost y Hilleman, 1979). En los últimos 20 años se ha avanzado de forma espectacular en el conocimiento de la hepatitis A y su agente etiológico. Se ha conseguido clonar y secuenciar el genoma del VHA (Ticehurst y col., 1983; Linemeyer y col., 1985; Cohen y col., 1987b; Paul y col., 1987; Lemon y col., 1987; Lemon y col., 1992), se ha estudiado su estructura antigénica (Lemon y col., 1991), el mecanismo de replicación viral (Agnès y col., 1994; Bishop y Anderson, 1997a y b), las mutaciones que permiten la adaptación al cultivo *in vitro* (Cohen y col., 1987a; Emerson y col., 1993; Graff y col., 1994; Zhang y col., 1995), y se han realizado estudios epidemiológicos (Jansen y col., 1990; Papaevangelou, 1992; Robertson y col., 1991 y 1992; Melnick, 1995). La posibilidad de obtener grandes cantidades de virus sobre líneas celulares ha permitido la elaboración de

vacunas basadas en virus inactivados y se ha evaluado su utilización para prevenir la enfermedad (Koff, 1998; Rosenthal, 1998; World Health Organization, 2000).

### 1.9.2. Clasificación

Basándose en sus propiedades biofísicas, el virus de la hepatitis A se clasificó inicialmente dentro de la familia *Picornaviridae* como miembro del género *Enterovirus* con el nombre de enterovirus tipo 72. Sin embargo, existen características que lo diferencian de los demás picornavirus:

- ⇒ La secuencia de nucleótidos y aminoácidos presentan baja homología respecto a los demás picornavirus.
- ⇒ Difícil de cultivar sobre líneas celulares, y si se consigue, la replicación es lenta y no producen efecto citopático.
- ⇒ Resistente a la temperatura, pH ácidos y drogas que inactivan a muchos picornavirus.
- ⇒ Existe un único serotipo con un sitio antigénico inmunodominante.
- ⇒ Anticuerpos monoclonales específicos de otros enterovirus no reaccionan frente a las partículas del VHA.

Según estos datos el VHA se ha clasificado en un grupo aparte dentro de los picornavirus, como único miembro del género *Hepatovirus*. Sus principales características se resumen en la Tabla 1.8

**TABLA 1.8.**  
**Características del virus de la hepatitis A**

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| <b>Familia</b>                       | <i>Picornaviridae</i>                                  |
| <b>Genero</b>                        | <i>Hepatitisvirus</i>                                  |
| <b>Serotipos</b>                     | Uno  |
| <b>Genotipos</b>                     | Cuatro de origen humano<br>Tres de primates no humanos |
| <b>Ácido nucleico</b>                | ARN de cadena sencilla lineal de polaridad positiva    |
| <b>Tamaño del genoma</b>             | 7,48 Kb  |
| <b>Pautas de lectura abierta</b>     | Una de 6,7 Kb  |
| <b>Tamaño de la partícula</b>        | 27-28 nm, icosaédrica                                  |
| <b>Envuelta</b>                      | Ninguna  |
| <b>Densidad de flotación</b>         | 1,33-1,34 g/cm <sup>3</sup> en cloruro de cesio        |
| <b>Coefficiente de sedimentación</b> | 156-160 S  |
| <b>Vía de transmisión</b>            | Fecal-oral   |
| <b>Células diana</b>                 | Hepatocitos  |
| <b>Replicación</b>                   | Citoplasma de los hepatocitos                          |
| <b>Proteínas estructurales</b>       | VP1, VP2, VP3, VP4                                     |
| <b>Proteínas no estructurales</b>    | 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, VPg                            |

### 1.9.3. Propiedades físico-químicas y estabilidad del virión

Los viriones son partículas de 27-32 nm de diámetro con simetría icosaédrica, sin envuelta y sin estructuras superficiales (Feinstone y col., 1973). Morfológicamente no se diferencia de los demás picornavirus. Las partículas presentan una densidad de flotación de 1,32-1,34 g/cm<sup>3</sup> en cloruro de cesio, y un coeficiente de sedimentación de 156-160 S en soluciones neutras de sacarosa. A partir de suspensiones fecales o en cultivos infectados se han podido detectar partículas no infecciosas que podrían corresponder a proviriones inmaduros con o sin ARN (Nüesch y col., 1989; Bishop y Anderson, 1997a; Polish y col., 1999).

La capacidad de resistencia del VHA frente a diferentes agentes químicos y en condiciones ambientales se describen en la Tabla 1.9.

**TABLA 1.9.**  
**Resistencia del VHA frente a diferentes agentes<sup>a</sup>**

| Agente                  | Condiciones   | Estabilidad                   |  |
|-------------------------|---|-------------------------------|--|
| Estabilidad al calor    | a 4°C   | durante semanas-meses         | estable                                |
|                         | de -20 a -70°C  | durante años                  | estable                                |
|                         | a 50°C  | durante 1 h                   | estable                                |
|                         | a 60°C  | durante 1 h                   | predominantemente estable              |
|                         | a 60°C  | durante 10 h                  | predominantemente inactivado           |
|                         | a 98-100°C<br>autoclavado   | durante 5 min<br>121°C 20 min | completamente inactivado<br>inactivado |
| Resistencia al pH       | a pH 3  | durante 3 h a 25°C            | estable                                |
| Solventes               | eter, cloroformo, freon,<br>triclorotrifluoroetano                                  |                               | resistente                             |
| Cloro                   | 10-15 ppm cloro   | durante 30 min                | inactivado                             |
|                         | 3-10 mg/l hipoclorito sódico  | durante 5-15 min              | inactivado                             |
| Otros agentes           | 1 g/l cloramina-T   | 15 min a 20°C                 | estable                                |
|                         | 300 mg/l ácido percloroacético  | 15 min a 20°C                 | estable                                |
|                         | 3% formalina  | 5 min 25°C                    | inactivado                             |
|                         | 0,03% β-propiolactona   | 72 h a 4°C                    | inactivado                             |
|                         | 30 mg/l permanganato potásico   | 5 min                         | inactivado                             |
|                         | 3 mg/l yodo   | 5 min                         | inactivado                             |
| radiación ultravioleta  | 197 μW/cm <sup>2</sup> 4 min  | Inactivado                    |  |
| Condiciones ambientales | Aguas naturales y residuales,<br>suelos, sedimentos marinos,<br>bivalvos, alimentos | durante días-meses            | mayor estabilidad que poliovirus       |
|                         | Desecación  | a < -20°C durante años        | estable                                |
|                         | Superficies   | durante días-meses            | estable                                |

<sup>a</sup> Peterson y col., 1983; Sobsey y col., 1988; Hollinger y Ticehurst, 1990

#### 1.9.4. Organización genómica

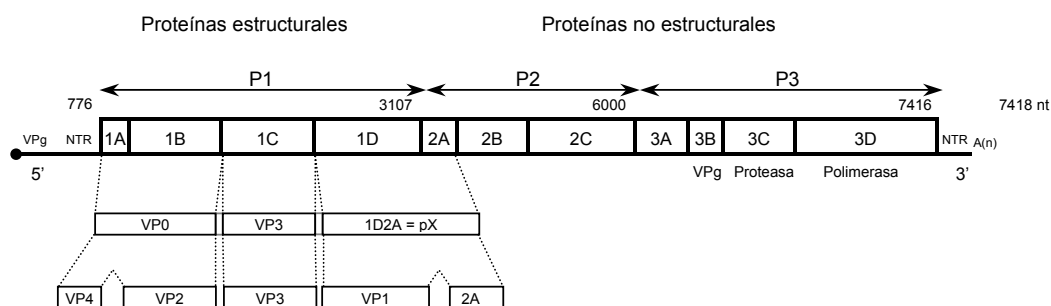
El genoma esta constituido por una molécula de ARN monocatenario lineal de 7,48 Kb, de polaridad positiva. El extremo 5' está unido covalentemente a una proteína VPg, y el extremo 3' es poliadenilado. Se diferencian tres regiones (Figura 1.9.):

- i) Región no codificante del extremo 5', que comprende aproximadamente el 10% del genoma. Es la región más conservada del genoma, con más de un 92% de identidad entre las diferentes cepas (Beard y Lemon, 1999). Contiene el punto de unión al ribosoma (IRES).
- ii) Un único ORF que codifica las proteínas víricas: en la región P1 las proteínas de la cápside, y en la región P2 y P3 las proteínas no estructurales. El ARN genómico



codifica una poliproteína de 2227 aa (253 kDa) que es procesada para dar lugar a las proteínas de la cápside (VP4, VP3, VP2 y VP1), y a las proteínas no estructurales (2A, 2B, 2C; 3A, 3B = VPg, 3C = proteasa, 3D = ARN polimerasa).

- iii) Región no codificante del extremo 3', altamente estructurada y notablemente variable entre diferentes cepas (hasta un 20%).



**Figura 1.9.** Organización del genoma del virus de la hepatitis A y procesamiento de las proteínas estructurales.

### 1.9.5. Heterogeneidad genética

Los primeros estudios indicaron que la secuencia de nucleótidos del VHA estaba muy conservada entre cepas aisladas de diferentes áreas geográficas. Sin embargo, la comparación de la secuencia de nucleótidos de la región VP1/2A de aislados de origen humano y animal ha conducido a la identificación de más de un centenar de cepas que se han clasificado en siete genotipos (I-VII), que difieren en un 15-25%, y en subgenotipos que se diferencian en un 7,5% (Robertson y col., 1992). La mayoría de las cepas de origen humano se engloban en los genotipos I y III (Tabla 1.10.), distribuidos por todo el mundo. Los genotipos II y VII están representados por dos únicas cepas también de origen humano. Tres cepas identificadas como genotipos IV, V y VI sólo se han encontrado en primates no humanos. Dentro de esta región del genoma, las cepas del mismo genotipo difieren en menos de un 3% incluso aquellas aisladas con años de diferencia, lo que sugiere una tasa de mutación muy baja (Esteban y col., 1999).

**TABLA 1.10.**  
**Distribución en genotipos de las cepas del VHA<sup>a</sup>**

| Genotipo | Cepas   | Lugar de origen                                     | Año de aislamiento |
|----------|---------|---|--------------------|
| IA       | GBM     | Alemania  | 1976               |
|          | MS-1    | Willowbrook, N.Y., USA                              | 1964               |
|          | LA      | Los Angeles, Ca., USA                               | 1975               |
|          | HAS-15  | Phoenix, Ariz., USA                                 | 1979               |
|          | SD-11   | San Diego, Ca., USA                                 | 1974               |
|          | CR326   | Costa Rica  | 1960               |
|          | Arg90   | Argentina   | 1990               |
|          | RDJ     | Brasilia, Brasil                                    | 1980               |
|          | CP      | Reino Unido   | 1979               |
|          | RM238   | Checoslovaquia                                      | 1982               |
|          | Carina  | Italia  | 1986               |
|          | 2424    | Lituania  | 1985               |
|          | China81 | Shanghai, China                                     | 1981               |
|          | KRM031  | Saga, Japón   | 1977               |
|          | SR082   | Bangkok, Tailandia                                  | 1987               |
| IB       | HM-175  | Australia   | 1976               |
|          | MBB     | Norte de Africa                                     | 1978               |
|          | Ag11    | Atenas, Grecia                                      | 1983               |
|          | Jor88   | Aman, Jordania                                      | 1988               |
|          | TKM005  | Iraq y Japón  | 1981               |
|          | H153    | Tunicia y Suecia                                    | 1981               |
| II       | CF-53   | Clermont-Ferrand, Francia                           | 1979               |
| IIIA     | GA76    | Georgia, USA  | 1976               |
|          | H-122   | Malmo, Suecia                                       | 1979               |
|          | SMA292  | Senang, Malasia                                     | 1986               |
|          | TK023   | Kathmandu, Nepal                                    | 1989               |
|          | India90 | India   | 1990               |
|          | PA21    | Panamá ( <i>Aotus trivirgatus</i> )                 | 1980               |
| IIIB     | KPH     | Copenhague, Dinamarca                               | 1979               |
|          | KRM016  | Saga, Japón   | 1977               |
|          | A-162   | Aichi, Japón  | 1990               |
| IV       | Cy145   | Filipinas y USA<br>( <i>Macaca fascicularis</i> )   | 1988               |
| V        | AGM-27  | Kenia y Rusia<br>( <i>Cercopithecus aethiops</i> )  | 1985               |
| VI       | JM55    | Indonesia y Rusia<br>( <i>Macaca fascicularis</i> ) | 1985               |
| VII      | SLF88   | Sierra Leona  | 1988               |

<sup>a</sup> Robertson y col., 1992. En los genotipos I, II y III se indican sólo algunas de las cepas.

A pesar de la existencia de diferentes genotipos, existe únicamente un serotipo del VHA causante de infección en humanos, y no se han descrito diferencias en el curso clínico de la enfermedad producida por las diferentes cepas.

Se han podido seleccionar cepas adaptadas al cultivo celular sobre diferentes líneas, cepas atenuadas y variantes sensibles a la temperatura que presentan mutaciones puntuales distribuidas a lo largo de todo el genoma (Emerson y col., 1993; Funkhouser y col., 1994; Zhang y col., 1995; Funkhouser y col., 1996). La región 5'NTR, aunque es la zona más conservada entre las diferentes cepas, contiene el 29% de las mutaciones que diferencian cepas atenuadas de cepas salvajes (Cohen y col., 1987a).

### **1.9.6. Patogénesis y patología**

La principal vía de transmisión es el contacto fecal-oral y el reservorio de la infección lo constituyen únicamente personas con infección aguda que eliminan el virus en las heces durante el período de incubación, hasta aproximadamente 15 días después de la aparición de la sintomatología.

La infección por el VHA ofrece un cuadro clínico variado, desde la infección subclínica a hepatitis clínico con o sin ictericia, hasta enfermedad fulminante, coma y muerte. Los niños suelen presentar infecciones subclínicas. La frecuencia y gravedad de los síntomas aumenta con la edad, siendo los pacientes adultos más viejos los más propensos a desarrollar complicaciones graves. En general es una infección autolimitada y habitualmente de pronóstico benigno, no suele evolucionar hacia la cronicidad aunque se han descrito casos de hepatitis A recidivante, y en solo una pequeña proporción de episodios se manifiesta de forma fulminante con un deterioro rápido de la función hepática que conduce a un desenlace fatal.

La duración de la enfermedad también varía, pero la mayoría de los pacientes tiende a recuperarse a partir de la tercera semana. Se diferencian cuatro fases (Figura 1.10.):

- i) *Periodo de incubación*, entre 15-50 días, que se inicia en el momento de la exposición al virus y se prolonga hasta el momento de la aparición de los primeros síntomas (orina oscura y evidencias bioquímicas).
- ii) *Fase prodrómica*, de 2 a 10 días, en la que aparecen todos los síntomas clínicos que preceden a la fase aguda: fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal, fatiga, vómitos, malestar, etc.

- iii) *Fase aguda*, de aproximadamente 3 semanas. En la mayoría de los pacientes se desarrolla ictericia durante las dos primeras semanas. El hígado se agranda y el daño hepático se hace evidente por los niveles séricos elevados de transaminasas hepáticas y bilirrubina.
- iv) *Fase de convalecencia*. Se produce la normalización paulatina de los parámetros alterados, que conduce a la recuperación del enfermo. Suele tener una duración de unas cuatro semanas.

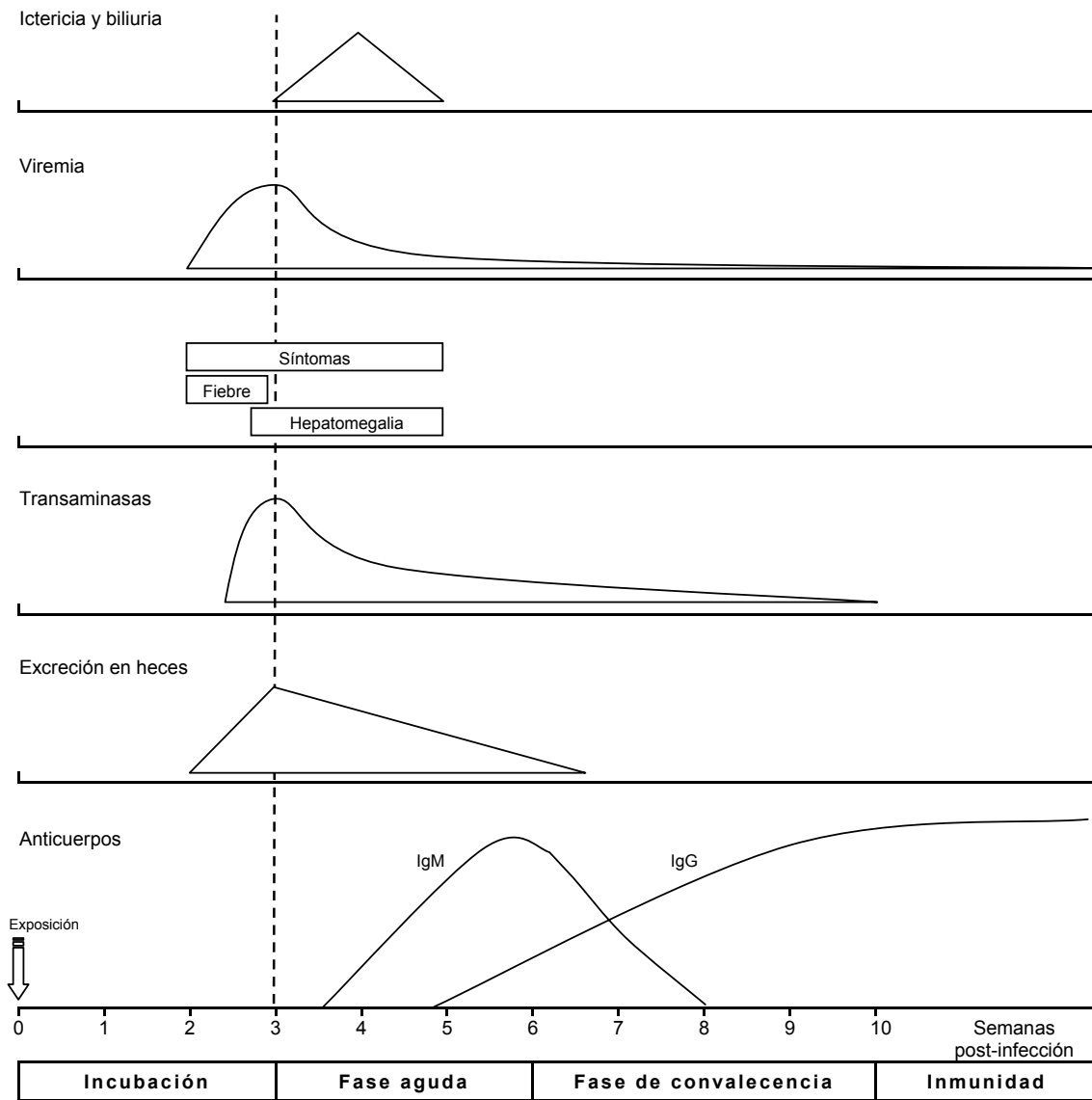


Figura 1.10. Evolución de la enfermedad producida por el VHA.

### **1.9.6.1. Complicaciones de la infección por el VHA**

La hepatitis colestática es una complicación poco común que se caracteriza por una ictericia severa que puede persistir durante meses. La aparición de fiebre, prurito, pérdida de peso son algunos de los signos de esta variedad, junto con la presencia de niveles elevados de bilirrubina y fosfatasa alcalina en el suero, orina y heces oscuras, y cambios en los parámetros sanguíneos (Koff, 1998).

La hepatitis A recidivante es un fenómeno también poco frecuente, pero se han descrito casos de infección por VHA de larga duración, caracterizadas por un patrón polifásico en los niveles de enzimas hepáticas y la presencia de viremia durante un periodo prolongado (Raimondo y col., 1986; Inoue y col., 1996; Yotsuyanagi y col., 1996; Fujiwara y col., 1997; Koff, 1998).

La hepatitis A fulminante se ha descrito en un 0,14-0,35% de los casos (Debray y col., 1997). Este proceso incluye la presencia de niveles séricos de bilirrubina elevados, fiebre, letargia, encefalopatía, necrosis hepática y fallo de múltiples órganos que puede conducir a la muerte en un 70-95% de los pacientes (Koff, 1998).

### **1.9.7. Rango de huéspedes y propagación vírica**

Solo el hombre y varias especies de primates (*Pan troglodites*, *Aotus trivirgatus*, *Saquinus mystax*, *S. labiatus*) son susceptibles a la infección por el VHA. La enfermedad en primates no humanos es más leve que en el hombre. Varias especies de macacos pueden ser también infectados con el VHA pero en general son menos susceptibles.

En animales infectados se ha demostrado que el virus se replica en los hepatocitos, observándose por microscopía electrónica la formación de vesículas citoplasmáticas que contienen partículas víricas. En dichos animales también se ha observado en las células de Kupffer, bazo, nódulos linfáticos abdominales y células glomerulares del intestino (Schulman y col., 1976).

El aislamiento de cepas salvajes del VHA sobre líneas celulares es difícil y tedioso. Las cepas salvajes replican de forma lenta, producen poco efecto citopático o este no es discernible, y tienden a establecer infecciones persistentes (Siegl y col., 1993). Solamente se ha conseguido la propagación del virus sobre células de primate: células primarias de riñón de mono verde africano (AGMK) y derivadas (BS-C-1, Vero, BGMK), células fetales de riñón

de mono rhesus (FRhK4, FRhK6, Frp/3), y células de hepatoma humano (PLC/PRF/5). En cepas bien adaptadas al cultivo celular puede tardar semanas para alcanzar títulos máximos de  $10^9$  TCID<sub>50</sub> por ml de lisado.

El mecanismo de replicación vírica es similar al de otros picornavirus. El virus se une a células en cultivo por un mecanismo dependiente de calcio (Bishop y col., 1997b). Recientemente se ha identificado una glicoproteína de la superficie celular como posible receptor (Kaplan y col., 1996).

La replicación del genoma implica la formación de una molécula de ARN intermediaria de polaridad negativa, presente en muy baja cantidad en las células infectadas (0,02% del ARN vírico total) (Cohen, 1989; Agnès y col., 1994; Anderson y col., 1988). Este ARN(-) sirve de molde para la síntesis del ARN(+). La replicación del ARN vírico se produce durante varios días, después se reduce la síntesis de ARN y se establece una infección persistente. El ARN de polaridad positiva es encapsidado rápidamente, quedando así reducida la cantidad de ARN disponible para servir de molde en la replicación.

La traducción se inicia bajo el control del IRES localizado en la región 5' no codificante. Este es poco eficiente en comparación con otros picornavirus, lo que contribuye a la replicación lenta y no citolítica del virus. El IRES interacciona con factores celulares que inician la traducción dependiente de *cap*. Los codones de iniciación son dos (nucleótidos 735-737 y 741-743), iniciándose la traducción de la poliproteína a partir del segundo (Baroudy y col., 1985).

Diversos agentes que inhiben el crecimiento de poliovirus y otros picornavirus no afectan al VHA, incluyendo arildona, disoxaril, 3'-metilquercetina, 2,4-dicloropirimidina, guanidina, y 2-( $\alpha$ -hidroxibencil)-bencimidazol. La replicación del VHA se ve afectada por antivíricos como la ribavirina, amantadina y 2-desoxi-d-glucosa (Hollinger y Ticehurst, 1990).

### **1.9.8. Diagnóstico**

La técnica de diagnóstico más utilizada son los ensayos inmunoenzimáticos, que permiten detectar anticuerpos de tipo IgM o IgG. Estos tests son lo suficientemente sensibles y específicos (Koff, 1998). Los anticuerpos IgM aparecen de 3 a 7 semanas después de la infección, alcanzan su valor máximo a los 15 días de su aparición, y van declinando hasta llegar a desaparecer en un intervalo de 3-6 meses. Los anticuerpos de la clase IgG comienzan

a producirse a los 8-10 días del comienzo de los síntomas clínicos, alcanzar el máximo a las pocas semanas, y van disminuyendo para alcanzar un nivel bajo que se mantiene durante toda la vida (Maroto y Bernal, 1995).

La presencia de antígeno es detectable en las heces del paciente de 6-13 días antes de comenzar el proceso clínico hasta 4 semanas después de éste (Maroto y Bernal 1995). Para ello se han utilizado diversas técnicas: inmunomicroscopía electrónica (Feinstone y col., 1973), cultivos sobre diversas líneas celulares, enzimoimmunoanálisis y radioimmunoanálisis, que proporcionan una baja sensibilidad. Se han utilizado técnicas moleculares de amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR), que permite detectar concentraciones bajas de virus en sangre y heces (Yotsuyanagi y col., 1996; Fujiwara y col., 1997).

### **1.9.9. Prevención y tratamiento**

La mejor forma de prevenir esta enfermedad consiste en una educación sanitaria adecuada, el control de los alimentos y fuentes de abastecimiento de agua, y una profilaxis pasiva o activa.

La inmunización pasiva con IgG anti-VHA humana ha sido la principal vía de prevención durante 50 años, y es todavía utilizada en casos de post-exposición y en regiones hiperendémicas. No obstante la protección depende de dosis administrada y es de corta duración (Koff, 1998).

El desarrollo de técnicas para cultivar el VHA sobre líneas celulares ha permitido generar suficiente cantidad de virus para la producción de vacunas. Se han desarrollado diversas vacunas de virus inactivados. En la actualidad existen cuatro vacunas comercializadas de virus inactivados con formaldehído, que son altamente inmunogénicas y confieren protección al 100% de los individuos durante al menos 20 años (Koff, 1998; World Health Organization, 2000).

En caso de infección, no se dispone de un tratamiento específico para la hepatitis A. Únicamente se prescribe la administración de corticosteroides en casos de colestasis (Ampurdanès y col., 1995).

## 1.9.10. Epidemiología

### 1.9.10.1. Modelos epidemiológicos

La hepatitis A es una enfermedad de distribución mundial, que puede presentarse en forma de casos esporádicos o bien en brotes epidémicos. Según el nivel de prevalencia se pueden distinguir cuatro modelos epidemiológicos: endemicidad alta, intermedia, baja y muy baja (Figura 1.11. y 1.12.).



**Figura 1.11.**  
Epidemiología mundial de la hepatitis A.

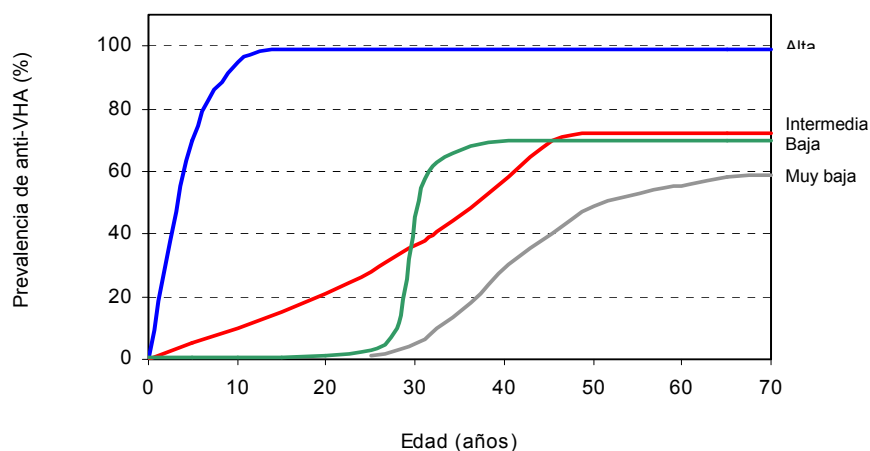
La incidencia más alta de infección por el VHA en el mundo se encuentra en países subdesarrollados, donde las condiciones de vida y los estándares de higiene y saneamiento deficientes favorecen la difusión del virus. En estas regiones del mundo, clasificadas como áreas de alta endemicidad para la hepatitis A, la exposición al virus es universal en la infancia (seroprevalencia superior al 90%) (Melnick, 1995; World Health Organization, 2000). Como resultado, aunque se comunica un número de casos clínicos (30-100 casos por  $10^5$  hab al año) no son datos reales, al ser la mayoría de los casos asintomáticos o bien pasan desapercibidos entre la amplia serie de enfermedades prevalentes en la zona. El mecanismo principal de transmisión es el consumo de agua o alimentos contaminados.



En países en vías de desarrollo donde las condiciones higiénico-sanitarias han mejorado en las últimas décadas, aparece un segundo modelo epidemiológico: endemidad intermedia (20-30 casos por 10<sup>5</sup> hab al año). En estas regiones la transmisión se produce principalmente de persona a persona, a menudo con brotes periódicos. La incidencia en la población infantil es más baja (seroprevalencia del 20-30%) (Domínguez y col., 1995), lo que produce un aumento en los adultos jóvenes expuestos a la infección con manifestaciones clínicas.

En países desarrollados aparece el modelo de endemidad baja. En estas zonas la enfermedad ocurre principalmente en adolescentes y adultos pertenecientes a grupos de riesgo (homosexuales, usuarios de drogas intravenosas), personas que han viajado a países de endemidad media o alta, y en ciertos grupos sociales. Ocasionalmente aparecen brotes asociados al consumo de agua o alimentos contaminados (World Health Organization, 2000). La prevalencia de anticuerpos es baja en la población infantil (<10%) y moderada en la población adulta (30-70%) (Melnick, 1995; Domínguez y col., 1995).

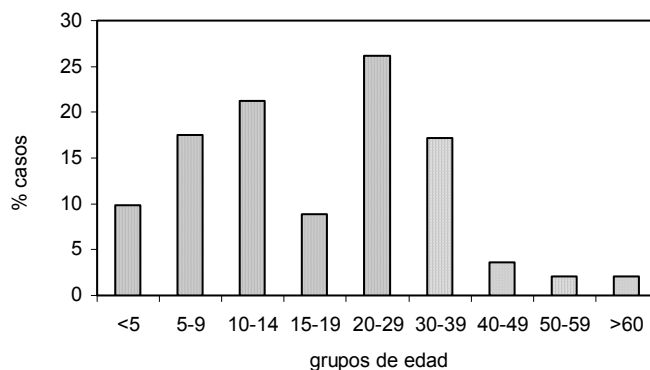
El cuarto modelo aparece en países con nivel socioeconómico muy elevado (países escandinavos, Suiza, Japón). En estas regiones las infecciones por el VHA están desapareciendo. La seroprevalencia en adultos jóvenes es inferior al 10% y en la población de edad más avanzada se sitúa entre 30-60% (Domínguez y col., 1995).



**Figura 1.12.** Seroprevalencia de anticuerpos anti-VHA en las áreas correspondientes a los cuatro modelos de incidencia.

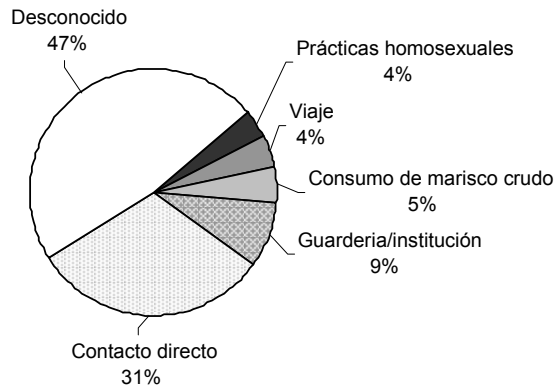
### 1.9.10.2. Epidemiología de la hepatitis A en Cataluña

El área mediterránea se considera una zona de endemicidad intermedia. En Cataluña, a partir de 1990 la hepatitis A es una enfermedad de declaración individualizada obligatoria. Se ha podido observar que en nuestro país, al igual que en otros países desarrollados, se ha producido un cambio en el patrón epidemiológico, observándose un retraso en la edad de la infección (Papaevangelou, 1992), siendo previsible que aumente la incidencia de las formas clínicas de la infección, puesto que las formas asintomáticas son más frecuentes en niños que en adultos (Domínguez y col., 1995). La distribución de los casos declarados en Cataluña durante 1997 demuestra que el 75% corresponden a individuos menores de 30 años (Figura 1.13.) (Departament de Sanitat i Seguretat Social, 1998).



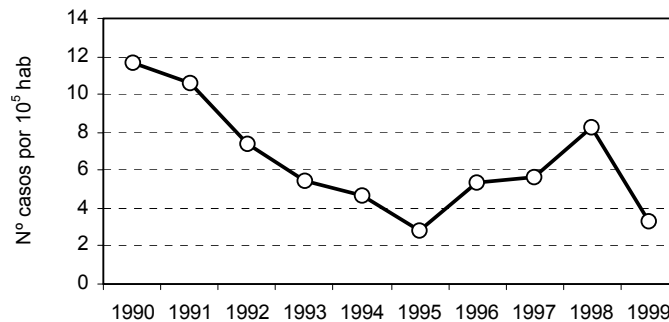
**Figura 1.13.** Distribución por edades de los casos declarados en Cataluña durante 1997 (Departament de Sanitat i Seguretat Social, 1998).

El contacto con una persona infectada es factor de riesgo más frecuente implicado en la transmisión de la infección (Figura 1.14.). En una proporción más baja se sitúan el contacto con niños y la asistencia a guarderías. No obstante, la aparición de la enfermedad a edades cada vez más avanzadas hace que los viajes a zonas endémicas, la ingestión de marisco crudo, la aparición de brotes de origen alimentario o las prácticas homosexuales adquieran una mayor importancia.



**Figura 1.14.** Factores de riesgo asociados a la infección por el VHA (Domínguez y col., 1995).

Se ha podido observar una disminución de la tasa de incidencia en la última década, pasando de un 10,6 por  $10^5$  hab en 1991 hasta un 2,8 por  $10^5$  hab en 1995, y un nuevo aumento hasta alcanzar un 8,3 por  $10^5$  hab en 1998 (Figura 1.15.). Durante el año 1999 la tasa de incidencia se encuentra dentro de los valores normales (Departament de Sanitat i Seguretat Social, 2000). En general el número de casos en varones es entre 1,4-1,6 veces superior a la tasa de incidencia en mujeres (Departament de Sanitat i Seguretat Social, 1991-1999). No se dispone de estudios que permitan cuantificar la subnotificación, pero es probable que ésta sea importante por la frecuente levedad de la enfermedad.



**Figura 1.15.** Variación en la tasa de incidencia de la hepatitis A en Cataluña (nº casos por  $10^5$  hab) entre 1990 y 1999 (Departament de Sanitat i Seguretat Social, 1991-2000).

La distribución temporal de los casos de hepatitis A declarados a lo largo del año, muestra una acumulación de casos hacia finales del invierno y primavera (de febrero a mayo) para descender hasta un mínimo en el mes de agosto. Este patrón es el que cabría esperar considerando que muchos de los brotes presentan una transmisión persona-persona en el ámbito de guarderías y colegios. Otro pico ocurre en los meses de otoño, relacionado con viajes a zonas endémicas durante las vacaciones estivales (Melnick, 1995).

En las áreas donde la circulación del VHA es baja, aparece un patrón cíclico. En los años de pico máximo, que ocurren en intervalos de 5-10 años, el virus circula ampliamente en la población provocando un aumento en el número de casos, y como consecuencia un aumento en la inmunidad. Esto limita la posterior propagación del virus. La circulación del VHA continua disminuyendo hasta que aparecen suficientes individuos jóvenes no inmunes para permitir la difusión del virus, y conducir así a un nuevo máximo.

## **1.10. VIRUS DE LA HEPATITIS E**

### **1.10.1. Antecedentes históricos**

Una proporción significativa de los casos de hepatitis aguda de origen vírico en individuos jóvenes o de mediana edad en países subdesarrollados está provocada por un agente infeccioso serológicamente no relacionado con el virus de la hepatitis A (VHA). Esta enfermedad produce brotes epidémicos o casos esporádicos endémicos, asociados con la ingestión de agua contaminada fecalmente. Esta forma de hepatitis se llamo en un principio hepatitis no-A/no-B de transmisión entérica (ET-NANBH), para distinguirlo de la hepatitis vírica no-A/no-B de transmisión parenteral (hepatitis C).

Los primeros casos bien documentados de hepatitis E proceden de una epidemia que tuvo lugar en Nueva Delhi (India) en 1955-56, donde se identificaron 29.000 casos de hepatitis icterica después debido a la contaminación fecal del agua de distribución de la ciudad. Una epidemia similar de hepatitis vírica ocurrió entre diciembre de 1975 y enero de 1976 en Ahmedabad (India). En ambos casos se pensó que el agente causal era el VHA debido a las similitudes clínicas y epidemiológicas, pero un estudio serológico retrospectivo reveló que el agente etiológico no había sido el VHA ni el virus de la hepatitis B (VHB). Además, existían datos epidemiológicos que demostraban una exposición universal al VHA

durante la infancia en países subdesarrollados, por tanto, era difícil entender la existencia de grandes epidemias producidas por este agente en una población inmunizada.

Se han descrito también grandes epidemias de hepatitis E en diversas partes del mundo entre jóvenes y personas de mediana edad, y aproximadamente el 18% de las mujeres embarazadas murieron como consecuencia de la infección (Tabla 1.11.).

El agente vírico asociado a la ET-NANBH fue aislado a mediados de la década de los 80 por M.S. Balayan. A partir de una suspensión fecal obtenida a partir de un paciente con síntomas de hepatitis, consiguió transmitir la enfermedad por vía oral a un voluntario sano que previamente había sufrido hepatitis A. El individuo infectado manifestó síntomas de hepatitis 36 días después de la ingestión de la suspensión fecal. Se pudieron visualizar por microscopía inmunoeléctronica partículas víricas de aproximadamente 30 nm de diámetro en las heces del voluntario entre los 28 y 45 días después de la exposición, y desarrolló anticuerpos contra el virus recuperado de sus heces. La enfermedad pudo transmitirse también a primates inoculados con la suspensión fecal, y asimismo se confirmó la excreción de partículas víricas en las heces.

Estudios posteriores han conseguido caracterizar y clonar este agente infeccioso, que fue nombrado oficialmente virus de la hepatitis E (VHE) por el ‘International Committee on Taxonomy of Viruses’ (ICTV).

**TABLA 1.11.**  
**Principales brotes epidémicos de hepatitis E**

| Lugar                     | Año     | Nº casos |
|---------------------------|---------|----------|
| Nueva Delhi (India)       | 1955    | 29.000   |
| Kirgizia (Rusia)          | 1955-56 | 10.800   |
| Valle de Katmandú (Nepal) | 1973-74 | 10.000   |
| Ahmedabad (India)         | 1975-76 | ≈30.000  |
| Mandalay (Birmania)       | 1976-77 | 20.000   |
| Kashmir (India)           | 1978-82 | 52.000   |
| Argelia                   | 1980-81 | 780      |
| Tortiya (Costa de Marfil) | 1983-84 | ≈800     |
| Etiopía                   | 1985-86 | 2.000    |
| Xinjiang (China)          | 1986-88 | 120.000  |
| Somalia                   | 1988    | 11.400   |
| Kanpur (India)            | 1990-91 | 79.000   |
| Xinjiang (China)          | 1992-97 | 300.000  |
| Islamabad (Pakistán)      | 1993-94 | 3.827    |

### 1.10.2. Propiedades fisico-químicas del virión

Los viriones son partículas de 32-34 nm de diámetro esféricas y sin envuelta, con espículas e indentaciones en la superficie aunque menos pronunciadas que el virus de Norwalk. El coeficiente de sedimentación es de 183 S, y tiene una densidad de flotación de 1,29 g/ml en tartrato potásico/glicerol. Se ha descrito la extrema fragilidad de la partícula, que pierde fácilmente su integridad cuando se somete a procesos de congelación-descongelación, precipitación, diálisis o altas concentraciones salinas (Krawczynski, 1993). Sin embargo, la partícula parece ser estable en el ambiente cuando se somete a condiciones desfavorables como la radiación solar, desecación, elevadas temperaturas, baja presión osmótica, etc. (Balayan, 1997).

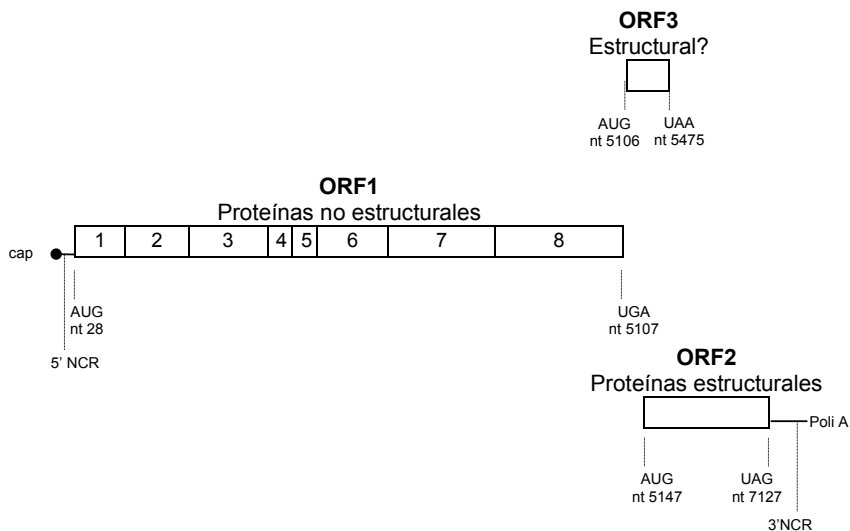
### 1.10.3. Organización genómica

El genoma está formado por una molécula de ARN de cadena sencilla de aproximadamente 7,5 Kb, de polaridad positiva. Presenta dos regiones no codificantes, en el extremo 5' de 27 nucleótidos, y en el extremo 3' de 63 bases (desde el nucleótido 7128 hasta el 7194). En el extremo 5' se ha demostrado la existencia de una estructura tipo *cap*, y en el extremo 3' aparece una cola de adenosinas, características típicas de los ARNm eucariotas. El análisis de la secuencia de las cepas del VHE conocidas indicó la presencia de tres pautas de lectura abiertas (ORFs) (Figura 1.16.):

- ↳ El **ORF1** se extiende desde el nucleótido 28 hasta el 5107 (5079 bases). Se han detectado motivos conservados correspondientes a proteínas víricas funcionales que incluyen una metiltransferasa, una *papain-like* proteasa, una helicasa y una ARN polimerasa. Las regiones denominadas dominio X e Y, identificadas por su homología con otros virus de ARN de polaridad positiva, no tiene una función biológica conocida (Koonin y col., 1992).
- ↳ El **ORF2** localizado hacia el extremo 3' de la molécula de ARN, se extiende desde el nucleótido 5147 hasta el 7127 (1980 bases), y codifica la proteína de la cápside de 660 aminoácidos. La región localizada cerca del extremo N-terminal de la proteína tiene una función asociada con la encapsidación del ARN genómico. Se han localizado puntos de glicosilación aunque la función de la proteína glicosilada se desconoce (Zafrullah y col., 1999). Un epítipo inmunogénico localizado en el extremo C-terminal se ha utilizado en

la diagnosis de la infección por VHE (Khudyakov y col., 1993).

- ↪ El **ORF3** localizado entre los nucleótidos 5106 y 5475 (369 bases), solapado parcialmente con los anteriores, codifica una pequeña proteína fosforilada inmunogénica de 123 aa, que tiene parece estar asociada con el citoesqueleto celular, aunque su función se desconoce (Zafrullah y col., 1997).



**Figura 1.16.**

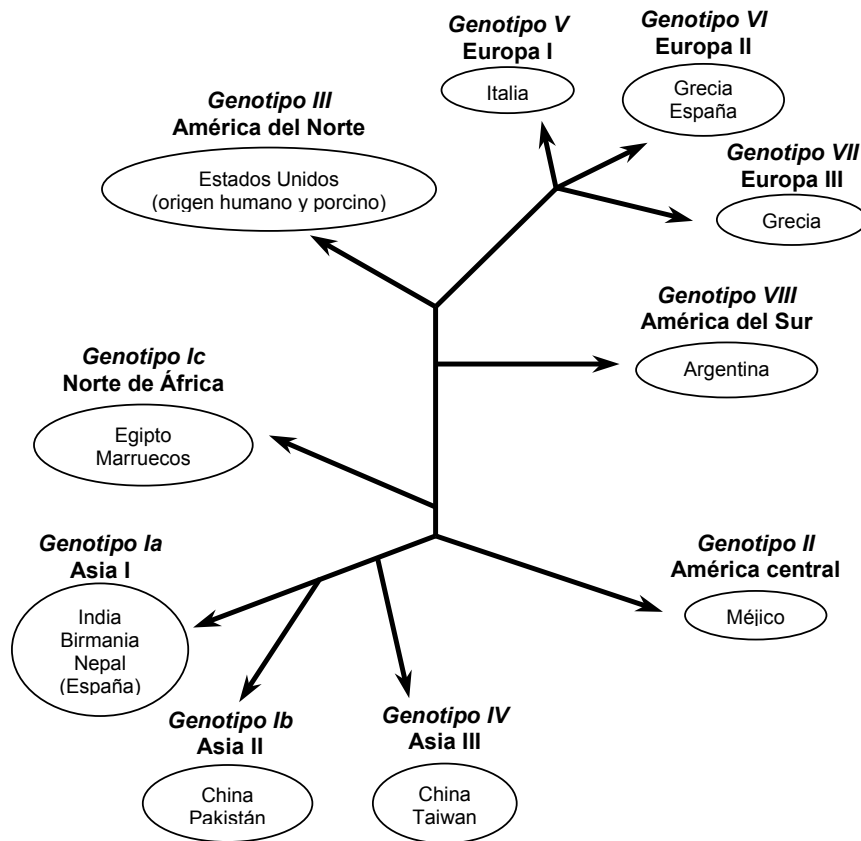
Organización genómica del VHE (modificado de Tam y col., 1999). El orden de los genes no estructurales del ORF1 es: (1) metiltransferasa, (2) dominio Y, (3) papain-like proteasa, (4) región hipervariable, (5) dominio rico en prolina, (6) dominio X, (7) helicasa, y (8) ARN polimerasa ARN dependiente. AUG, codón de inicio de traducción; UAA/UAG/UGA, codones de final de traducción; nt, posición según la cepa de Birmania (Tam y col., 1991).

#### 1.10.4. Heterogeneidad genética

Se han identificado 8 genotipos a partir del estudio de la secuencia de nucleótidos de las cepas aisladas en diferentes regiones (Figura 1.17.). Se han podido aislar y secuenciar total o parcialmente cepas de VHE en Asia, Africa, Europa y América. Las cepas asiáticas (Birmania, India, China y Pakistán) presentan un 93-100% de identidad en las regiones codificantes (<10% divergencia en el ORF1 y 2, 2% en el ORF3), y un 98-100% de identidad en la secuencia de nucleótidos. La cepa aislada en Méjico es la que está filogenéticamente más alejada de demás como demuestran los estudios de comparación de secuencias. La región 5'NTR, que en la mayoría de las cepas presenta 26-27 nucleótidos, sólo tiene 3 nucleótidos en la cepa mejicana. En el ORF1 difiere de las cepas asiáticas en un 25% de la secuencia de nucleótidos y un 17% en la secuencia de aminoácidos, 20% y 7% en el ORF2 y 10% y 13%

en el ORF3. El análisis de las secuencias parciales de varias cepas aisladas en Africa (Argelia, Chad, Marruecos y Egipto) indica que están relacionadas con las cepas asiáticas. Simultáneamente a la realización de esta tesis se han identificado cepas del VHE en Grecia, Italia y en Estados Unidos. Estas nuevas cepas son claramente divergentes respecto a las anteriores (15-25% divergencia en la secuencia de nucleótidos, 2-4% divergencia en la secuencia de aminoácidos) (Figura 1.17.).

La heterogeneidad genética encontrada entre las cepas de países endémicos y las nuevas cepas procedentes de países considerados previamente como no endémicos sugiere que el VHE debe haberse dispersado geográficamente en la antigüedad y que han evolucionado de forma diferente.



**Figura 1.17.**

Distribución en genotipos de las cepas del VHE aisladas en países endémicos y no endémicos, según datos de varios autores (Wang y col., 1999; Schlauder y col., 1999; Schlauder y col., 2000). La longitud y disposición de las ramas no indica relación evolutiva.



### 1.10.5. Clasificación taxonómica

Las características morfológicas y su organización genómica similares al virus de Norwalk y otros calicivirus, hicieron que se clasificara provisionalmente dentro de la familia *Caliciviridae*. Estudios moleculares posteriores han demostrado una baja homología con este grupo, y cierto nivel de similitud con las regiones helicasa y polimerasa de togavirus (Koonin y col., 1992; Berke y Matson, 2000). La posición taxonómica del VHE es pues incierta, habiendo sido definido por el ICTV el género “*Hepatitis E-like viruses*” (Pringle, 1999).

### 1.10.6. Replicación

Al igual que otros virus hepatotrópicos, el cultivo sobre líneas celulares ha sido muy difícil y solo se ha conseguido la multiplicación poco eficiente de algunas cepas aisladas en China, Rusia y Birmania (Kazachkov y col., 1992; Huang y col., 1995; Tam y col., 1996).

La estrategia de replicación no ha sido todavía bien caracterizada. El mecanismo de unión al receptor, entrada y desencapsidación de la partícula viral se desconoce. La presencia del dominio metiltransferasa sugirió la presencia de una estructura tipo *cap* en el extremo 5' de la molécula, ya que es el enzima responsable de la metilación de la guanosina terminal para producir la estructura  $m^7G(5')ppp(5')X$ . Después de la desencapsidación, el genoma de 7,5 Kb es traducido probablemente vía mecanismos celulares que reconocen el ARN *capped*. El procesamiento de la poliproteína codificada por el ORF1 puede producirse mediante proteasas celulares, aunque también podría intervenir la *papain-like* proteasa vírica. Se ha podido detectar por PCR un intermediario replicativo de ARN de cadena negativa en tejido hepático infectado. A partir de éste se generarían cadenas de ARN de polaridad positiva de 7,5 Kb (genómico y mensajero), y dos ARN subgenómicos mensajeros de 3,7 y 2,0 Kb. Éstos se han podido detectar por *Northern-blot* en tejido infectado, y podrían estar relacionados con la expresión del ORF2 y ORF3. Así pues la estrategia de expresión del virus implicaría el uso de las tres pautas de lectura abierta y por lo menos tres ARNm.

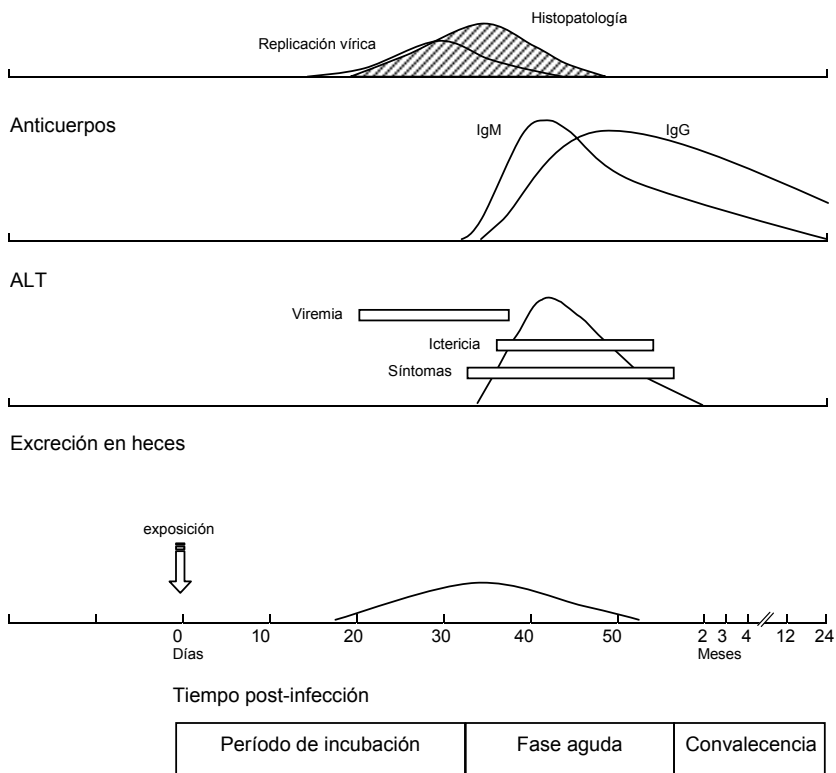
### 1.10.7. Manifestaciones clínicas

El curso de la infección producida en primates no humanos es similar a la del hombre. (Figura 1.18.) y se ha estudiado cómo modelo experimental.

El período de incubación es de 3 a 8 semanas, hasta la aparición de un incremento en la actividad de los enzimas hepáticos (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -glutamyl-transferasa), que puede seguir un patrón unimodal o bimodal. La detección del antígeno en el hígado se produce al mismo tiempo que la viremia y la excreción en las heces. Al igual que en la hepatitis A, la respuesta inmune aparece al final del período de incubación o durante la fase aguda de la enfermedad y se caracteriza por la aparición rápida de IgM y IgG anti-VHE. Al igual que en la hepatitis A, la viremia podría persistir durante algún tiempo después de la aparición de la respuesta inmune, sugiriendo la presencia de complejos inmunes.

En el hombre uno de los síntomas clínicos es la ictericia, que aparece al mismo tiempo que el aumento de los niveles de transaminasas, y puede persistir durante 15-40 días. Esto suele ir acompañado con la excreción de orina y heces de color oscuro. En ocasiones se dan casos de hepatitis E subclínica en que no aparece ictericia. Otros síntomas asociados con la infección por VHE sintomática incluyen malestar (95-100% casos), anorexia (66-100%), vómitos (29-100%), dolor abdominal (37-82%), fiebre (23-97%) y hepatomegalia (10-85%). Menos común es la aparición de diarrea, artralgia, prurito y urticaria (Mast y Krawczynski, 1996).

Generalmente la hepatitis E ocurre de forma autolimitada, acabando con la completa recuperación del enfermo y no progresa hacia una enfermedad hepática crónica. En ocasiones se han descrito casos de hepatitis E fulminante. Aunque el índice de mortalidad media producida por hepatitis E en la población general es de 0,5-1%, en mujeres embarazadas puede llegar a ser del 15-25% durante el tercer trimestre de gestación. El mecanismo que conduce al fallo hepático fulminante durante el embarazo es desconocido (Mast y Krawczynski, 1996).



**Figura 1.18.**

Fases, síntomas y evolución de la respuesta inmune tras una infección con el VHE. Los datos sobre viremia y excreción en heces están basados en análisis por PCR (modificado de Purcell, 1996).

### 1.10.8. Histopatología

La entrada del virus en el organismo huésped suele ser principalmente vía oral por consumo de agua o alimentos contaminados, o por contacto directo persona-persona. En mujeres embarazadas infectadas puede producirse transmisión vertical. El sitio de replicación primaria podría ser el tracto intestinal, y llegaría hasta el hígado a través de la vena porta. El virus replicaría en los hepatocitos y sería liberado a la bilis y al torrente sanguíneo.

Los cambios histopatológicos producidos por la infección por VHE se estudiaron a partir de biopsias obtenidas a partir de pacientes procedentes de dos brotes epidémicos ocurridos en la India y en Ghana entre 1962 y 1963, y a partir de primates infectados. Se observaron dos tipos de patología: colestática y estándar. El tipo colestático o obstructivo se caracteriza por la presencia de estasis biliar en los canalículos y transformación glandular de los hepatocitos, con aparición poco frecuente de cuerpos acidófilos y focos de necrosis. La

hepatitis vírica de tipo estándar se caracteriza por la aparición de focos de necrosis con acumulación de macrófagos mononucleares, células de Kupffer activadas y linfocitos. Se observaron también células hepáticas globulares y degeneración de los mismos con formación de cuerpos acidófilos.

### **1.10.9. Rango de huéspedes**

Además del hombre, parece ser que diversas especies animales pueden ser infectadas por cepas del VHE. Se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-VHE de forma natural en varias especies de primates salvajes, en animales domésticos (cerdos, pollos, vacas, ovejas, cabras) (Balayan y col., 1990; Clayson y col., 1995; Tien y col., 1997; Favorov y col., 1998) y en varias especies de roedores (Kabrane-Lazizi y col., 1999; Favorov y col., 2000). La naturaleza zoonótica del VHE se ha demostrado recientemente con el aislamiento de un cepa de origen porcino (Meng y col., 1997).

La infección experimental se ha comprobado en más de 10 especies de primates no humanos, cerdos y roedores (Balayan y col., 1990; Tsarev y col., 1993a; Meng y col., 1998b; Maneerat y col., 1996). El rango de huéspedes depende de la cepa de VHE.

### **1.10.10. Diagnóstico**

El método tradicional para el diagnóstico de la infección por VHE ha sido la detección de partículas víricas en muestras de heces por microscopía inmunoelectrónica (IEM). Este método es altamente específico pero difícil de aplicar a muestras clínicas que no suelen contener suficiente cantidad de partículas para ser visualizadas. Posteriormente se desarrolló un ensayo de bloqueo inmunofluorescente para detectar anticuerpos anti-VHE en suero, pero esta prueba no podía distinguir entre una infección reciente o antigua.

Una vez clonado y secuenciado el genoma del VHE, se desarrollaron ensayos de *Western-blot* e inmunoenzimáticos (ELISA) para detectar anticuerpos anti-VHE utilizando proteínas recombinantes o péptidos sintéticos que contuvieran epítomos inmunodominantes de las regiones ORF2 y 3. Estos últimos permiten detectar IgM e IgG, y han demostrado ser lo suficientemente sensibles (93,5%) y específicos (99% para IgM y 97% para IgG). Se ha conseguido clonar el ORF2 completo en baculovirus y se ha expresado en células de insecto, obteniendo una proteína nativa soluble llamada 62K y 55K (procedente de la cepa de

Birmania y de Pakistán respectivamente), que contiene epítomos adicionales, presumiblemente conformacionales, que no aparecen en las demás proteínas recombinantes. Ésta proteína puede ser de gran utilidad para estudios epidemiológicos a gran escala, y ha demostrado ser efectiva en pruebas experimentales de vacunación.

El conocimiento de la secuencia de nucleótidos de varias cepas del VHE hizo posible la puesta a punto técnicas basadas en la amplificación enzimática específica de regiones genómicas, que han demostrado una gran sensibilidad y especificidad. Estas técnicas basadas en PCR son aplicables a todo tipo de muestras clínicas (suero, heces, tejido hepático), así como a muestras ambientales (agua, moluscos bivalvos). Este tipo de técnicas puede aportar mucha información sobre la epidemiología del VHE.

### **1.10.11. Prevención y control**

Actualmente no existe una terapia contra la hepatitis E, ni existe una vacuna comercializada. En este aspecto se ha estado trabajando en varias aproximaciones.

La falta de un sistema *in vitro* para poder multiplicar el VHE ha hecho imposible el desarrollo de vacunas de virus inactivados o atenuados. Se han evaluado varias proteínas recombinantes como potenciales candidatas para la elaboración de una vacuna. La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el ORF2 presenta un 93% de identidad entre las cepas más divergentes y un 99% entre las cepas filogenéticamente más cercanas aisladas en Asia, sugiriendo la presencia de un determinante inmunológico bien conservado común a todas las cepas. Se ha demostrado, además, que primates infectados con cepas de VHE son resistentes a posteriores infecciones con otras cepas. Estudios experimentales hechos en primates utilizando las proteínas recombinantes 62K y 55K del ORF2, han demostrado que son capaces de proporcionar protección contra la infección por el VHE.

Recientemente se ha estudiado la posibilidad de obtener una vacuna de ADN. Experimentos realizados en ratones han demostrado que la inoculación directa de un vector de expresión eucariota conteniendo la secuencia completa del ORF3, es capaz de inducir la respuesta humoral (Fengmin y col.,1996).

Hasta el momento la única vía para prevenir la infección por VHE es la utilización de aguas de abastecimiento sin contaminación fecal, evitar el consumo de alimentos no cocinados y la aplicación de medidas higiénico-sanitarias apropiadas.

### 1.10.12. Epidemiología

Basándose en los datos sobre la existencia de epidemias confirmadas serológicamente o de casos esporádicos recurrentes, se ha comprobado que el área de distribución de la hepatitis E abarca la mayoría de los países tropicales y subtropicales (Figura 1.19.). Se han descrito brotes epidémicos en Asia (India, Pakistán, Nepal, Birmania, Borneo, China, Rusia), África (Somalia, Sudan, Argelia, Costa de Marfil, Kenia) y en América del Norte (Méjico), y casos esporádicos en varios países europeos (Reino Unido, Holanda, Alemania, Noruega, Francia, Italia, Grecia, España, Austria) y en Estados Unidos, en ocasiones importados de zonas endémicas. Se han propuesto algunos parámetros para la clasificación de estas zonas (Tabla 1.12.).

**TABLA 1.12.**  
**Diferencias entre regiones endémicas y no endémicas para el VHE**

|                                    | Endémica                          | No endémica  |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|
| Incidencia de la hepatitis E       | ✓ Alta                            | ✓ Baja o nula                                      |
| Manifestaciones epidemiológicas    | ✓ Brotes de magnitud variable     | ✓ Casos esporádicos (importados?)                  |
| Condiciones sanitarias             | ✓ Pobres                          | ✓ Adecuadas  |
| Transmisión por aguas contaminadas | ✓ Frecuente                       | ✓ Nula   |
| Hábitos higiénicos                 | ✓ Sólo en ciertos grupos sociales | ✓ Adecuados en la población general                |
| Reservorio no humano del VHE       | ✓ Muy probable                    | ✓ Probablemente cerdos o otros animales domésticos |
| Casos documentados                 | ✓ Algunos                         | ✓ Todos  |
| Condiciones climáticas             | ✓ Clima cálido                    | ✓ Clima templado                                   |



**Figura 1.19.**  
Países en que existen evidencias de casos de hepatitis E epidémicos o esporádicos

- Zonas endémicas confirmadas serológicamente, con brotes epidémicos documentados o casos esporádicos recurrentes (más del 25% de los casos de hepatitis no-ABC son debidos al VHE)
- Zonas no endémicas con casos esporádicos documentados
- Zona con casos esporádicos documentados en esta tesis

En países subdesarrollados la infección por VHE es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad entre los individuos de 15-45 años. La prevalencia de anticuerpos anti-VHE en la población general de zonas endémicas es de un 3-26%:  $\leq 5\%$  en niños menores de 10 años, y 10-40% en individuos de 20-30 años, sin diferencias entre sexos (Arankalle y col., 1995). En países no endémicos, la prevalencia de anti-VHE es de 1-3%, más alta que lo que cabría esperar considerando los pocos casos existentes de hepatitis E esporádica, a menudo importados de áreas epidémicas. Estos datos sugieren la existencia de infecciones subclínicas, probablemente provocadas por cepas atenuadas. Recientes estudios demuestran la existencia de reservorios animales de cepas del VHE. Esto podría estar relacionado con la relativa alta prevalencia de anticuerpos en la población de países no endémicos.

El factor más importante que favorece la transmisión del VHE son las condiciones de saneamiento deficientes. Las epidemias más severas se produjeron en poblaciones dónde no existen sistemas recogida y tratamiento de residuos fecales. Esto puede producir la contaminación de las fuentes de abastecimiento de agua durante las épocas de lluvias, y la consiguiente aparición de brotes epidémicos con distribución estacional.

Las características epidemiológicas más importantes se resumen en la Tabla 1.13.

**TABLA1.13.**  
**Características clínicas y epidemiológicas para el reconocimiento de la infección por VHE en zonas endémicas**

| <b>Características epidemiológicas</b>   | <b>Características clínicas</b>  |
|--|--|
| ➤ Transmisión fecal-oral   | ➤ Periodo de incubación de 15-40 días                                      |
| ➤ Brotes provocados por consumo de agua contaminada fecalmente                 | ➤ Casos de hepatitis fulminante  |
| ➤ Distribución geográfica: países tropicales y subtropicales                   | ➤ Formas severas en mujeres gestantes, con un $\approx 20\%$ de mortalidad |
| ➤ Aparición estacional: mayor incidencia durante la época de lluvias           | ➤ No deja secuelas   |
| ➤ Prevalencia específica de edad: mayor incidencia en individuos de 15-40 años | ➤ Histopatología variable  |
| ➤ Transmisión en ciertos grupos socioeconómicos grupos                         | ➤ Formas subclínicas   |
| ➤ Posibilidad de un reservorio animal  |  |



## **1.11. EL DESARROLLO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VIRUS EN EL MEDIO AMBIENTE**

### **1.11.1. Métodos de concentración de virus a partir de muestras ambientales**

Las aguas residuales urbanas contienen concentraciones de virus suficientemente elevadas que permiten la detección directa, o tras una etapa sencilla de concentración. Pero en ocasiones los virus entéricos se encuentran en el medio acuático en cantidades muy pequeñas, lo que hace que sea necesario la concentración de grandes volúmenes de agua. Este paso constituye uno de los problemas principales de la virología ambiental.

La mayor parte de los métodos de recuperación de virus aprovechan las propiedades de los virus como macromoléculas proteicas. Los virus se comportan en el medio como un coloide hidrófilo en el que la carga eléctrica neta varía en función del pH y de la fuerza iónica del medio. Tienen, además, la capacidad de adsorberse sobre partículas en suspensión o soportes de cualquier tipo.

Un buen método de concentración debe ser lo más simple, rápido y barato posible, debe proporcionar altas tasas de recuperación y ser aplicable a la recuperación de diferentes virus. El concentrado viral obtenido debe estar libre de posibles sustancias tóxicas o inhibitorias presentes en las muestras para que pueda ser utilizado en los procesos de detección de subsiguientes.

Se han propuesto más de 30 métodos de concentración, aunque no existe un método universal aplicable a todo tipo de agua y a todo tipo de virus. La metodología debe escogerse en función de los diferentes factores:

- La concentración viral, variable según el tipo de agua, el virus de interés y la estación, a la vez que dependiente de factores geográficos y climáticos.
- El tipo de agua, ya que las variaciones en sus características físico-químicas y en la cantidad de materia orgánica afectan a la capacidad de agregación de los virus, así como a la eficiencia de algunos métodos.
- El tipo de virus, ya que ciertos métodos podrían provocar la inactivación de algunos virus.

En la Tabla 1.14. se recogen las características principales de algunos de los métodos de concentración aplicados a la recuperación de virus a partir de muestras de aguas de diversos orígenes.

**TABLA 1.14.**  
**Métodos de concentración de virus a partir de muestras de agua de diversos orígenes**

| <b>Método</b>          | <b>Material</b>   | <b>Utilización</b>                            | <b>Volumen procesable</b>  |
|------------------------|---|---|----------------------------|
| Electroforesis         |   | reconcentración                               | pequeño                    |
| Electroosmosis         |   | reconcentración                               | pequeño                    |
| Separación de fases    | ⇒ sulfato de dextrano<br>⇒ polietilenglicol             | aguas muy turbias                             | pequeño                    |
| Método de las gasas    | ⇒ gasa hidrófila  | aguas turbias                                 | indefinido                 |
| Floculación inorgánica | ⇒ sulfato amónico, cloruro férrico, sulfato de aluminio | como método secundario                        | pequeño                    |
| Floculación orgánica   | ⇒ extracto de carne                                     | como método secundario                        | pequeño                    |
| Adsorción–elución      | ⇒ filtros electronegativos                              | muestras poco turbias                         | grande                     |
|                        | ⇒ filtros electropositivos                              | muestras poco turbias                         | grande                     |
|                        | ⇒ polvo de vidrio<br>⇒ lana de vidrio                   | muestras poco turbias                         | medio-grande               |
| Ultrafiltración        | ⇒ membranas de celulosa                                 | cualquier tipo de agua                        | variable según la turbidez |
|                        | ⇒ membranas de poliétersulfona                          |   |                            |
| Ultracentrifugación    |   | muestras muy turbias o como método secundario | pequeño                    |

<sup>a</sup> Lucena y col., 1991

### ***1.11.1.1. Concentración de virus por filtración–elución***

Los métodos de concentración por adsorción-elución sobre diferentes soportes responden a la capacidad de los virus para asociarse a diferentes materiales: membranas o cartuchos filtrantes, polvo de vidrio, lana de vidrio, sales metálicas, polielectrolitos insolubles, carbón activo (Lucena y col., 1991). En estas uniones representan un papel fundamental la

composición química de los soportes, la fuerza iónica y el pH del medio, y la presencia de materia orgánica en suspensión o proteínas.

La mayor parte de los virus presentes en el medio hídrico son virus desnudos, sin envueltas lipídicas alrededor de la cápside proteica. Ésta contiene aminoácidos con grupos ionizables que confieren a los virus una carga eléctrica dependiente del pH. El punto isoeléctrico (pHi) del virus permite conocer la carga global del mismo en unas condiciones determinadas de pH. Una gran parte de los virus al pH natural del agua, poseen una carga global negativa (Mandel, 1971) que les permite unirse sobre un soporte cargado positivamente mediante atracciones de tipo electrostático.

Los filtros microporosos con carga neta electropositiva se han utilizado de forma estándar en estudios ambientales, ya sea en forma de membranas o en forma de cartuchos filtrantes. Los filtros electropositivos Zeta Plus 50S o 60S (CUNO div.) están compuestos de celulosa con carga modificada, y permanecen cargados positivamente a pHs inferiores a 6 (Sobsey y Jones, 1979). Estos filtros permiten la adsorción de virus a pH de 5,5–7,5 o de 3,5–6,0 respectivamente, con una eficiencia en la recuperación media de un 64% (Sobsey y Jones, 1979; Sobsey y Glass, 1980). Ma y col., en 1994, evaluaron la eficiencia en la recuperación de Polio-1 a partir de agua de distribución utilizando cartuchos filtrantes MK y 1MDS, siendo de 73 y 90% respectivamente.

La utilización de filtros microporosos con carga neta electronegativa requiere la acidificación de la muestra de agua o la adición de sales (NaCl, MgCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>) (Shields y Farrah, 1983; Lukasik y col., 2000) para promover la adsorción, lo cual contribuye a eliminar las fuerzas electrostáticas de repulsión entre los viriones y la superficie de los filtros (Lucena y col., 1991). La utilización de esta técnica se ve limitada por la inactivación de ciertos virus a pHs ácidos.

La adsorción de los virus sobre la superficie de filtros microporosos se ve afectada por la temperatura, el pH, la turbidez y la concentración de materia orgánica en suspensión, que hacen variar la eficiencia de la recuperación. La materia orgánica disuelta y las partículas coloidales en suspensión presentes en las muestras pueden provocar la colmatación de los filtros, limitando así el volumen máximo que se puede procesar. Estas pueden, además, competir con los virus en la adsorción sobre los filtros. La elución de los virus a partir de los soportes se hace con soluciones alcalinas, preferiblemente conteniendo extracto de carne o glicina a pHs entre 9 y 11.

### ***1.11.1.2. Concentración de virus por floculación orgánica***

La floculación orgánica aplicada comúnmente como método de concentración secundaria, se basa en la capacidad que tienen las proteínas para formar flóculos a pHs ácidos inferiores a su pHi. Los virus presenten en solución son atrapados entre los flóculos permitiendo así su recuperación. Se utilizan el extracto de carne, la caseína o la leche descremada en polvo. Es una técnica sencilla, económica y rápida, aunque los resultados obtenidos dependen del virus.

La precipitación con sulfato de amonio—extracto de carne permite la precipitación de las proteínas a pH neutro. Este método es aplicable a la concentración de virus sensibles al pH, aunque existe el inconveniente de la toxicidad del sulfato de amonio que puede afectar a células en cultivo o a posteriores reacciones enzimáticas. Alternativamente se ha utilizado la precipitación con polietilenglicol. Esta técnica eficaz y económica, aunque lenta, es aplicable a cualquier virus, permitiendo una recuperación que se aproxima al 100% (Lucena y col., 1991).

### ***1.11.1.3. Concentración de virus por ultracentrifugación***

Basadas en la capacidad de los virus de sedimentar cuando son sometidos a una fuerza centrífuga. Aplicable solo a pequeños volúmenes de agua, se ha utilizado con éxito para recuperar virus a partir de aguas con gran cantidad de materia orgánica o como método de reconcentración, con una eficiencia en la recuperación de Poliovirus tipo 1 de un 70% (Puig y col., 1994).

### ***1.11.1.4. Concentración de virus por ultrafiltración***

La ultrafiltración permite la separación mecánica de las partículas en función de su peso molecular. Se utilizan membranas con un diámetro de poro inferior al tamaño de los virus (peso molecular nominal límite entre  $10^3$  y  $10^6$  Da) para permitir su retención. La suspensión vírica puede pasar a través de la membrana perpendicularmente o circular tangencialmente a la superficie. Son métodos de gran sensibilidad aunque el caudal de filtración suele ser pequeño y limitado por la colmatación de los filtros. Se ha aplicado comúnmente a aguas muy limpias y como método de concentración secundaria.

### 1.11.2. Métodos de detección e identificación de virus en muestras ambientales

En la mayoría de los casos el análisis virológico e identificación se efectúa después del proceso de concentración de partículas víricas a partir de la muestra. Los sistemas de detección e identificación desarrollados son complejos, económicamente caros y se requiere de personal y equipamiento especializados. En la Tabla 1.15. se resumen las ventajas e inconvenientes de algunos de estos métodos.

**TABLA 1.15.**  
**Métodos de detección e identificación de virus**

| Método  | Ventajas  | Inconvenientes   |
|---|---|--|
| <i>Inoculación en animales</i>                        | ⇒ Permite estudiar patogenicidad  | ⇒ Método lento y costoso<br>⇒ Aplicable sólo a algunos virus   |
| <i>Cultivo celular</i>                                | ⇒ Permite estudiar viabilidad<br>⇒ Permiten cuantificar partículas infecciosas  | ⇒ Sensibilidad variable en función de la línea celular y el tipo de virus<br>⇒ Aplicable sólo para algunos virus<br>⇒ Necesidad de personal bien preparado<br>⇒ Método lento y caro<br>⇒ Necesidad de utilizar de forma combinada técnicas inmunológicas o moleculares   |
| <i>Microscopía electrónica</i>                        | ⇒ Rapidez<br>⇒ Información morfológica  | ⇒ Baja sensibilidad (como mínimo 10 <sup>6</sup> partículas/ml)<br>⇒ Posibilidad de confusión ya que el diagnóstico se realiza basándose en criterios morfológicos   |
| <i>Técnicas inmunológicas</i>                         | ⇒ Permiten detectar el antígeno   | ⇒ Baja sensibilidad  |
| <i>Técnicas moleculares</i><br>☞ Hibridación<br>☞ PCR | ⇒ Proporcionan la máxima rapidez, sensibilidad y especificidad<br>⇒ Permite detectar virus que no se multiplican sobre líneas celulares<br>⇒ Permiten realizar estudios filogenéticos y epidemiológicos | ⇒ Requiere el conocimiento de la secuencia de nucleótidos del virus<br>⇒ No proporciona información sobre viabilidad (posibilidad de detectar partículas no infecciosas o genomas libres)<br>⇒ Necesidad de personal bien preparado e infraestructura adecuada<br>⇒ Métodos muy sensibles a sustancias inhibidoras de las reacciones enzimáticas |

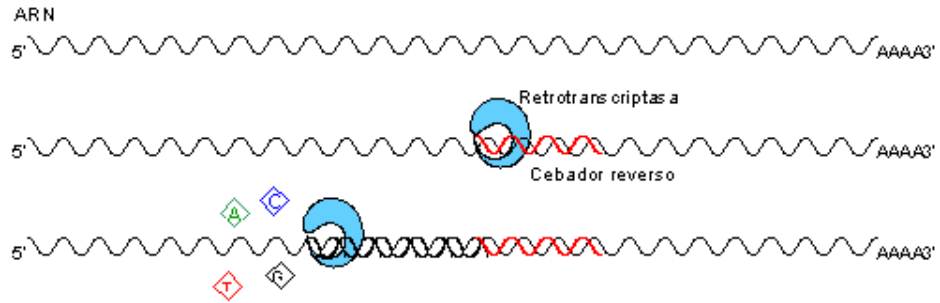
El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido la detección e identificación de bajas concentraciones de virus en muestras de diversos orígenes, proporcionando la máxima sensibilidad y especificidad.

La amplificación de fragmentos cortos de ADN utilizando una reacción en cadena catalizada por un enzima ADN polimerasa termoestable fue descrita por Mullis y Faloona en 1987. El proceso requiere del conocimiento previo de segmentos del genoma del organismo que se desea detectar, que permitan el diseño de oligonucleótidos específicos funcionen como cebadores y que flanqueen un fragmento del genoma. La amplificación de genomas de ARN requiere un primer paso de síntesis de ADNc mediante un enzima ADN polimerasa ARN dependiente (transcriptasa inversa) (Figura 1.20.). El proceso implica una etapa de desnaturalización de las cadenas molde iniciales, una etapa de hibridación de los cebadores con las secuencias complementarias, y una etapa de elongación de las cadenas generando dos moléculas de ADN de doble cadena idénticas. El número de copias aumenta de forma exponencial en cada ciclo según la ecuación  $N \times 2^c$ , donde  $N$  es el número de moléculas diana iniciales y  $c$  es el número de ciclos. La aplicación de esta técnica permite la detección de aproximadamente  $10^3$  moléculas de ADN inicial, sensibilidad que puede incrementarse continuando con una segunda amplificación utilizando cebadores internos o con hibridación. La sensibilidad máxima se obtiene por PCR seguido de PCR anidada que permite detectar una molécula de ADN (Allard y col., 1992; Puig y col., 1994).

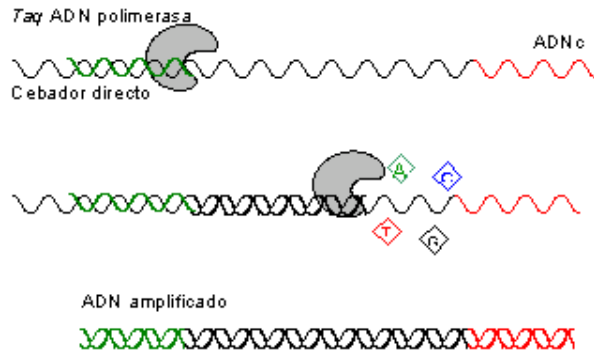
El principal problema que resulta de la aplicación de las técnicas de amplificación genómica en estudios ambientales, es la presencia de sustancias de diferente naturaleza química capaces de inhibir la acción de los enzimas utilizados en la reacción (Wilson, 1997). Por otro lado, la extrema sensibilidad hace indispensable mantener las medidas de control de contaminaciones cruzadas con material previamente amplificado, que podrían dar lugar a falsos positivos (Kitchin y Bootman, 1993).

En la actualidad la mayoría de los protocolos de detección e identificación de virus están basados en técnicas moleculares. La utilización de técnicas moleculares no implica la eliminación de la práctica de los métodos tradicionales. Las primeras permiten incrementar la sensibilidad y especificidad, y proporcionan resultados en el menor tiempo posible. Contrariamente, la detección molecular de virus no aporta información sobre la viabilidad de las partículas víricas (Sobsey y col., 1998), característica evidenciada únicamente mediante los estudios de infectividad frente a células huésped.

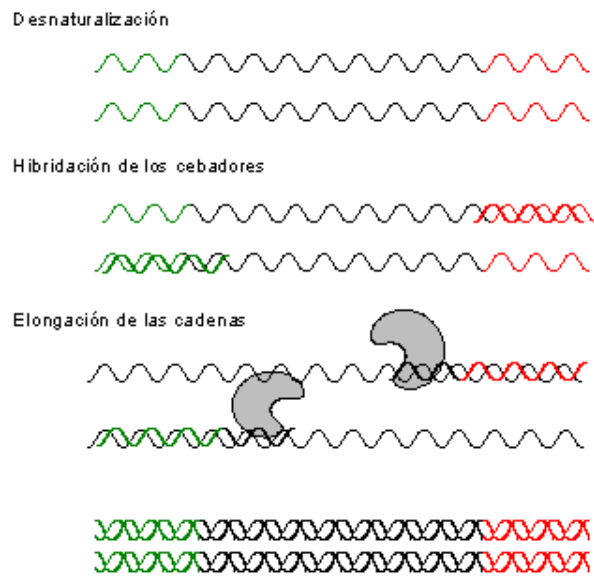
**Transcripción inversa**



**Primer ciclo de amplificación**



**Segundo ciclo de amplificación**



**Figura 1.20.** Amplificación enzimática de ácidos nucleicos.

## **1.12. MICROORGANISMOS MODELO PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD DEL AGUA**

### **1.12.1. El concepto de microorganismo índice e indicador**

La detección de microorganismos patógenos transmitidos por el agua requiere la utilización de técnicas a menudo muy costosas en términos económicos y que no proporcionan una adecuada rapidez y eficiencia en el diagnóstico. En ocasiones se hace imposible la identificación de ciertos microorganismos por métodos convencionales. No es de ningún modo factible incluir pruebas moleculares para detectar todos los microorganismos patógenos de interés. Estas dificultades han conducido a la búsqueda de microorganismos modelo de la calidad del agua, que quedó asociado desde un principio a los microorganismos que se encuentran formando parte de la flora microbiana de las heces.

El grupo de la IAWPRC en 1991 estableció el concepto de microorganismo modelo de la calidad virológica del agua, diferenciando entre dos funciones: *índice* e *indicador*. Un organismo índice proporciona información sobre la posible presencia de determinados patógenos, y de los posibles riesgos sanitarios que pueden representar para la salud. Un organismo indicador aporta datos sobre los efectos de un proceso de tratamiento o a la calidad de un cierto producto.

Las características que debe cumplir un organismo para poder ser utilizado como modelo fueron descritas por G. Berg en 1978:

- ↪ Debe estar asociado a la fuente del patógeno (en este caso las heces humanas) y no encontrarse en aguas no contaminadas.
- ↪ Debe estar presente en concentraciones superiores a la del patógeno en las heces de los individuos infectados.
- ↪ Debe existir correlación entre el indicador y el patógeno, de manera que al cuantificar el indicador se tenga una estima del número de patógenos.
- ↪ Ha de presentar un comportamiento similar al del patógeno, esto es, no multiplicarse en el medio externo, y exhibir como mínimo, igual resistencia a los procesos de inactivación y depuración que los virus a controlar.



- ↳ La metodología utilizada para su detección y/o cuantificación debe ser sencilla, rápida y económica, y aplicable a cualquier tipo de agua.
- ↳ El test utilizado debe detectar específicamente el microorganismo indicador y no debe dar falsos positivos o negativos.
- ↳ El microorganismo indicador no ha de ser patógeno ni comportar riesgo alguno para la salud humana.

### 1.12.2. Indicadores bacterianos

La normativa medioambiental de los países desarrollados respecto a la calidad sanitaria del agua se basan en el cumplimiento de unos niveles guía de poblaciones bacterianas en un determinado volumen de agua. Los exámenes bacteriológicos ofrecen la prueba más sensible para detectar la contaminación fecal reciente. Las bacterias se excretan en cantidades constantes de aproximadamente  $10^8$  por gramo de heces, pudiendo encontrarse tanto en heces humanas como en heces de otros animales de sangre caliente.

Las bacterias coliformes totales (CT) y fecales (CF) se han estado utilizando desde hace tiempo de forma rutinaria para controlar la calidad sanitaria del agua principalmente por estar asociados a contaminación fecal, y por poder detectarse de forma fácil y rápida (APHA, 1995).

Los estreptococos fecales (EF) o enterococos (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. bovis*, *E. avium*) han sido probablemente el grupo de microorganismos más extensamente estudiados como posibles indicadores fecales, encontrándose en las heces humanas en menor concentración que los CF ( $10^6$  por gramo), y en las heces animales puede llegar a  $10^6$ - $10^7$  por gramo. En aguas residuales, los estreptococos fecales tienden a estar presentes en concentraciones 10-100 veces inferiores que los coliformes fecales, aunque parecen ser más persistentes (Sinton y col., 1998). Varias aproximaciones han sido consideradas para la utilización de los EF como indicadores: el estudio de la relación CF:EF (>4 en las heces humanas, <0,7 en las heces animales) y la identificación de especies de enterococos.

Las esporas de clostridios son extremadamente estables en el ambiente y resistente los procesos de tratamiento y desinfección. Dentro de este grupo, *Clostridium perfringens* es altamente específico de contaminación fecal, por esto se ha considerado como un buen

indicador de la posible presencia de virus y cistes u oocistes de protozoos en aguas tratadas (Grabow 1996).

Las bifidobacterias se encuentran en grandes cantidades en las heces humanas ( $10^{10}$  por gramo) y de algunos animales. Se han detectado en aguas contaminadas, aunque su potencial utilidad como microorganismo indicador ha sido poco estudiada (Sinton y col., 1998).

Varias especies de *Bacteroides* están presentes en las heces humanas en concentraciones 100 veces superiores a las de *E. coli*, y en bajas cantidades en las heces animales, lo que ha sugerido su potencial utilidad como indicador (Allsop y Stickler, 1985).

Una gran variedad de otros indicadores microbianos se han utilizado para estudiar la calidad sanitaria del agua potable, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella* spp., *Candida albicans* y endotoxinas (APHA, 1995; Grabow, 1996).

### 1.12.3. Indicadores víricos

La mayoría de los virus transmitidos por vía hídrica son excepcionalmente resistentes a la inactivación natural, a los procesos de tratamiento del agua y desinfección que eliminan o inactivan los patógenos más sensibles y los indicadores bacterianos, por lo que son más persistentes en el medio (Lucena y col., 1988; Girones y col., 1989a; Pirtle y Beran, 1991; Hurst, 1991; Nasser y col., 1993). Estos virus se excretan por periodos de tiempo cortos en cantidades que pueden llegar a  $10^{12}$  por gramo de heces (World Health Organization, 1979; Melnick, 1984).

Se han estudiado varios grupos de bacteriófagos de bacterias entéricas (colifagos somáticos, colifagos F-específicos, fagos de *Bacteroides fragilis*) y de virus de origen humano (enterovirus y adenovirus humanos) (IAWRPC, 1991; Puig y col., 1994; Pina y col., 1998c). Todos ellos presentan buenas posibilidades pero también inconvenientes para realizar su función como indicador.

Los colifagos somáticos son aquellos que se adsorben sobre los receptores situados en la pared bacteriana de cepas de *E. coli*. Constituyen un grupo de morfología heterogénea, que están presentes en las heces humanas y en la mayoría de las especies animales en concentraciones de  $<10-10^8$  UFC/g (IAWRPC, 1991). Son los más abundantes en aguas residuales donde se han encontrado valores de  $10^3-10^4$  UFC/ml. Excepcionalmente los colifagos somáticos pueden multiplicarse en aguas no contaminadas utilizando como huésped especies bacterianas indígenas. Desde el punto de vista metodológico son los más fáciles de

detectar y enumerar. Su persistencia en el medio es similar a la de los virus humanos, aunque son más sensibles a procesos de tratamiento de aguas (IAWRPC, 1991; Havelaar, 1993).

Los colifagos F-específicos de la familia *Inoviridae* (genoma de ADN monocatenario) y *Leviviridae* (genoma de ARN monocatenario) se adsorben específicamente sobre los pelos sexuales codificados por plásmidos del grupo F de incompatibilidad de la cepa huésped. Son poco frecuentes en las heces humanas y animales, aunque las concentraciones en aguas residuales pueden llegar a  $10^3$ – $10^4$  UFC/ml, lo que sugiere la posibilidad de que se multipliquen en ambientes que reciben un aporte directo de material fecal. Su persistencia en el medio y su resistencia a procesos de desinfección son comparables con las de los enterovirus y reovirus (IAWRPC, 1991; Havelaar, 1993).

Los fagos de *Bacteroides fragilis* se excretan en concentraciones de hasta  $10^8$  UFC/g en el 10% de la población (Tartera y Jofre, 1987), aunque se encuentran en bajas concentraciones en las aguas residuales ( $<1$ – $10^3$  UFC/ml). No se multiplican en el medio debido a la baja estabilidad de la bacteria huésped y a sus características anaerobias. Su resistencia a diferentes tratamientos y a la inactivación natural es superior a la de los otros grupos de bacteriófagos, similar a la de poliovirus (Jofre y col., 1986; IAWPRC, 1991; Jofre y col., 1995), e inferior que el virus de la hepatitis A (Abad y col., 1994), por lo que se han evaluado como un índice de contaminación fecal (IAWPRC, 1991; Lucena y col., 1996).

El recuento de enterovirus infecciosos sobre líneas celulares ha sido un parámetro de control considerado durante mucho tiempo, aún con las dificultades de trabajo que esta metodología implica. Los enterovirus no son excretados de forma regular por la población, y en ausencia de brotes la mayoría de los enterovirus presentes en el ambiente eran poliovirus de origen vacunal. En la actualidad, en los países desarrollados la vacuna oral contra la poliomielitis se administra a edades muy tempranas. Los virus que se multiplican en el intestino se excretan en las heces y se eliminan en los pañales que son tratados como residuos sólidos, lo que limita la difusión al medio acuático. Las dosis vacunales posteriores producen una baja tasa de multiplicación en el intestino. Por este motivo en los países desarrollados ha ido disminuyendo la prevalencia de poliovirus vacunales en el medio.

Los adenovirus humanos se excretan en grandes cantidades a través de las heces y orina de individuos infectados, a veces sin que presenten síntomas de enfermedad. Muchos serotipos son difíciles de cultivar sobre líneas celulares, por lo que durante mucho tiempo pueden haber estado infravalorados en muestras ambientales. El desarrollo de técnicas de detección molecular han permitido documentar una mayor prevalencia de adenovirus

humanos en aguas residuales, naturales y moluscos bivalvos, en comparación con los enterovirus (Puig y col., 1994; Girones y col., 1995; Pina y col., 1998c), aunque se requieren más estudios para dilucidar la posible utilidad del test de detección molecular de adenovirus como modelo.

### **1.13. OBJETIVOS GENERALES**

Los objetivos principales planteados son los siguientes:

1. Desarrollar una metodología de elevada sensibilidad y especificidad basada en técnicas moleculares para la detección de virus entéricos de origen humano, concretamente Adenovirus humanos, Enterovirus, virus de la Hepatitis A y virus de la Hepatitis E.
2. Definir un método de recuperación de partículas víricas a partir de muestras de aguas residuales y ambientales, y moluscos bivalvos. Adaptar el método seleccionado con la aplicación de técnicas de ultrafiltración para facilitar su uso en laboratorios de Salud Pública.
3. Aplicar la metodología desarrollada para evaluar los niveles de contaminación vírica presente en el medio en diferentes periodos del año.
4. Evaluar la utilización del test de detección molecular de adenovirus humanos como índice de contaminación vírica de origen humano.
5. Estudiar la diversidad genética del virus de la Hepatitis A circulante en la población, a partir de aislados ambientales y clínicos.
6. Evaluar la presencia del virus de la Hepatitis E en una zona no endémica, y estudiar sus características genéticas.
7. Analizar la capacidad infecciosa de los VHE detectados en el medio acuático, y la estabilidad de la partícula vírica.
8. Evaluar la posible existencia de un reservorio animal del virus de la Hepatitis E en nuestro país.

*Capítulo 2.*

*La contaminación viral de las aguas  
superficiales y residuales*

---



## **2.1. INTRODUCCIÓN**

El hombre excreta en grandes cantidades más de un centenar de virus diferentes a través de las heces y la orina, que llegan a las aguas residuales. Su gran estabilidad hace que en muchas ocasiones los procesos de depuración actualmente aplicados no consigan eliminarlos completamente, pudiendo así dispersarse en el medio. La transmisión se produce a través de la ingestión de aguas contaminadas con aguas residuales, moluscos bivalvos o otros alimentos contaminados.

La contaminación vírica del medio acuático ha sido extensamente estudiada al ser un tema de importante repercusión sanitaria. Esto implica en un primer momento el desarrollo y la aplicación de métodos de concentración de virus que en ocasiones no son lo suficientemente eficaces. Además, los mecanismos utilizados para su detección han estado basados en la multiplicación sobre líneas celulares, lo que supone una baja sensibilidad, lentitud en el diagnóstico, y un coste elevado. Por otro lado, puede resultar imposible conseguir la multiplicación de muchos virus *in vitro*, o lo hacen de forma lenta y poco eficiente, o bien no producen efecto citopático visible. La utilización de varias líneas celulares o el desarrollo de técnicas que permitan detectar cada uno de los virus de interés de forma individualizada no es factible económicamente. Por este motivo se ha planteado la utilización de indicadores que proporcionen información sobre la posible presencia de microorganismos patógenos de forma indirecta. Se ha demostrado que los indicadores bacterianos clásicos no reflejan la presencia de patógenos víricos, ya que los virus son más resistentes a los procesos de inactivación y tratamientos de depuración del agua (Bosch y col., 1986; Wyer y col., 1995). Por este motivo, el control de la calidad microbiológica del agua debería incluir rutinariamente análisis de parámetros virológicos.

Actualmente el único parámetro vírico reconocido por la normativa Europea sobre la calidad del agua es la presencia de enterovirus infecciosos aislados sobre líneas celulares (Directiva 80/778/CEE para aguas de consumo, Directiva 76/160/CEE para aguas de baño). Varios grupos de fagos de bacterias entéricas han sido propuestos como posibles indicadores de partículas víricas infecciosas, entre ellos los fagos de *Bacteroides fragilis* (Lucena y col., 1996; IAWPRC, 1991).

La complejidad de análisis relacionados con la detección de los virus presentes en el agua pasa por una primera etapa de recuperación de pequeñas cantidades de virus a partir de grandes volúmenes de agua. Dada la heterogeneidad de los diferentes tipos de agua (concentración de materia orgánica, sólidos en suspensión, salinidad, pH), no existe una metodología universal y, además, el rendimiento de cada método varía según los virus que se quieran concentrar. Este es sin duda uno de los puntos clave que condiciona en gran medida el éxito de la metodología aplicada para la detección, ya que en ocasiones estos procesos consiguen a la vez recuperar sustancias inhibitoras de diversa naturaleza (ácidos húmicos y fúlvicos, contaminantes químicos, fluidos biológicos, detergentes, polisacáridos, etc.) que interfieren en los subsiguientes procesos de detección (Wilson, 1997).

En los últimos años se han producido importantes avances con el desarrollo de las técnicas moleculares. Esta metodología proporciona una mayor sensibilidad y especificidad, permitiendo así una identificación directa de los virus de forma rápida. Estas técnicas han sido utilizadas con éxito en numerosos estudios ambientales (Girones y col., 1993; Puig y col., 1994; Girones y col., 1995; Pina y col., 1998c; Vantarakis y Papapetropoulou, 1998 y 1999; Chapron y col., 2000), aunque requieren la aplicación de normas de trabajo estrictas que deben ser practicadas por personal altamente especializado para que los resultados sean del todo fiables.

La contaminación virológica del medio acuático en el área de Barcelona ha sido evaluada por diferentes técnicas: determinación de la presencia de enterovirus infecciosos (Bosch y col., 1986; Lucena y col., 1988), evaluación de la presencia de virus entéricos de origen humano por técnicas de amplificación molecular (Pina y col., 1998c), detección de fagos de *Bact. fragilis* (Jofre y col., 1986; Puig y col., 2000), tipificación de bacteriófagos F-específicos por hibridación (Schaper y Jofre, 2000). El área metropolitana de Barcelona representa una población de aproximadamente 2.000.000 de personas. Los ríos Besós y Llobregat, localizados al norte y al sur de Barcelona respectivamente, reciben una gran cantidad de aguas residuales urbanas e industriales procedentes de los núcleos urbanos colindantes. Ambos ríos, de características típicamente mediterráneas, presentan un bajo caudal que minimiza el efecto de dilución, siendo los principales causantes de la contaminación fecal y química de las aguas del litoral de Barcelona, utilizadas extensivamente para uso recreativo (Bosch y col., 1986; Lucena y col., 1988). El río Llobregat, además, junto con el Ter sirven de fuentes de abastecimiento de agua a una amplia



zona de Cataluña tras el tratamiento de sus aguas en plantas potabilizadoras (ETAP). Es por esto importante el control virológico tanto del agua sin tratar como del agua potabilizada.

En este capítulo se describe el desarrollo y aplicación de una metodología que permite estudiar la contaminación vírica del medio acuático. Las técnicas descritas se han aplicado al control virológico de aguas residuales, aguas del río Llobregat y Ter y agua del litoral del Barcelonés durante el período comprendido entre 1994 y 1999. Los objetivos planteados en este estudio fueron:

- Describir una metodología sensible y específica basada en técnicas de amplificación molecular de ácidos nucleicos para la detección de virus entéricos de origen humano que son excretados al ambiente.
- Aplicar esta metodología para estudiar la contaminación vírica en muestras de agua de diversos orígenes (aguas residuales, aguas de río y de mar).
- Estandarizar el método de detección para facilitar que las técnicas desarrolladas puedan ser aplicadas en laboratorios de Salud Pública.
- Estudiar la distribución de los adenovirus humanos, enterovirus y virus de la hepatitis A en las aguas estudiadas. Esto permitiría valorar el riesgo sanitario que representan estos virus para la población.
- Comparar los datos obtenidos sobre virus humanos con la presencia de otros indicadores de contaminación fecal propuestos (coliformes fecales, colifagos somáticos, colifagos F-específicos, bacteriófagos de *Bact. fragilis* y enterovirus infecciosos).
- Evaluar la posibilidad de la utilización del test de detección de adenovirus humanos por PCR como índice molecular de la presencia de contaminación viral de origen humano en el ambiente.
- Identificar una posible variación estacional y/o anual de la contaminación viral en nuestra región.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. LÍNEAS CELULARES Y CEPAS VÍRICAS

Se utilizaron las líneas celulares HEp-2, A549, BGM y FRhK-4, que permitieron obtener los cultivos de Adenovirus 2 y 12 (Ad2 y Ad12), Poliovirus tipo 1 y VHA (cepa pHM-175) utilizados como suspensiones control para posteriores experimentos (Tabla 2.1).

**TABLA 2.1.**  
**Virus animales y líneas celulares sobre las que se han obtenido los estocs de laboratorio**

| Virus                   | Cepa   | Línea celular |
|-------------------------|--|---------------|
| Adenovirus              | Adenovirus tipo 2 (Ad2)<br>Adenovirus tipo 12 (Ad12) | HEp-2, A549   |
| Enterovirus             | Poliovirus tipo 1 LSc 2ab                            | BGM           |
| Virus de la hepatitis A | pHM-175  | FRhK-4        |

#### 2.2.1.1. Descripción de las diferentes líneas celulares

La línea celular HEp-2, establecida por Moore y col. en 1952 (Moore y col., 1955), de morfología epitelial, proviene de un carcinoma epidérmico de laringe humano. Se ha utilizado para la multiplicación de adenovirus humanos.

La línea celular A549 iniciada en 1972 (Giard y col., 1973) a partir de un explante de tejido canceroso pulmonar humano, se utilizó para la propagación de adenovirus humanos.

La línea celular BGM deriva de células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Presenta una morfología fibroblástica, y permiten la multiplicación de Poliovirus tipo 1, 2 y 3, Echovirus tipo 3, 6, 7, 9, 11, 12 y 27, Coxsackievirus tipo A, B1, B2 y B3,

Reovirus tipo 1 y mixoma. Es, además, la línea comúnmente utilizada para la titulación de enterovirus en muestras ambientales (Schwartzbrod, 1991).

La línea celular FRhK-4 es una línea epitelioide y continua derivada de células embrionarias de riñón mono rhesus (*Macaca mulatta*), y permiten la multiplicación del virus de la hepatitis A de la cepa pHM-175 (Cromeans y col., 1987; Funkhouser y col., 1994).

### **2.2.1.2. Mantenimiento de las líneas celulares**

Las líneas celulares fueron propagadas en medio mínimo de Eagle (MEM) con sales de Earle, suplementado con 1,5% de bicarbonato sódico, 2 mM de L-glutamina, 15 mM de tampón HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperacín-N'-2-etanosulfónico), aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/l de estreptomicina y suero fetal bovino (FBS) (medio de crecimiento) (5% de FBS para las células HEp-2, A549 y BGM; 15% para las células FRhK-4), utilizando frascos de cultivo celular de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> o 175 cm<sup>2</sup> de superficie según convenía. Las células se incubaban a 37°C en reposo hasta llegar a formar una monocapa confluyente. Una vez llegado a este estadio, en el caso de las células BGM y FRhK-4 que no iban a ser inmediatamente subcultivadas ni infectadas, el medio de crecimiento se sustituía por medio de mantenimiento con un 1% o un 2% de FBS respectivamente, y se mantenían a 33°C.

El subcultivo de las diferentes líneas celulares con la finalidad de obtener una mayor superficie de células confluentes, se hizo básicamente siguiendo el mismo protocolo para todas ellas (Freshney, 1987). Las células se subcultivaban cada 7-10 días siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- Decantar del medio de crecimiento.
- Lavar con 3-4 ml de PBS pH 7,3.
- Decantar del PBS.
- Dispersar las células por adición de 2-3 ml de una solución de 0,25% tripsina - 0,02% EDTA.
- Eliminar el exceso de tripsina una vez observado su efecto sobre las células. En el caso de las células FRhK-4 se esperaba a que el proceso de desagregación estuviera más avanzado y no se descartaba la tripsina.
- Añadir 5-10 ml del medio de crecimiento correspondiente.

- Homogeneizar la suspensión celular.
- Repartir en frascos de tamaño apropiado. Habitualmente se hicieron pases 1:3.
- Añadir un volumen de medio de cultivo apropiado al tamaño de frasco con el que se está trabajando.
- Incubar a 37°C hasta obtener una monocapa de células confluentes.

### **2.2.1.3. Cepas víricas**

Para obtener suspensiones víricas que se utilizaron como muestras control en experimentos posteriores, se siguió la metodología que se detalla a continuación.

#### ***2.2.1.3.1. Obtención de una suspensión de Ad2 o Ad12***

Para la obtención de una suspensión de Ad2 o Ad12 se siguió el siguiente método:

- Se partió de frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> con una monocapa de células confluentes de la línea HEP-2 o A549, en medio de crecimiento a 37°C.
- Retirar el medio de crecimiento y lavar con 5-10 ml de PBS.
- Inocular con 50 µl de una suspensión de Ad2 o Ad12 y 400 µl de medio de infección (MEM suplementado con 1,5% de bicarbonato sódico, 2 mM de L-glutamina, 15 mM de tampón HEPES, aminoácidos no esenciales, 200 U/ml de penicilina, 200 µg/l de estreptomomicina y 2% de FBS).
- Incubar a 37°C durante 60 min.
- Acabado el período de adsorción añadir 10 ml de medio de infección.
- Incubar a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo sustituir el medio de infección por medio fresco.
- Incubar a 37°C hasta que el efecto citopático sea visible (aproximadamente 10 días post-infección).
- Recuperar las células infectadas por centrifugación a 12.000 ×g durante 10 min a 4°C (centrifuga Beckman J2-21, rotor JA20)
- Resuspender el sedimento en 4 ml de PBS y conservar a -80°C.

### **2.2.1.3.2. Obtención de una suspensión de Poliovirus tipo 1 (LSc 2ab)**

La cepa de Poliovirus tipo 1 LSc 2ab es una cepa atenuada utilizada como vacuna oral para prevenir la poliomielitis, que derivada de la cepa virulenta Mahoney [PV1(M)]. Crece sobre la línea celular BGM produciendo la lisis en un plazo de 3-4 días. Para la obtención de una suspensión de Poliovirus tipo 1 LSc 2ab se siguió el siguiente protocolo:

- Se partió de frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> con una monocapa de células confluentes de la línea BGM, en medio de crecimiento a 37°C.
- Retirar el medio de crecimiento y lavar con 5-10 ml de PBS.
- Inocular con 1 ml de una suspensión viral (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> UFC/ml).
- Incubar a 37°C durante 60 min.
- Acabado el período de adsorción añadir 30 ml de medio de infección.
- Incubar a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo sustituir el medio de cultivo por medio de mantenimiento fresco.
- Incubar a 37°C hasta que el efecto citopático sea visible (entre 3-4 días post-infección), y prolongar hasta que todas las células hayan sido lisadas.
- Una vez aparecido el efecto citopático, someter los frascos a 3 ciclos de congelación a -80°C y descongelación para liberar los virus asociados a las células. La suspensión obtenida se repartió en crioviales y se conservó a -80°C.

### **2.2.1.3.3. Obtención de una suspensión de VHA pHM-175**

La cepa pHM-175 del virus de la hepatitis A es una cepa citopática derivada de la HM-175 (no citopática), que crece en la línea celular FRhK-4 produciendo la lisis en un plazo de 5-6 días (Cromeans y col., 1987). Para la obtención de una suspensión del VHA pHM-175 se siguió el siguiente método:

- Se partió de frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> con una monocapa de células confluentes de la línea FRhK-4, en medio de crecimiento con 15% de FBS, a 37°C.
- Retirar el medio de crecimiento y lavar con 5-10 ml de PBS.
- Inocular con 1 ml de una suspensión viral.
- Incubar a 37°C durante 60 min.

- Acabado el período de adsorción añadir 30 ml de medio de infección.
- Incubar a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo sustituir el medio de cultivo por medio fresco.
- Incubar a 37°C hasta que el efecto citopático sea visible (aproximadamente 9 días).
- Someter los frascos a 3 ciclos de congelación a –80°C y descongelación para liberar los virus asociados a las células. La suspensión obtenida se repartió en crioviales y se conservó a –80°C.

## ***2.2.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS***

Para estudiar la contaminación virológica de las aguas superficiales del área de Barcelona, se tomaron muestras de diversos orígenes con diferente grado de contaminación fecal. El procesamiento y la metodología utilizada para el análisis de los diferentes parámetros microbiológicos y virológicos en cada tipo de muestra se resumen en la Figura 2.1.

### **2.2.2.1. Muestras de agua residual urbana**

La planta depuradora de San Adrián de Besós, construida y puesta en servicio en el año 1979, recibe un caudal de 670.000 m<sup>3</sup>/día provenientes del área urbana de Barcelona, que es representativo de una población de aproximadamente 1.800.000 habitantes (núcleos urbanos de Barcelona, San Adrián de Besós, Badalona, Santa Coloma de Gramanet).

Se tomaron 41 muestras provenientes de la entrada de la depuradora, del punto situado después de las rejillas de desbaste. Cada muestra se recogió en un contenedor de polietileno de 500 o 1000 ml estéril, y se conservó a 4°C por un tiempo no superior a 8 h, hasta que eran procesadas. Los niveles de contaminación microbiológica característicos de este tipo de agua se describen en la Tabla 2.2.

Se tomaron 3 muestras de la salida de la depuradora, una vez sometidas al tratamiento. Igualmente se recogieron en contenedores de polietileno de 500 o 1000 ml, y se conservaron a 4°C por un tiempo no superior a 8 h, hasta que eran procesadas. Los niveles de contaminación microbiológica estimados de este tipo de muestra se describen en la Tabla 2.2.

### 2.2.2.2. Muestras de agua de río

Se analizaron 56 muestras de agua del río Llobregat tomadas a su paso por el municipio de Abrera, y 10 muestras de agua del río Ter recogidas a la altura de la localidad de Cardedeu. Debido al gran volumen de agua necesario para los análisis, se realizó una concentración primaria sobre el terreno, según el método descrito en el apartado 2.2.3.2. Los niveles coliformes y bacteriófagos característicos de este tipo de muestras se describen en la Tabla 2.2.

### 2.2.2.3. Muestras de agua de mar

Se analizaron 23 muestras de agua de mar tomadas en diferentes puntos a lo largo de la línea de costa de Barcelona: 14 muestras de 50 l que se concentraron sobre el terreno por el mismo método que las aguas de río (apartado 2.2.3.2.), y 9 muestras de 500 ml que se recogieron en contenedores de polietileno estériles y se conservaron a 4°C por un tiempo no superior a 8 h, hasta que eran procesadas. Los niveles coliformes y bacteriófagos estimados en agua de mar se describen en la Tabla 2.2.

**TABLA 2.2.**  
**Parámetros microbiológicos característicos de las muestras de agua estudiadas**

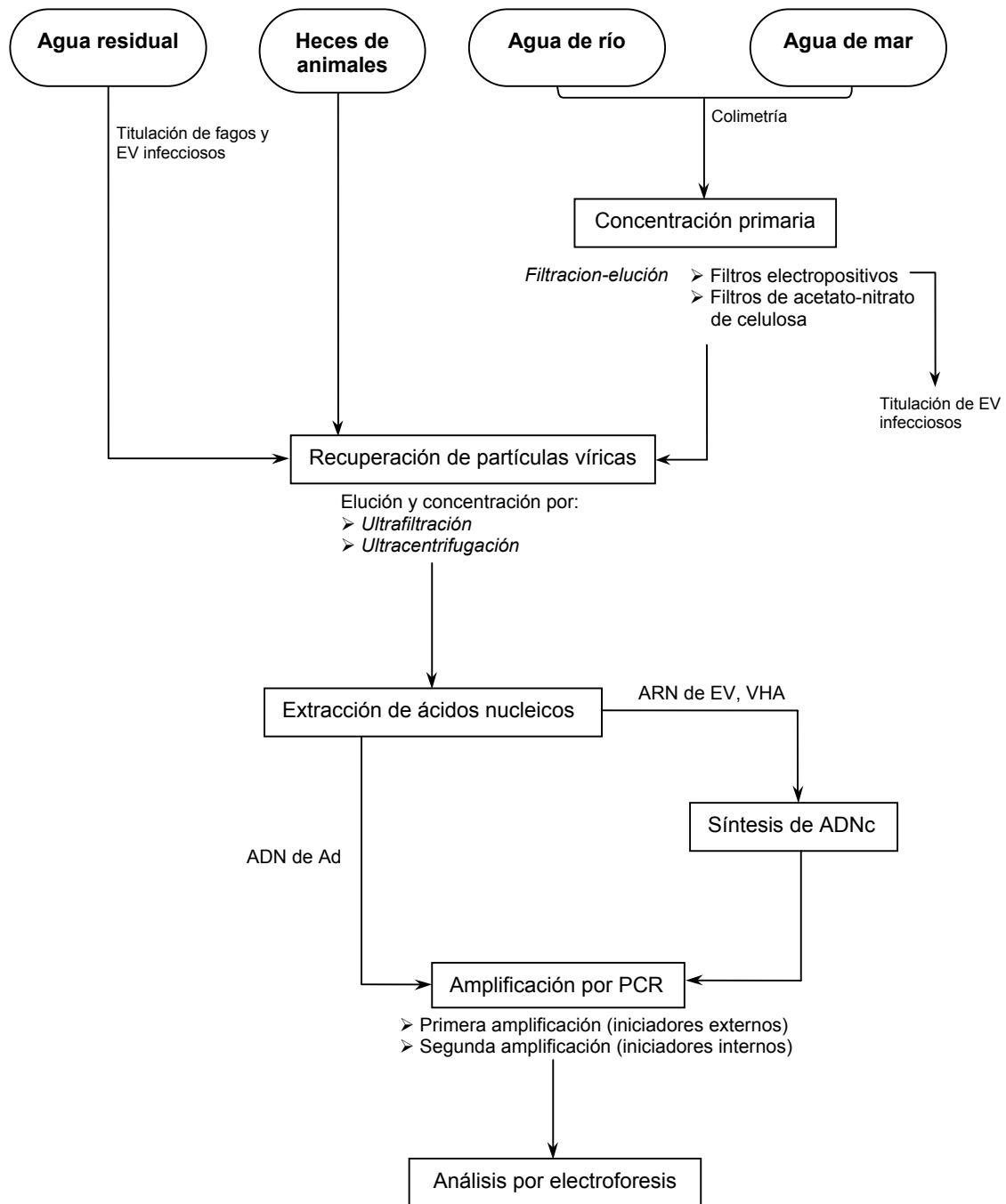
| Muestras                          |                          | Bacteriología<br>(ufc/100ml) |                        | Bacteriófagos<br>(UFC/100ml) |                                   |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|                                   |                          | Coliformes<br>fecales        | Colifagos<br>somáticos | Colifagos<br>F-específicos   | Fagos de<br><i>Bact. fragilis</i> |
| Agua residual urbana <sup>a</sup> | entrada                  | $10^6 - 10^7$                | $10^5 - 10^6$          | $10^3 - 10^5$                | $10^2 - 10^3$                     |
|                                   | salida                   | $10^4 - 10^7$                | $10^3 - 10^5$          | $10^1 - 10^5$                | $10 - 10^3$                       |
| Agua de río                       | Llobregat <sup>a,b</sup> | $10^2 - 10^5$                | $10^3 - 10^5$          | $10^2 - 10^5$                | $<10 - 10^3$                      |
|                                   | Ter <sup>c</sup>         | $<10$                        | $<10 - 10^2$           | $<10 - 10^2$                 | $<10 - 10^2$                      |
| Agua de mar <sup>d</sup>          |                          | $10^1 - 10^4$                | $10 - 10^3$            | $10 - 10^3$                  | $<10 - 10^3$                      |

<sup>a</sup> Lasobras, 1997

<sup>b</sup> Vidal y col., 1997

<sup>c</sup> Jofre y col., 1995

<sup>d</sup> Jofre y col., 1986; Tartera y Jofre, 1987



**Figura 2.1.** Análisis de muestras de agua ambientales, residuales y heces de animales.



## **2.2.2.4. Muestras de origen animal**

### ***2.2.2.4.1. Muestras de agua residual de mataderos de ganado***

Para identificar el origen humano o animal de los virus detectados se tomaron 17 muestras de aguas residuales de diferentes mataderos: *Macoba* (cerdos), *Mafrica* (corderos, terneras y cerdos), *E. Gremiel* (cabritos y terneras), *E. Pallejà* (corderos y terneras) y *Freisa* (pollos). Las muestras contenían orina, heces y el contenido intestinal de los animales diluido en agua. Se recogieron en botellas de vidrio estériles y se conservaron 4°C por un tiempo no superior a 8 h, hasta que eran procesadas. Los niveles medios de contaminación bacteriana se estimaron en  $10^5$  ufc de coliformes fecales/100 ml (A. Puig, 1998). Se conocía que ocho de las muestras contenían contaminación fecal de origen humano, pues se habían mezclado con las aguas residuales provenientes de los sanitarios del matadero.

### ***2.2.2.4.2. Muestras de heces de animales de granja***

Se tomaron 12 muestras de heces de diferentes animales de granjas: vacas, gallinas, pollos, patos, cerdos, corderos. Se recogieron en contenedores estériles y se conservaron a 4°C por un tiempo no superior a 8 h, hasta que eran procesadas. Cada muestra era una mezcla de las heces de 5-8 animales en el caso de las vacas, 10-12 corderos o cerdos, y más de 20 gallinas, pollos o patos. Los niveles de contaminación bacteriana se estimaron en  $10^4$ - $10^5$  ufc de coliformes fecales/100 ml (A. Puig, 1998).

## **2.2.3. RECUPERACIÓN DE PARTÍCULAS VÍRICAS**

En las muestras de agua ambientales, la cantidad de virus suele ser baja, lo que supone tener que concentrar las partículas víricas presentes en estas muestras en un volumen pequeño antes de proceder a la detección de los virus. A la hora de elegir un método de concentración se tuvo en cuenta el grado de contaminación que presentaba el tipo de agua a analizar.

## **2.2.3.1. Recuperación de partículas víricas a partir de agua residual urbana**

### ***2.2.3.1.1. Recuperación de partículas víricas por ultracentrifugación***

El método de recuperación de partículas víricas se seleccionó a partir de estudios previos, en que se habían ensayado varios métodos de tratamiento de la muestra (Girones y col., 1993; Puig y col., 1994). El método que demostró una mayor eficiencia está basado en la recuperación de las partículas víricas por ultracentrifugación, elución y posterior concentración.

Se centrifugaron 40 ml de agua residual en una ultracentrifuga Beckman L8-60M (rotor 70.1 Ti) a  $229.600 \times g$  durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$  para recuperar el material en suspensión junto con los virus. Las partículas víricas retenidas en el sedimento se eluyeron con 4 ml de tampón glicina 0,25 M pH 9,5 en hielo durante 30 min. Tras la adición de 4 ml de PBS  $2\times$ , los sólidos en suspensión se separaron por centrifugación a  $3000 \times g$  (Medifuge) durante 20 min. Las partículas víricas contenidas en el sobrenadante se recuperaron por ultracentrifugación a  $229.600 \times g$  durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , y fueron finalmente resuspendidas en 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Esto supone un grado de concentración de unas 400 veces.

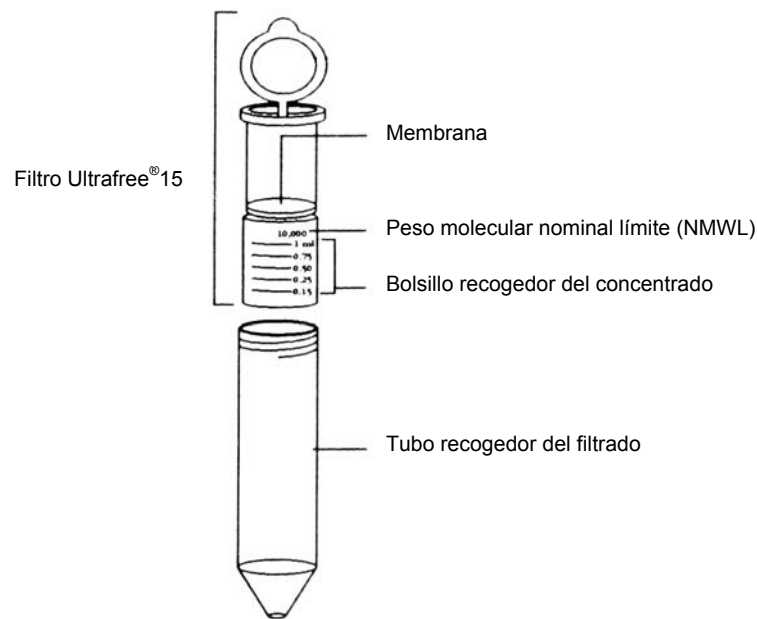
Este método fue adaptado para su aplicación en la concentración de virus a partir de los diversos tipos de muestras analizadas en el presente trabajo.

### ***2.2.3.1.2. Recuperación de partículas víricas por ultrafiltración***

Se utilizaron unidades de ultrafiltración por centrifugación Ultrafree<sup>®</sup>-15 (Millipore) (Figura 2.2.) que contienen una membrana Biomax<sup>™</sup> de alto caudal de poliétersulfona de peso molecular nominal límite (NMWL) de 100.000 Da. Esta membrana retiene las partículas  $>100.000$  Da (p.ej. virus) y permite el paso de partículas más pequeñas. Se siguió el protocolo que se describe a continuación:

- Disponer la unidad de filtración en un tubo de 50 ml estéril.
- Pre-lavar el filtro: añadir 10 ml de agua bidestilada estéril en la unidad de filtración, y centrifugar en una centrifuga Beckman TJ-6 (rotor basculante TH4) a  $2000 \times g$  durante 10 min.

- Descartar el filtrado.
- Repartir 45 ml de agua residual en tres unidades de filtración pre-lavadas (15 ml por unidad).
- Centrifugar en una centrifuga Beckman TJ-6 (rotor basculante TH4) a 2000 ×g durante 1 h a temperatura ambiente. El tiempo de filtración depende de la cantidad de material en suspensión presente en la muestra. El volumen de concentrado dentro de la unidad debe reducirse a aproximadamente 100 µl. En el caso de que quede más volumen, se aconseja una centrifugación adicional hasta que el volumen de concentrado sea el indicado.
- Descartar el filtrado.
- Eluir el concentrado obtenido a partir de 45 ml de agua residual con 4 ml de tampón glicina 0,25 M pH 9,5. Intentar recuperar todo el material retenido en la unidad y sobre las membranas. Se recomienda la utilización de vórtex.
- Pasar el eluido a un tubo de plástico estéril e incubar 30 min en hielo, agitando cada 10 min.
- Añadir 4 ml de PBS 2×.
- Eliminar el material particulado centrifugando 30 min a 3000 ×g a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante y poner en una nueva unidad de filtración pre-lavada.
- Centrifugar en una centrifuga Beckman TJ-6 (rotor basculante TH4) a 2000 ×g durante 1 h a temperatura ambiente. El volumen de concentrado final dentro de la unidad debe ser de 110 µl. En el caso de que quede más volumen, se aconseja una centrifugación adicional hasta que el volumen de concentrado sea el indicado. En el caso de que el volumen del concentrado recuperado sea menor, se debe corregir con PBS.
- Recuperar el concentrado retenido en la unidad de filtración intentando recoger el material adsorbido sobre la membrana agitando con vórtex. Después de esta agitación conviene centrifugar 2 min (Beckman TJ-6, rotor basculante TH4) a 2000 ×g, y recoger el volumen de concentrado con ayuda de una pipeta *Pasteur*.
- Conservar el concentrado a –80°C.



**Figura 2.2.** Esquema de la unidad de filtración Ultrafree®-15 (Millipore) utilizada para la concentración de partículas víricas por ultrafiltración.

### ***2.2.3.1.3. Evaluación de la eficiencia del método de recuperación de partículas víricas***

La eficiencia del método de recuperación de partículas víricas por ultracentrifugación o ultrafiltración se evaluó a partir de muestras de agua residual que se procesaron paralelamente por los dos métodos descritos en los apartados 2.2.3.1.1. y 2.2.3.1.2. Se comparó el límite de detección de adenovirus humanos y enterovirus naturales por PCR anidada.

Al mismo tiempo, se añadió Poliovirus tipo 1 (estoc  $3 \times 10^7$  UFC/ml) en muestras de agua residual que previamente habían dado un resultado negativo para EV, a una concentración final de  $6,6 \times 10^5$  UFC/ml. Las muestras dopadas se procesaron paralelamente por los dos métodos de concentración descritos y se evaluó la eficiencia del proceso comparando el límite de detección por PCR.

### **2.2.3.2. Recuperación de partículas víricas a partir de agua de río**

La baja concentración de virus en este tipo de muestra hace que sea necesario partir de un mayor volumen de agua. Debido a esto se realizó una concentración primaria por el método de filtración-elución sobre cartuchos filtrantes electropositivos (tipo Zeta-plus, CUNO div.) de acuerdo con el método descrito por Sobsey y Jones en 1979, seguida de una concentración secundaria por ultracentrifugación según lo descrito para aguas residuales.

En las muestras tomadas del río Llobregat, se concentraron volúmenes comprendidos entre 50 y 250 l, dependiendo de la turbidez. En las muestras del río Ter, el volumen de agua filtrada fue del orden de 250 l. En ambos casos la concentración se hizo directamente sobre el terreno a un caudal de 2-3 litros por minuto. Tras la filtración, los cartuchos se transportaron inmediatamente al laboratorio inmersos en una solución de TSB y se mantuvieron en dicho medio hasta su procesamiento. Los virus adsorbidos sobre el filtro se eluyeron con 1000 ml de tampón glicina 0,25 M pH 9,5–10,5. Posteriormente se añadió un 3% de extracto de carne, y se ajustó el pH a 3,5–4. Las muestras se mantuvieron en agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente para permitir la concentración de las partículas víricas por floculación orgánica. Seguidamente se recuperó el material floculado por centrifugación a 8500  $\times$ g durante 20 min (Beckman J2-21), el sedimento se resuspendió en 50 ml de PBS y se neutralizó el pH.

La descontaminación y detoxificación del concentrado final se realizó con cloroformo al 30% v/v, agitación durante 30 min, y separación de las fases por centrifugación a 1500  $\times$ g o decantación. El cloroformo residual se eliminó por aireación en condiciones asépticas. Se reservaron 20 ml de este concentrado para la titulación de enterovirus por cultivo celular sobre células BGM. Los 20 ml restantes se sometieron a una concentración secundaria siguiendo el protocolo descrito anteriormente para aguas residuales (apartado 2.2.3.1.1). Según esta metodología, 100  $\mu$ l de concentrado de partículas víricas representan 20-100 l de agua del río Llobregat, o 100 l de agua del río Ter en el punto de captación, lo que supone un grado de concentración de aproximadamente  $10^6$ - $10^7$  veces.

### **2.2.3.3. Recuperación de partículas víricas a partir de agua de mar**

Catorce muestras de agua de mar se concentraron utilizando filtros electropositivos de igual manera que las aguas de río, seguido de una concentración secundaria por ultracentrifugación.

Nueve muestras adicionales se sometieron a una concentración primaria utilizando una modificación del método descrito por Sinton y col. en 1996, aplicado a la recuperación de bacteriófagos (Sinton y col., 1996). Se filtraron 500 ml de agua de mar a través de una membrana de acetato-nitrato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore). Los virus retenidos sobre el filtro por atracción electrostática, se eluyeron con 2 ml de tampón glicina pH 9,5 en agitación durante 30 min. Tras añadir 2 ml de PBS 2 $\times$ , los sólidos en suspensión se eliminaron por centrifugación a 3000  $\times g$  (Medifuge) durante 20 min. Las partículas víricas contenidas en el sobrenadante se recuperaron por ultracentrifugación a 229.600  $\times g$  durante 1 h a 4°C, y fueron finalmente resuspendidas en 100  $\mu\text{l}$  de PBS. El concentrado de partículas víricas se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Esto supone una concentración de unas 5000 veces.

### **2.2.3.4. Recuperación de partículas víricas a partir de muestras de origen animal**

Las partículas víricas contenidas en el agua residual de mataderos se recuperaron por ultracentrifugación según se indica en el apartado 2.2.3.1.1.

A partir de 20 g de heces se realizó una suspensión al 10% en PBS pH 7,3, y se dejaba separar el material particulado por gravedad. A partir de esta suspensión se recuperaban las partículas víricas por ultracentrifugación (apartado 2.2.3.1.1.).

## **2.2.4. PARÁMETROS DE CONTAMINACIÓN FECAL COMPLEMENTARIOS ANALIZADOS EN MUESTRAS DE AGUA AMBIENTALES**

En las muestras de agua ambientales en las que se ha estudiado la contaminación vírica por técnicas moleculares se analizaron, además, otros parámetros clásicos de control microbiológico:

- Enterovirus infecciosos.
- Colifagos somáticos y F-específicos.
- Bacteriófagos de *Bact. fragilis*.
- Coliformes fecales.

Estos análisis fueron realizados por Jordi Dellundé, Javier Méndez, Laura Mocé y Núria Queralt, y amablemente cedidos para ser utilizados en este estudio.

### **2.2.4.1. Cuantificación de enterovirus infecciosos**

La determinación de la presencia de enterovirus infecciosos se realizó por inoculación de las muestras de agua residual y agua de río, previamente descontaminadas con cloroformo, sobre células BGM. Se prepararon placas de cultivo de 56,7 cm<sup>2</sup> (92×21 mm) con células BGM, que se incubaron en medio de crecimiento a 37°C en una atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>, hasta obtener una monocapa confluyente. Se eliminó el medio de crecimiento y se inocularon 20 ml de concentrado de agua de río o agua residual (1 ml/placa). Las placas se incubaron 60 min a 37°C en atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adsorción vírica. Pasado este tiempo se eliminó el inóculo y se cubrieron las células con medio MEM suplementado con 1,5% de bicarbonato sódico, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/l de estreptomina y 0,7% de agar purificado. Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C en atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo se retiró el medio, se añadió una solución colorante fijadora y se realizó el recuento de UFC.

## 2.2.4.2. Cuantificación de colifagos somáticos y F-específicos

La cuantificación de bacteriófagos en muestras de agua entre 1994–1996 se realizó siguiendo el método 1. En las muestras recogidas entre 1997–1999 los análisis se realizaron siguiendo el método 2.

### 2.2.4.2.1. Método 1

El recuento de colifagos somáticos y F-específicos presentes en las muestras se hizo por el método de la doble capa de agar (Adams, 1959). Se obtuvieron cultivos de *Escherichia coli* de la cepa CN13 (ATCC 700609) en caldo triptona suplementado con 100 mg/l de ácido nalidíxico (Armon y Kott, 1993), y de la cepa HS (pF+ amp<sup>r</sup>) (Debartolomeis y Cabelli, 1991) en caldo triptona suplementado con 15 mg/l de estreptomicina y ampicilina, que se incubaron a 37°C durante 18-22 h. A partir de estos cultivos se realizaba una dilución 1:10 en medio fresco y se incubaba a 37°C hasta llegar a la fase exponencial.

Las muestras de agua residual se descontaminaron por filtración a través de membranas de difluoruro de polivinilideno (baja adsorción proteica) de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore) (Tartera y col., 1992), y se realizaron las diluciones adecuadas en tampón para fagos (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 85 mM NaCl – 1 mM MgSO<sub>4</sub> – 0,1 mM CaCl). Se prepararon alícuotas de 2,5 ml de medio triptona–0,7% agar suplementado con los antibióticos apropiados, en tubos de plástico que se mantenían a 45°C, y se inoculaban 0,5 ml de un cultivo en fase exponencial (*E. coli* CN13 para la titulación de colifagos somáticos o *E. coli* HS para el recuento de colifagos F-específicos), y 1 ml de la muestra a analizar. Una vez homogeneizado se dispensaba sobre placas de Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio triptona–1,5% agar con los antibióticos apropiados. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-22 h y se realizó el recuento de las calvas de lisis (UFC). El título se obtuvo por media aritmética de los recuentos de 2 o más placas correspondientes a un volumen de muestra o de una dilución que contenía menos de 300 UFC. Los resultados se expresaron en UFC/ml.



#### **2.2.4.2.2. Método 2**

Alternativamente la titulación de colifagos somáticos se hizo según la normativa ISO/CD 10705-2 (Anónimo, 1997), utilizando las cepas *E. coli* WG5 (ATCC 700078) (Grabow y col., 1986), y el recuento de colifagos F-específicos según la normativa ISO 10705-1 (Anónimo, 1996) utilizando la cepa de *Salmonella typhimurium* WG49 (NCTC 12484; ATCC 700730).

#### **2.2.4.3. Cuantificación de bacteriófagos de *Bacteroides fragilis***

Los recuentos de bacteriófagos de *Bact. fragilis* en muestras de agua de 1994–1996 se realizaron siguiendo el método A. En las muestras de 1997–1999 los análisis se realizaron siguiendo el método B.

##### **2.2.4.3.1. Método A**

El recuento de fagos que infectan a *Bact. fragilis* presentes en las muestras se hizo por el método de la doble capa de agar (Adams, 1959) adaptada al cultivo en anaerobiosis (Tartera y Jofre, 1987). Se obtuvieron cultivos de la cepa HSP40 de *Bact. fragilis* (ATCC 15477) en medio BPRM (*Bacteroides* Phage Recovery Medium) (Tartera y col., 1992), incubando a 37°C durante 18-22 h, en condiciones de anaerobiosis conseguidas en jarras GasPak (Oxoid) y utilizando kits Anaerocult® A (Merck) que creaban una atmósfera libre de oxígeno. A partir del crecimiento se realizaba una dilución 1:10 en medio fresco y se incubaba a 37°C en anaerobiosis hasta llegar a la fase exponencial ( $DO_{620} = 0,3$ ).

Las muestras se descontaminaron por filtración y se realizaron las diluciones adecuadas en tampón para fagos. Se prepararon alícuotas de 2,5 ml de medio BPRM–0,7% agar en tubos de plástico que se mantenían a 45°C, y se inoculaban 0,5 ml de un cultivo en fase exponencial ( $10^8$  ufc), y 1 ml de la muestra a analizar. Una vez homogeneizado se dispensaba sobre placas de Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio BPRM–1,5% agar. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-22 h en anaerobiosis, y pasado este tiempo se realizó el recuento de UFC/ml.

#### **2.2.4.3.2. Método B**

Alternativamente la titulación de bacteriófagos que infectan a *Bact. fragilis* se hizo según la normativa ISO/WD 10705-4 (Anónimo), utilizando como huésped la cepa RYC2056 (ATCC 700786) (Puig y col., 1997).

#### **2.2.4.4. Cuantificación de coliformes fecales**

Para la enumeración de bacterias coliformes fecales presentes en las muestras se realizaron diluciones de las muestras a analizar en Ringer  $\frac{1}{4}$  y se filtraron al vacío 100, 10 y 1 ml de la dilución correspondiente, a través de un filtro de acetato-nitrato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore). Los filtros se dispusieron sobre la superficie de placas de Petri con agar Bacto mFC, y se incubaron a  $44\pm 1^\circ\text{C}$  durante 18-22 h. Transcurrido este tiempo se realizó el recuento de ufc.

### **2.2.5. DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS ENTÉRICOS**

La detección molecular de virus entéricos (adenovirus humanos, enterovirus y virus de la hepatitis A) se realizó por PCR o RT-PCR anidada, que permiten la amplificación enzimática de secuencias genómicas específicas.

#### **2.2.5.1. Extracción de ácidos nucleicos**

Durante los estudios previos se compararon tres métodos de extracción de ácidos nucleicos (Puig y col., 1994). El primer método testado fue descrito por Chomczynski y col., en 1987, y se basaba en la utilización de guanidinium isotiocianato (GuSCN) – fenol – cloroformo para la extracción de ácidos nucleicos y precipitación de los mismos con etanol. El segundo método ensayado, descrito por Yamada y col., en 1990, se basa en la utilización de GuSCN y adsorción de los ácidos nucleicos sobre polvo de vidrio. El tercer método descrito por Boom y col., en 1990, utiliza GuSCN y adsorción de los ácidos nucleicos sobre

partículas de sílice, y demostró ser el más eficiente, siendo la recuperación un 13,04–118,9% superior que la obtenida por el método de Chomeczynski (Puig y col., 1994).

El método seleccionado utilizaba una solución de GuSCN 5 M en Tris-HCl 0,1 M pH 6,4 – EDTA 22 mM – Triton X-100 1,3% (p/v) (tampón de lisis) para desnaturalizar las proteínas de las cápsides víricas y como inhibidor de las ribonucleasas (ARNasas) del medio. Los ácidos nucleicos libres se adsorben sobre la superficie de partículas de sílice y se recuperan por centrifugación. Seguidamente se realizaban dos lavados consecutivos con una solución de GuSCN 5 M en Tris-HCl 0,1 pH 6,4 (tampón de lavado), dos lavados consecutivos con etanol 70% frío, y un lavado con acetona. La solución de ácidos nucleicos final se obtenía por elución con Tris-HCl 10 mM pH 8,0 – EDTA 0,1 mM – ditiotretitol (DTT) 1 mM – inhibidor de ARNasas 0,24 U/μl (tampón de elución). A partir de 50 μl de suspensión de partículas víricas se obtenían 50 μl de solución de ácidos nucleicos, que se analizaban inmediatamente o bien se conservaban a –20°C hasta el momento del análisis.

## **2.2.5.2. Diseño de iniciadores específicos para la detección de adenovirus humanos, enterovirus y virus de la hepatitis A**

### ***2.2.5.2.1. Iniciadores específicos de adenovirus humanos***

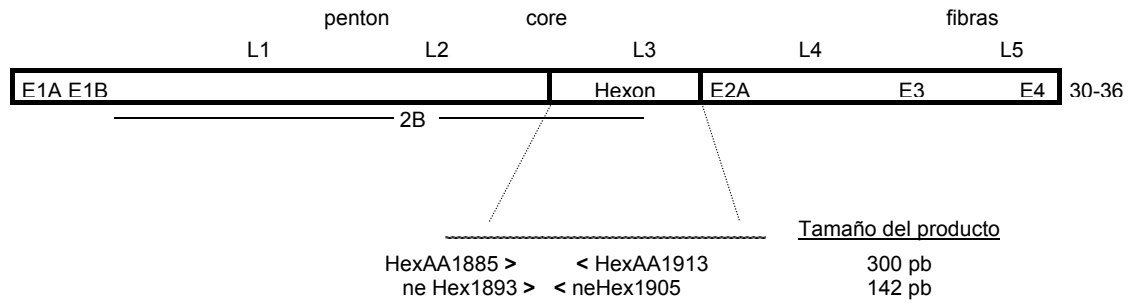
Los iniciadores específicos externos para detectar adenovirus fueron seleccionados a partir de estudios previos de Allard y col. (1990). Los iniciadores externos hexAA1885 y hexAA1913 flanquean la región comprendida entre los nucleótidos 18858 y 19158 de Ad2, dentro del gen que codifica la proteína hexon (Figura 2.3.; Tabla 2.4.) de la cápside vírica. Su especificidad se comprobó frente a los 47 serotipos de adenovirus humanos descritos (Tabla 2.3.), pudiéndose detectar todos ellos por PCR (Allard y col., 1990; Puig y col., 1994).

Dentro de la región amplificada por los iniciadores externos se localizaron dos regiones conservadas que permitieron diseñar un par de iniciadores internos nehexAA1893 y nehexAA1905 (Allard y col., 1992) (Tabla 2.4.). Estos iniciadores flanquean la región entre los nucleótidos 18937 y 19079 de Ad2 (Figura 2.3.). Su especificidad se había comprobado en estudios previos frente a los 47 serotipos de adenovirus humanos (Tabla 2.3.), pudiéndose detectar todos por PCR (Allard y col., 1992; Puig y col., 1994).

**TABLA 2.3.**  
**Origen y características de las cepas de adenovirus utilizadas en los experimentos de amplificación<sup>a</sup>**

| Serotipo | Subgénero | Cepa      | Descripción      | Origen del aislamiento |
|----------|-----------|-----------|------------------|------------------------|
| Ad1      | C         | YoR/Chile | Genoma tipo 1p   | Tejido adenoide        |
| Ad2      | C         | Ad6       | Prototipo        | Tejido adenoide        |
| Ad3      | B1        | GB        | Prototipo        | Lavado nasal           |
| Ad4      | E         | R167      | Prototipo        | Lavado faringeo        |
| Ad5      | C         | Ad75      | Prototipo        | Adenoide               |
| Ad6      | C         | Ton99     | Prototipo        | Amígdalas              |
| Ad7      | B1        | Gomen     | Prototipo        | Lavado faringeo        |
| Ad8      | D         | Trim      | Prototipo        | Exudado ocular         |
| Ad9      | D         | Hicks     | Prototipo        | Heces                  |
| Ad10     | D         | J.J.      | Prototipo        | Exudado ocular         |
| Ad11     | B2        | Slobitski | Prototipo        | Heces                  |
| Ad12     | A         | F-3072/86 | Tipo prototípico | Heces                  |
| Ad13     | D         | A.A.      | Prototipo        | Heces                  |
| Ad14     | B2        | DeWitt    | Prototipo        | Exudado faringeo       |
| Ad15     | D         | Ch38      | Prototipo        | Exudado ocular         |
| Ad16     | B1        | Wigard    | Tipo prototípico | Exudado ocular         |
| Ad17     | D         | Ch22      | Prototipo        | Exudado ocular         |
| Ad18     | A         | D.C.      | Prototipo        | Exudado rectal         |
| Ad19     | D         | 587       | Prototipo        | Conjuntiva             |
| Ad20     | D         | 931       | Prototipo        | Conjuntiva             |
| Ad21     | B1        | SBL       | Tipo prototípico | Conjuntiva             |
| Ad22     | D         | 2711      | Prototipo        | Conjuntiva             |
| Ad23     | D         | SBL       | Tipo prototípico | Conjuntiva             |
| Ad24     | D         | 3153      | Prototipo        | Conjuntiva             |
| Ad25     | D         | BP-1      | Prototipo        | Exudado rectal         |
| Ad26     | D         | BP-2      | Prototipo        | Exudado rectal         |
| Ad27     | D         | BP-4      | Prototipo        | Exudado rectal         |
| Ad28     | D         | BP-5      | Prototipo        | Exudado rectal         |
| Ad29     | D         | BP-6      | Prototipo        | Exudado rectal         |
| Ad30     | D         | BP-7      | Prototipo        | Exudado rectal         |
| Ad31     | A         | 1315/63   | Prototipo        | Heces                  |
| Ad32     | D         | H.H.      | Prototipo        | Exudado rectal         |
| Ad33     | D         | D.J.      | Prototipo        | Exudado rectal         |
| Ad34     | B2        | 259       | Tipo prototípico | Orina                  |
| Ad35     | B2        | 12221/80  | Tipo prototípico | Pulmón y riñón         |
| Ad36     | D         | 275       | Prototipo        | Heces                  |
| Ad37     | D         | GW        | Prototipo        | Ojo                    |
| Ad38     | D         | 70/17368  | Tipo prototípico | Heces                  |
| Ad39     | D         | 81/13027  | Tipo prototípico | Heces                  |
| Ad40     | F         | Hovi X    | Prototipo        | Heces                  |
| Ad41     | F         | Tak       | Prototipo        | Heces                  |
| Ad42     | D         | Paris 54  | Prototipo        | Heces                  |
| Ad43     | D         | 1309      | Prototipo        | Heces y orina          |
| Ad44     | D         | 1584      | Prototipo        | Heces                  |
| Ad45     | D         | 1590      | Prototipo        | Heces                  |
| Ad46     | D         | 1594      | Prototipo        | Heces, bronquios       |
| Ad47     | D         | 1601      | Prototipo        | Heces                  |

<sup>a</sup> Puig y col., 1994.



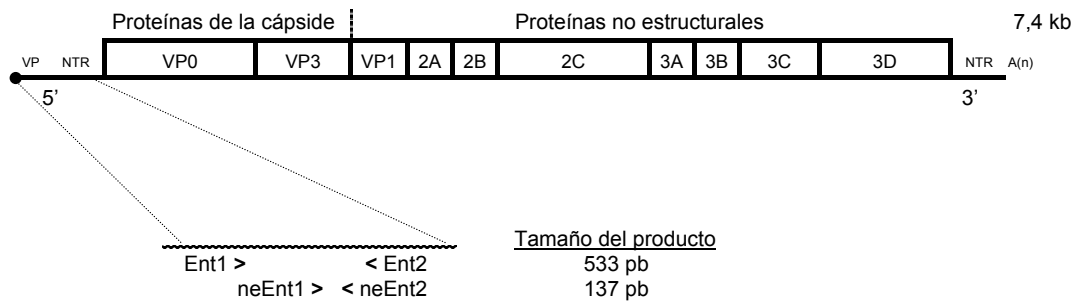
**Figura 2.3.**  
Localización de los iniciadores específicos utilizados para la amplificación de adenovirus humanos.

La sensibilidad del método de detección por PCR utilizando los dos pares de iniciadores se evaluó en estudios previos a partir de diluciones decimales seriadas de una suspensión de ADN de Ad2 y Ad41, pudiendo llegar a detectar el ADN correspondiente a  $10^3$  partículas víricas (38 fg de ADN inicial) tras 30 ciclos de amplificación con los iniciadores externos y hasta 1 partícula (0,038 fg de ADN) tras realizar PCR anidada (Allard y col., 1990 y 1992).

### 2.2.5.2.2. *Iniciadores específicos de enterovirus*

Los iniciadores específicos para la detección de enterovirus se seleccionaron a partir del alineamiento de las regiones no codificantes del extremo 5' del genoma de varias cepas previamente secuenciadas (Jenkins y col., 1987; Hyypiä y col., 1989; Auvinen y col., 1989; Chapman y col., 1990; Gow y col., 1991). Los iniciadores externos Ent1 y Ent2 flanquean la región comprendida entre los nucleótidos 64 y 597 de Coxsackievirus B4, dentro de la región no codificante del extremo 5' (Figura 2.4.; Tabla 2.4.).

Dentro de la región amplificada por los iniciadores externos se diseñaron un par de iniciadores internos neEnt1 y neEnt2, que limitan la región entre los nucleótidos 430 y 567 de Coxsackievirus B4 (Figura 2.4.; Tabla 2.4.). Su especificidad fue evaluada frente a 24 cepas de enterovirus (Echovirus tipo 2, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 18, 19, 21, 25, 27, 29 30; Coxsackievirus tipo A9, B1, B2, B3, B4, B5, B6; Poliovirus tipo 1, 2, 3), pudiéndose detectar todos ellos por PCR (Puig y col., 1994).



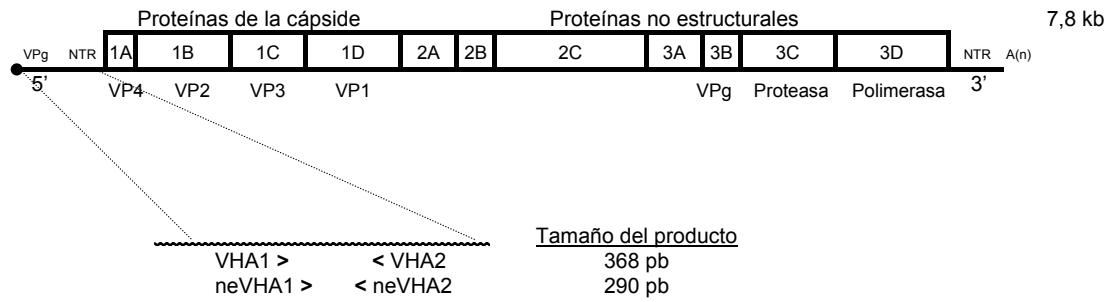
**Figura 2.4.** Localización de los iniciadores utilizados para la amplificación de enterovirus

La sensibilidad de los dos pares de iniciadores se evaluó a partir de diluciones decimales seriadas de una suspensión de ARN de Poliovirus tipo 1, Coxsackievirus B2 y Echovirus 11, estudiando el límite de detección tras 30 ciclos de PCR seguido de PCR anidada, pudiendo llegar a detectar hasta 1-10 partículas víricas (Puig y col., 1994).

### 2.2.5.2.3. *Iniciadores específicos del VHA*

Los iniciadores específicos para la detección del VHA se seleccionaron a partir del alineamiento de las regiones no codificantes del extremo 5' del genoma de varias cepas del VHA previamente secuenciadas. Los iniciadores externos VHA1 y VHA2 flanquean la región comprendida entre los nucleótidos 332 y 700 de la cepa HM-175 (Cohen y col., 1987) dentro de la región no codificante del extremo 5' (Figura 2.5.; Tabla 2.4.). Se diseñaron un par de iniciadores internos neVHA1 y neVHA2, que flanquean la región entre los nucleótidos 680 y 391 (Tabla 2.4.).

La sensibilidad de los dos pares de iniciadores se evaluó a partir de diluciones decimales seriadas de una suspensión de ARN obtenido a partir de la suspensión control de la cepa HM-175, estudiando el límite de detección por PCR utilizando las dos parejas de iniciadores.



**Figura 2.5.**  
Localización de los iniciadores específicos utilizados para la amplificación de VHA

**TABLA 2.4.**  
**Oligonucleótidos utilizados para la detección por PCR adenovirus humanos, enterovirus y virus de la hepatitis A**

| Virus <sup>a</sup> | Posición                 | Nombre             | T <sub>m</sub> (°C) <sup>f</sup> | Tamaño del producto | Secuencia                                 |
|--------------------|--------------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------|---|
| Ad2                | 18858-18883 <sup>b</sup> | hexAA1885          | 78                               | 300 pb              | 5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'           |
| Ad40               | 19136-19158 <sup>b</sup> | hexAA1913          | 74                               |                     | 5'-CAGCACGCCCGGATGTCAAAGT-3'              |
| Ad41               | 18937-18960 <sup>b</sup> | nehexAA1893        | 78                               | 142 pb              | 5'-GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG-3'            |
|                    | 19051-19079 <sup>b</sup> | nehexAA1905        | 92                               |                     | 5'-TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC-3'       |
| Polio 1            | 64-83 <sup>c</sup>       | Ent 1 <sup>e</sup> | 62                               | 533 pb              | 5'-CGGTACCTTTGTA/GCGCCTGT-3' <sup>g</sup> |
| CV B4              | 578-597 <sup>c</sup>     | Ent 2              | 58                               |                     | 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'                |
|                    | 430-450 <sup>c</sup>     | neEnt 1            | 70                               | 137 pb              | 5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTA-3'               |
|                    | 547-567 <sup>c</sup>     | neEnt 2            | 62                               |                     | 5'-GAAACACGGACACCCAAAGTA-3'               |
| VHA                | 332-352 <sup>d</sup>     | VHA1               | 64                               | 368 pb              | 5'-TTGGAACGTCACCTTGCAAGT-3'               |
|                    | 680-700 <sup>d</sup>     | VHA2               | 64                               |                     | 5'-CTGAGTACCTCAGAGGCAAAC-3'               |
|                    | 371-391 <sup>d</sup>     | neVHA1             | 58                               | 290 pb              | 5'-ATCTCTTTGATCTTCCACAAG-3'               |
|                    | 641-661 <sup>d</sup>     | neVHA2             | 64                               |                     | 5'-GAACAGTCCAGCTGTCAATGG-3'               |

<sup>a</sup> Ad, Adenovirus; CV, Coxsackievirus; VHA, virus de la hepatitis A

<sup>b</sup> La posición se refiere a la región hexon de Ad2

<sup>c</sup> La posición se refiere a la región 5'NTR de Coxsackievirus B4

<sup>d</sup> La posición se refiere a la región 5'NTR de la cepa HM-175 del VHA (Cohen y col., 1987b)

<sup>e</sup> Modificado de Gow y col. (1991)

<sup>f</sup> La temperatura de fusión se calculó según la ecuación  $T_m = 4 \times (\text{n}^\circ \text{ pares GC}) + 2 \times (\text{n}^\circ \text{ pares AT})$

<sup>g</sup> A en poliovirus, G en coxsackievirus

### **2.2.5.3. Detección de ácidos nucleicos por amplificación enzimática**

#### ***2.2.5.3.1. Síntesis de ADNc***

La mezcla de reacción para la reacción de transcripción inversa contenía 5 µl de la solución de ácidos nucleicos, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl (tampón II 1×, Perkin-Elmer), 10 nmol de cada desoxinucleótido trifosfato y 20 pmol del iniciador externo Ent2 complementario al ARN de enterovirus, o del iniciador VHA2 para el VHA. La mezcla de reacción se incubó a 95°C durante 5 min para desnaturalizar el ARN, y seguidamente se añadieron 10 pmol de DTT, 10 U de inhibidor de ARNasas y 50 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). El volumen de reacción final fue de 10 µl. La síntesis de ADNc se realizó a 42°C durante 30 min, seguido de una incubación a 95°C 5 min para desnaturalizar los enzimas.

#### ***2.2.5.3.2. Reacción de amplificación***

La reacción de amplificación a partir de ADNc se hizo en un volumen total de 50 µl que contenían 10 µl de la solución de ADNc, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl (tampón II 1×, Perkin-Elmer), 20 pmol del iniciador externo Ent1, o del iniciador VHA1 para VHA, y 2 U de AmpliTaq<sup>®</sup> ADN polimerasa (Perkin-Elmer).

Asimismo, cuando se partía de ADN adenovirus, la reacción de amplificación se realizaba en un volumen total de 50 µl que contenían, 10 µl de solución de ácidos nucleicos, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl (tampón II 1×, Perkin-Elmer), 12,5 nmol de cada desoxinucleótido trifosfato, 4 pmol de los iniciadores externos específicos de adenovirus humanos hexAA1885 y hexAA1913, y 2 U de AmpliTaq<sup>®</sup> ADN polimerasa (Perkin-Elmer).

La mezcla de reacción se incubó en un termociclador programable *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin-Elmer). En el primer ciclo de amplificación la desnaturalización se llevó a cabo a 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de amplificación. Las condiciones fueron, desnaturalización a 92°C durante 90 s, hibridación del iniciador a 55°C durante 75 s y



extensión a 72°C durante 90 s. Tras los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72°C durante 5 min.

El volumen de agua equivalente al volumen de ácidos nucleicos analizado en cada reacción se recoge en la Tabla 2.5.

### 2.2.5.3.3. PCR anidada

Se realizó una segunda reacción de amplificación utilizando iniciadores internos. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenían, 1 µl del producto de la primera, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl (tampón II 1×, Perkin-Elmer), 12,5 nmol de cada desoxinucleótido trifosfato, 9 pmol de los iniciadores internos específicos de enterovirus o VHA, o 3,5 pmol de los iniciadores internos específicos de adenovirus humanos, y 2 U de AmpliTaq<sup>®</sup> ADN polimerasa (Perkin-Elmer). La reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que la primera PCR.

**TABLA 2.5.**  
**Volumen de agua equivalente analizado por PCR anidada**

| Tipo de muestra | Método de concentración  | Volumen concentrado | Volumen analizado       |                         |
|-----------------|--|---------------------|-------------------------|-------------------------|
|                 |  |                     | Detección de ADN vírico | Detección de ARN vírico |
| Agua residual   | Ultracentrifugación o ultrafiltración  | 40 ml               | 4 ml                    | 2 ml                    |
| Río Llobregat   | Filtración-elución con filtros electropositivos y ultracentrifugación                  | 50-250 l            | 2-10 l                  | 1-5 l                   |
| Río Ter         | Filtración-elución con filtros electropositivos y ultracentrifugación                  | 250 l               | 10 l                    | 5 l                     |
| Agua de mar     | 1. Filtración-elución con filtros electropositivos y ultracentrifugación               | 50 l                | 2 l                     | 1 l                     |
|                 | 2. Filtración-elución con filtros de acetato-nitrato de celulosa y ultracentrifugación | 500 ml              | 50 ml                   | 25 ml                   |

#### **2.2.5.3.4. Control de calidad del método de amplificación**

Para reducir la posibilidad de contaminación cruzada con moléculas de ADN amplificado producto de reacciones previas, se siguieron las medidas de control básicas:

- ✓ Se trabajó en áreas separadas para la manipulación de las muestras y extracción de ácidos nucleicos, reactivos de amplificación y manipulación de muestras amplificadas, utilizando material específico para cada uno de estos procesos.
- ✓ Se utilizaban puntas de pipeta con filtro hidrófobo, y material plástico libre de nucleasas.
- ✓ Se analizaban las muestras directas y una dilución 1/10 para reducir la posibilidad de falsos negativos debido a la presencia de sustancias inhibidoras de la reacción de amplificación.
- ✓ Todas las muestras fueron analizadas dos veces en experimentos independientes.
- ✓ En todas las reacciones se incluía un control positivo, que consistía en ácidos nucleicos extraídos a partir del estoc de virus que nos interesaba detectar. Se incluía también un control negativo de muestra sin ácidos nucleicos por cada dos tubos en que se inoculaban los ácidos nucleicos a analizar.
- ✓ Existen medidas de control basadas en la utilización del enzima de restricción *A<sub>lu</sub>I* para evitar contaminaciones cuando se parte de ARN, o la utilización del enzima uracil-ADN-glicosilasa cuando se trabaja con ADN. Esto se utilizó en estudios previos (Puig y col., 1994), pero se consideró que no era necesario para el análisis rutinario, ya que supone modificaciones del método estándar de PCR y un encarecimiento de la técnica.

#### **2.2.5.3.5. Análisis de los resultados**

Los resultados de la primera amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa (Seakem ME, FMC Bioproducts) al 1,5% en TBE 1× (Tris base 90 mM – EDTA 2,4 mM – ácido bórico 90 mM). Se analizaron alícuotas de 10-15 µl a las que se había añadido 2-3 µl de tampón de carga (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilen-cianol, 25% ficoll tipo 400 en agua). Las bandas de ADN se separaron en un campo eléctrico a 100 V durante 30 min–1 h.

El producto de la PCR anidada (10-15 µl) se analizó también por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 3% (2% NuSieve GTG–1% Seakem ME, FMC Bioproducts) en TBE 1× a 100 V durante 1 h.

El ADN amplificado se tiñó en una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml durante 15-30 min. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne, y en caso necesario se realizaron fotografías del gel utilizando una cámara Polaroid MP-4. Alternativamente la visualización y registro de las bandas se hizo utilizando el sistema ImageMaster<sup>®</sup>VDS (Pharmacia-Biotech).

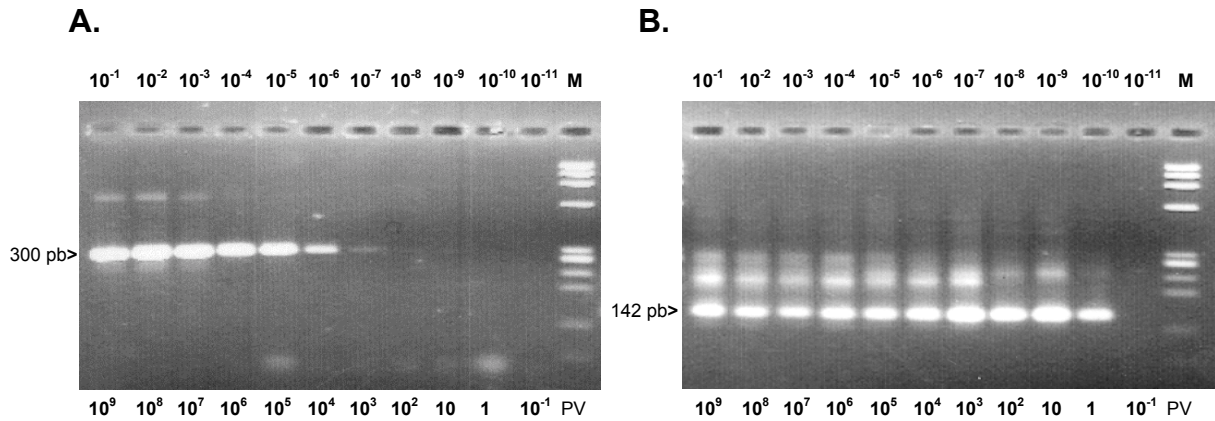
## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS ENTÉRICOS DE ORIGEN HUMANO**

La sensibilidad del método de detección de virus entéricos por amplificación enzimática específica de ácidos nucleicos se evaluó inicialmente a partir de suspensiones víricas control, analizando diluciones decimales seriadas del ADN o ARN extraído. Posteriormente se evaluó la eficiencia en la recuperación y detección de virus a partir de muestras de agua de diversos orígenes suplementadas con virus.

#### **2.3.1.1. Sensibilidad en la detección de AdH**

Se estudió el límite de detección utilizando los iniciadores externos específicos de AdH para realizar 30 ciclos de amplificación, pudiéndose detectar bandas visibles hasta la dilución  $10^{-7}$ , que correspondería a  $10^3$  partículas víricas purificadas de Ad2 (Figura 2.6.A). En combinación con los iniciadores internos, se pudo detectar ADN amplificado hasta la dilución  $10^{-10}$  que corresponde aproximadamente a 1 copia de ADN vírico después de realizar una primera PCR con los iniciadores externos seguida de una PCR anidada con los iniciadores internos (Figura 2.6.B). Estos datos confirmaban la sensibilidad demostrada en estudios previos (Allard y col., 1990 y 1992).

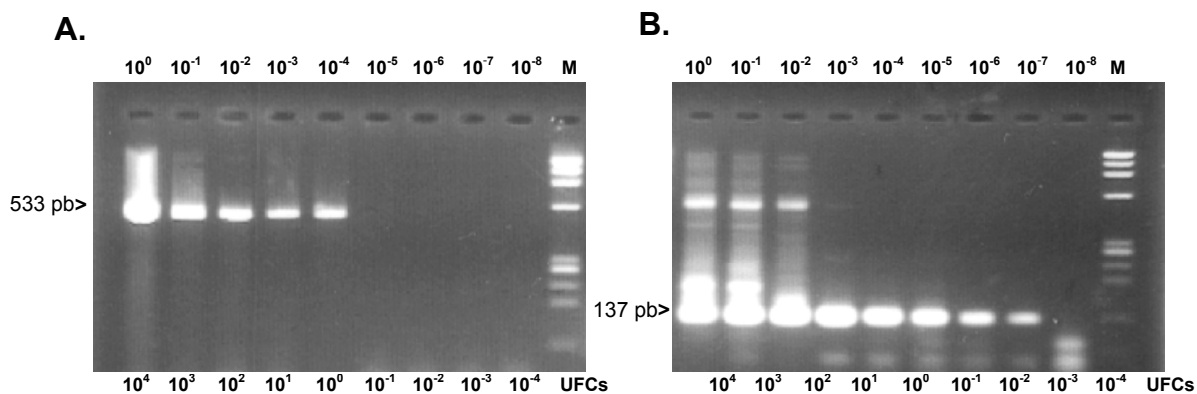


**Figura 2.6.**

Sensibilidad en la detección de Ad2 por PCR tras 30 ciclos de amplificación con iniciadores externos (A), seguido de 30 ciclos de con iniciadores internos (B). Se indica en la parte superior las diluciones de la suspensión de ADN analizadas, y en la parte inferior el equivalente en copias genómicas. M, marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 digerido con *Hae* III.

### 2.3.1.2. Sensibilidad en la detección de EV

Se estudió el límite de detección molecular de EV en sucesivos experimentos, utilizando iniciadores específicos. Se visualizaron bandas hasta la dilución 10<sup>-4</sup> tras 30 ciclos de amplificación con iniciadores externos correspondiente a 5×10<sup>0</sup> UFC, y hasta la dilución 10<sup>-7</sup>, equivalente a 5×10<sup>-3</sup> UFC tras una segunda amplificación con iniciadores internos (Figura 2.7.). La relación entre partículas víricas/partículas infecciosas estimada por otros autores está entre 100 y 1000 (Rotbart, 1990; Severini y col., 1993), por tanto, podemos llegar a detectar el ARN correspondiente a 1–10 PV/reacción. Estos resultados están en concordancia con la sensibilidad evaluada en estudios previos a partir de suspensiones de Poliovirus tipo 1, Coxsackievirus B4 y Echovirus 11 (Puig y col., 1994). Según estos datos, el método de detección molecular proporciona una sensibilidad de 100 a 1000 veces superior que las técnicas clásicas de cultivo celular (Puig y col., 1994; Gilgen y col., 1997; Puig y col., 2000).

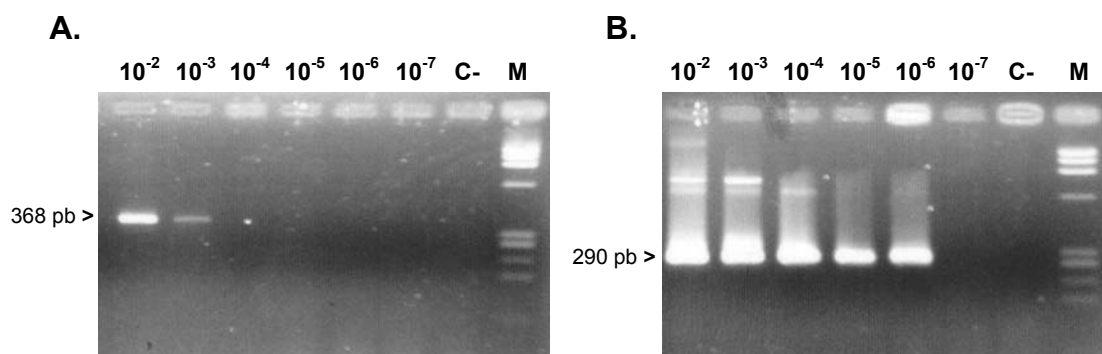


**Figura 2.7.**

Sensibilidad en la detección de EV por PCR tras 30 ciclos de amplificación con iniciadores externos (A), seguido de 30 ciclos de con iniciadores internos (B). Se indica en la parte superior las diluciones de la suspensión de ARN analizadas y en la parte inferior el nº de UFC correspondientes. M, marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 digerido con *Hae* III.

### 2.3.1.3. Sensibilidad en la detección del VHA

Se estudió el límite de detección molecular del VHA utilizando iniciadores específicos. Se pudieron visualizar bandas hasta la dilución  $10^{-3}$  tras 30 ciclos de amplificación con iniciadores externos, y hasta la dilución  $10^{-6}$  tras una segunda amplificación con iniciadores internos (Figura 2.8.). Esto correspondería a un nivel de sensibilidad de 1 equivalente genómico (EG), definido como el número de moléculas de ARN presentes en la muestra más diluida que puede detectarse por PCR anidada (Meng y col., 1998).



**Figura 2.8.**

Sensibilidad en la detección del VHA por PCR tras 30 ciclos de amplificación con iniciadores externos (A), seguido de 30 ciclos de con iniciadores internos (B). Se indica en la parte superior las diluciones de la suspensión de ARN analizadas. C-, control negativo; M, marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 digerido con *Hae* III.

### **2.3.1.4. Valoración de la sensibilidad del método de detección molecular en muestras de agua ambientales**

#### ***2.3.1.4.1. Muestras de agua residual suplementadas con Poliovirus tipo 1 y Ad2***

Para evaluar la eficiencia del método de recuperación de partículas víricas, extracción de ácidos nucleicos y detección molecular, se añadieron alícuotas de las suspensiones control de Ad2 y Poliovirus tipo 1 a muestras de agua residual, y se comparó la sensibilidad respecto al límite de detección molecular a partir de los estocs. Para esto se seleccionaron muestras que en análisis previos habían dado un resultado negativo para AdH y EV.

Se pudo observar en estos experimentos que el límite de detección para ambos virus era habitualmente 10 veces inferior al esperado, por lo que se pudo estimar que en el proceso de recuperación de virus y extracción de los ácidos nucleicos se perdía aproximadamente  $1 \times \log$  respecto a la concentración de virus inoculada.

##### **2.3.1.4.1.1. Recuperación de partículas víricas por ultracentrifugación *versus* ultrafiltración**

Los resultados obtenidos indicaron que no existían diferencias en la detección por PCR de adenovirus o enterovirus comparando las muestras concentradas por ultracentrifugación o por ultrafiltración, después de una primera amplificación utilizando iniciadores externos. Tras realizar una segunda PCR con iniciadores internos, se observó una diferencia de  $\pm 1/2 \times \log$  en la detección de AdH comparando las muestras ultracentrifugadas respecto las muestras ultrafiltradas (Tabla 2.6.).

**TABLA 2.6.**  
**Límite de detección AdH por PCR anidada en muestras de agua residual concentradas por ultracentrifugación o por ultrafiltración**

| Muestra y tratamiento <sup>a</sup> | Dilución del ADN testada |                    |                  |                    |                  |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|
|                                    | 10 <sup>-3</sup>         | 10 <sup>-3/2</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-4/2</sup> | 10 <sup>-5</sup> |
| 1C                                 | +                        | +                  | +                | -                  | -                |
| 1F                                 | +                        | +                  | -                | -                  | -                |
| 2C                                 | +                        | -                  | -                | -                  | -                |
| 2F                                 | +                        | +                  | -                | -                  | -                |
| 3C                                 | +                        | +                  | +                | -                  | -                |
| 3F                                 | +                        | +                  | -                | -                  | -                |
| 4C                                 | +                        | +                  | +                | -                  | -                |
| 4F                                 | +                        | +                  | -                | -                  | -                |

<sup>a</sup> C, ultracentrifugada; F, ultrafiltrada

En la detección de enterovirus no se observa una mayor eficiencia de un método respecto a otro, variando los resultados en  $\pm 1 \times \log$  al analizar las muestras concentradas por los diferentes métodos (Tabla 2.7.). Estas variaciones son fácilmente explicables debido al tipo de muestras analizadas, en las que la contaminación vírica no está completamente homogeneizada. El límite de detección calculado a partir de la muestra 3, en la que se añadió Poliovirus tipo 1 a una concentración final de  $6,6 \times 10^5$  UFC/ml de agua, estaría entre  $1,3 \times 10^{-1}$  y  $1,3 \times 10^{-2}$  UFC (entre 13 y 130 partículas víricas iniciales).

La recuperación de partículas víricas por ultrafiltración utilizando dispositivos de filtración Ultrafree<sup>®</sup>-15 (Millipore) es aplicable al control virológico rutinario de aguas con una elevada carga vírica. Este sistema podría sustituir a la concentración por ultracentrifugación, que supone un gasto más elevado en equipamiento.



**TABLA 2.7.**  
**Límite de detección de enterovirus por RT-PCR anidada en muestras de agua residual concentradas por ultracentrifugación o por ultrafiltración**

| Muestra y tratamiento <sup>a</sup> | Dilución del ARN |                  |                  |                    |                  |                    |                  |                  |                  |                    |                  |                    |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|
|                                    | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3/2</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-4/2</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> | 10 <sup>-7/2</sup> | 10 <sup>-8</sup> | 10 <sup>-8/2</sup> |
| 1C                                 | +                | +                | +                | +                  | +                | -                  | -                | na <sup>b</sup>  | na               | na                 | na               | na                 |
| 1F                                 | +                | +                | +                | -                  | -                | na                 | na               | na               | na               | na                 | na               | na                 |
| 2C                                 | +                | +                | +                | +                  | -                | -                  | na               | na               | na               | na                 | na               | na                 |
| 2F                                 | +                | +                | +                | +                  | -                | -                  | na               | na               | na               | na                 | na               | na                 |
| 3 <sup>c</sup> C                   | +                | +                | +                | +                  | +                | +                  | +                | +                | +                | -                  | -                | -                  |
| 3 <sup>c</sup> F                   | +                | +                | +                | +                  | +                | +                  | +                | +                | +                | +                  | +                | -                  |

<sup>a</sup> C, ultracentrifugada; F, ultrafiltrada

<sup>b</sup> na, no analizado

<sup>c</sup> A la muestra 3 se le añadió Poliovirus tipo 1 (6,6×10<sup>5</sup> UFC/ml de agua)

#### **2.3.1.4.2. Eficiencia en la recuperación de virus a partir de muestras de agua de mar por filtración**

Se añadió Poliovirus tipo 1 (60 UFC/ml de agua) y Ad2 (2-20 EG/ml agua) a dos muestras de agua de mar. Tras 30 min de contacto a temperatura ambiente, los virus se recuperaron por filtración a través de filtros de acetato-nitrato de celulosa como se indica en el apartado 2.2.3.3., y se estudió el límite de detección.

Se detectó EV por RT-PCR anidada hasta la dilución 10<sup>-4</sup> del ARN, equivalente a 5×10<sup>-1</sup> UFC (15-150 PV). En el caso de Ad2 se detectaron bandas visibles hasta la dilución 10<sup>-1</sup>-10<sup>-2</sup> que contendrían el ADN equivalente a 10-100 PV iniciales.

## ***2.3.2. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD EN LA DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS DE ORIGEN HUMANO***

Para demostrar el origen humano de los virus detectados por PCR en muestras de agua residual y aguas superficiales, se evaluó la posibilidad de detectar virus en muestras de origen animal con elevado contenido de material fecal.

### **2.3.2.1. Agua residual de mataderos de ganado**

Se analizaron 17 muestras de agua residual de mataderos de ganado, 9 de las cuales no presentaban contaminación cruzada de origen humano.

Se pudo detectar la presencia de Ad tras 30 ciclos de amplificación con iniciadores externos en las muestras número #E2 (cabritos y terneras) y #E3 (corderos y terneras) con contaminación fecal de origen humano, y en la muestra #E11 (cerdos, corderos y terneras) sin contaminación fecal de origen humano. En los tres casos, la segunda amplificación con iniciadores internos dio resultado negativo. Estudios previos habían demostrado que los iniciadores externos utilizados para la detección de adenovirus podían también amplificar adenovirus de origen bovino (serotipos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9), ovino (serotipos 2, 3, 4 y 5) y porcino (serotipos 1, 2 y 3) (Allard, 1992), pero la utilización combinada con los iniciadores internos permite la detección específica de los 47 serotipos de adenovirus de origen humano (Allard y col., 1992). Solamente se detectó AdH por PCR anidada en 4 de las 8 muestras que presentaban contaminación fecal de origen humano procedente de los sanitarios de la instalación (Tabla 2.8.). No se detectaron AdH en las muestras sin contaminación fecal de origen humano.

Ocho de las muestras dieron un resultado positivo para EV: 5 de las 8 muestras con posible contaminación fecal de origen humano, y en 3 de las 9 muestras con contaminación de origen animal (Tabla 2.8.), lo que indica la posibilidad de detectar algunos enterovirus de origen animal. Todas las muestras analizadas eran negativas para el VHA.

**TABLA 2.8.**  
**Análisis de muestras de agua residual de mataderos**

| Muestra | Origen                      | Contaminación fecal de origen humano | Análisis por PCR anidada <sup>a</sup> |    |     |
|---------|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|----|-----|
|         |                             |                                      | AdH                                   | EV | VHA |
| #E1     | Cerdos                      | Sí                                   | +                                     | +  | -   |
| #E2     | Cabritos y terneras         | Sí                                   | -                                     | -  | -   |
| #E3     | Corderos y terneras         | Sí                                   | -                                     | -  | -   |
| #E4     | Pollos                      | Sí                                   | +                                     | -  | -   |
| #E5     | Cerdos                      | Sí                                   | +                                     | +  | -   |
| #E6     | Cerdos                      | Sí                                   | +                                     | +  | -   |
| #E7     | Cerdos                      | Sí                                   | -                                     | +  | -   |
| #E8     | Cerdos                      | Sí                                   | -                                     | +  | -   |
| #E9     | Corderos y terneras         | No                                   | -                                     | +  | -   |
| #E10    | Corderos y terneras         | No                                   | -                                     | +  | -   |
| #E11    | Cerdos, corderos y terneras | No                                   | -                                     | +  | -   |
| #E12    | Cerdos, corderos y terneras | No                                   | -                                     | -  | -   |
| #E13    | Cerdos, corderos y terneras | No                                   | -                                     | -  | -   |
| #E14    | Cerdos, corderos y terneras | No                                   | -                                     | -  | -   |
| #E15    | Cerdos, corderos y terneras | No                                   | -                                     | -  | -   |
| #E16    | Cerdos, corderos y terneras | No                                   | -                                     | -  | -   |
| #E17    | Cerdos, corderos y terneras | No                                   | -                                     | -  | -   |

<sup>a</sup> Resultados por PCR anidada en 4 ml de agua residual para la detección de adenovirus, y 2 ml para enterovirus y virus de la hepatitis A.

### 2.3.2.2. Muestras de heces de origen animal

En 2 muestras de heces de origen porcino se detectaron Ad tras 30 ciclos de amplificación con iniciadores externos. Sin embargo, ninguna de las 12 muestras de heces analizadas (vacas, gallinas, pollos, patos, cerdos, corderos) dio resultado positivo para adenovirus o enterovirus por PCR o RT-PCR anidada.

Para evaluar la presencia de inhibidores de la reacción se añadieron niveles bajos de Ad2 y Poliovirus tipo 1 ( $10^4$  PV) a dos muestras de heces de cerdo y una muestra de heces de gallina, y Poliovirus tipo 1 a una muestra de heces de pollo, dos de vaca y una de cordero. En todos los casos las muestras dieron un resultado positivo en 0,4 g o en 0,04 g de heces.

Para estimar la eficiencia de la recuperación de partículas víricas a partir de muestras de heces, y la sensibilidad del método de detección se añadió Poliovirus tipo 1 a dos muestras de heces de cerdo, a una concentración de  $3 \times 10^4$  UFC por gramo ( $3 \times 10^6 - 3 \times 10^7$  PV/g). Tras la recuperación de las partículas víricas, posterior extracción de ácidos nucleicos y análisis por

RT-PCR anidada de diluciones decimales, se observaron bandas visibles hasta la dilución  $10^{-5}$ , que contenía la cantidad de ARN correspondiente a 1,5–15 partículas víricas en 5 µg de heces analizados. Según estos experimentos no se observa la presencia de sustancias inhibitoras de la reacción de amplificación.

### **2.3.3. CONTAMINACIÓN VÍRICA DEL MEDIO AMBIENTE DE ORIGEN FECAL HUMANO**

#### **2.3.3.1. Presencia de virus entéricos en agua residuales**

En este estudio se analizaron 41 muestras de agua residual doméstica no tratada, procedente de la entrada del EDAR de San Adrián de Besós: 12 muestras mensualmente durante 1994-1995, y 29 muestras tomadas aleatoriamente entre 1996-1999.

Los resultados obtenidos por PCR anidada demostraron la presencia de AdH en 30 de las 39 muestras de agua residual no tratada tras 30 ciclos de amplificación (76,9%), y en 39 de las 41 muestras tras realizar PCR anidada (95,12%) en 4 ml de agua (Tabla 2.9.).

Se detectó ARN de EV en 10 de 36 muestras (27,7%) tras realizar 30 ciclos de amplificación, y en 27 de 38 muestras de agua residual (71,05%) por PCR anidada en 2 ml de agua. Solamente 1 de 15 (6,66%) fue positiva en cultivo celular en 20 ml de agua (0,7 UFC/ml). Cinco de las 15 muestras inoculadas sobre BGM demostraron una toxicidad elevada (33,3%), por lo tanto, la presencia de enterovirus infecciosos podría estar infravalorada.

La presencia de otros patógenos víricos como el VHA se observó en 19 de las 39 muestras estudiadas (48,7%), en 2 ml de agua tras realizar RT-PCR anidada. Una de las muestras positivas presentaba también AdH, y 13 eran, además, positivas para AdH y EV simultáneamente (Tabla 2.9.) (Figura 2.9.). Las características genéticas de algunas de las cepas del VHA detectadas se describen en el Capítulo 4 de este trabajo.

**TABLA 2.9.**  
**Análisis microbiológico y virológico de muestras de agua residual**

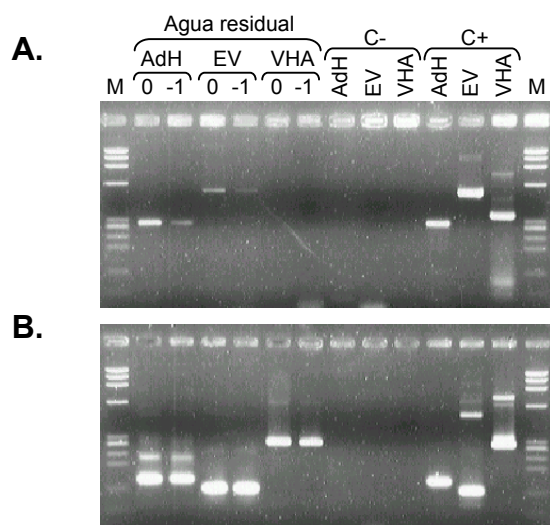
| Muestra  | Análisis por PCR <sup>a</sup> |         |                 |         |         |         | Bacteriófagos <sup>b,c</sup> |                         |                                |
|----------|-------------------------------|---------|-----------------|---------|---------|---------|------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
|          | AdH                           |         | EV              |         | VHA     |         | Colifagos somáticos          | Colifagos F-específicos | Fagos de <i>Bact. fragilis</i> |
|          | Primera                       | Anidada | Primera         | Anidada | Primera | Anidada |                              |                         |                                |
| 28/09/94 | +                             | +       | -               | -       | -       | -       | 1,0×10 <sup>3</sup>          | 2,5×10 <sup>2</sup>     | 4,4×10 <sup>1</sup>            |
| 21/10/94 | -                             | +       | -               | +       | -       | +       | 1,4×10 <sup>3</sup>          | 1,7×10 <sup>2</sup>     | 3,3×10 <sup>1</sup>            |
| 17/11/94 | +                             | +       | -               | -       | -       | -       | 7,7×10 <sup>2</sup>          | 2,8×10 <sup>2</sup>     | 6,2×10 <sup>1</sup>            |
| 16/12/94 | +                             | +       | -               | -       | -       | -       | 1,4×10 <sup>3</sup>          | 9,4×10 <sup>1</sup>     | 7,4×10 <sup>1</sup>            |
| 26/01/95 | + (-1)                        | +       | -               | -       | -       | -       | 1,3×10 <sup>3</sup>          | 1,1×10 <sup>2</sup>     | 3,4×10 <sup>1</sup>            |
| 23/02/95 | + (-1)                        | +       | -               | -       | -       | -       | 8,9×10 <sup>2</sup>          | 1,1×10 <sup>2</sup>     | 4,1×10 <sup>1</sup>            |
| 31/03/95 | -                             | -       | -               | -       | -       | -       | 1,9×10 <sup>3</sup>          | 1,1×10 <sup>3</sup>     | 2,5×10 <sup>1</sup>            |
| 27/04/95 | + (-1)                        | +       | -               | + (-1)  | -       | -       | 6,6×10 <sup>3</sup>          | 8,0×10 <sup>2</sup>     | 4,9×10 <sup>1</sup>            |
| 16/05/95 | -                             | +       | +(0)            | +       | -       | -       | 4,0×10 <sup>3</sup>          | 1,8×10 <sup>3</sup>     | 2,1×10 <sup>2</sup>            |
| 30/06/95 | + (-1)                        | +       | -               | + (-1)  | -       | +       | 7,0×10 <sup>3</sup>          | 5,3×10 <sup>2</sup>     | 3,4×10 <sup>1</sup>            |
| 28/07/95 | -                             | +       | -               | -       | -       | +(0)    | 1,2×10 <sup>3</sup>          | 9,9×10 <sup>2</sup>     | 8,5×10 <sup>1</sup>            |
| 31/08/95 | -                             | +       | -               | + (-1)  | -       | -       | 9,9×10 <sup>3</sup>          | 2,1×10 <sup>3</sup>     | 1,6×10 <sup>2</sup>            |
| 12/02/96 | + (-2)                        | + (-4)  | -               | +       | -       | +       | 5,2×10 <sup>3</sup>          | 1,0×10 <sup>3</sup>     | 1,1×10 <sup>2</sup>            |
| 24/04/96 | + (-2)                        | +       | -               | -       | -       | -       | 1,8×10 <sup>4</sup>          | 2,7×10 <sup>3</sup>     | 4,8×10 <sup>1</sup>            |
| 10/09/96 | -                             | +       | -               | -       | -       | -       | 1,9×10 <sup>4</sup>          | 9,4×10 <sup>3</sup>     | 3,2×10 <sup>1</sup>            |
| 17/06/97 | + (-1)                        | +       | -               | +       | -       | +       | 3,9×10 <sup>4</sup>          | 3,3×10 <sup>3</sup>     | 7,0×10 <sup>1</sup>            |
| 01/08/97 | + (0)                         | +       | + (-1)          | +       | -       | +       | 2,3×10 <sup>4</sup>          | 1,9×10 <sup>3</sup>     | 8,0×10 <sup>1</sup>            |
| 08/08/97 | + (0)                         | +       | -               | -       | -       | -       | 2,6×10 <sup>4</sup>          | 2,2×10 <sup>3</sup>     | 2,0×10 <sup>1</sup>            |
| 22/08/97 | -                             | +       | -               | +       | -       | -       | 5,2×10 <sup>4</sup>          | 4,3×10 <sup>3</sup>     | 1,2×10 <sup>2</sup>            |
| 25/08/97 | -                             | +       | + (-1)          | +       | -       | -       | 3,1×10 <sup>4</sup>          | 2,6×10 <sup>3</sup>     | 4,0×10 <sup>1</sup>            |
| 29/08/97 | + (0)                         | +       | + (0)           | +       | -       | -       | 6,8×10 <sup>4</sup>          | 5,7×10 <sup>3</sup>     | 3,5×10 <sup>2</sup>            |
| 29/09/97 | + (-1)                        | +       | + (-1)          | +       | -       | +       | na                           | na                      | 1,2×10 <sup>2</sup>            |
| 07/10/97 | + (-1)                        | +       | -               | +       | -       | + (0)   | 4,4×10 <sup>4</sup>          | 2,5×10 <sup>3</sup>     | 5,3×10 <sup>2</sup>            |
| 21/10/97 | + (-1)                        | +       | + (-1)          | +       | -       | -       | 4,8×10 <sup>4</sup>          | 6,9×10 <sup>3</sup>     | 2,5×10 <sup>2</sup>            |
| 28/10/97 | + (-1)                        | +       | na <sup>d</sup> | na      | na      | na      | na                           | na                      | na                             |
| 06/11/97 | + (-1)                        | +       | -               | +       | -       | + (0)   | na                           | na                      | na                             |
| 11/11/97 | + (-1)                        | +       | na              | na      | na      | na      | 2,6×10 <sup>4</sup>          | 1,6×10 <sup>3</sup>     | 4,6×10 <sup>1</sup>            |
| 19/11/97 | + (-2)                        | + (-3)  | + (-1)          | + (-3)  | -       | + (-1)  | 8,0×10 <sup>4</sup>          | na                      | na                             |
| 05/12/97 | + (-1)                        | + (-4)  | + (-1)          | + (-3)  | -       | + (0)   | 2,7×10 <sup>4</sup>          | 3,7×10 <sup>3</sup>     | 1,1×10 <sup>2</sup>            |
| 17/12/97 | -                             | -       | -               | -       | -       | -       | 3,5×10 <sup>3</sup>          | 2,4×10 <sup>2</sup>     | 7,7×10 <sup>1</sup>            |
| 30/12/97 | + (-1)                        | +       | + (0)           | +       | -       | -       | 2,0×10 <sup>4</sup>          | 4,3×10 <sup>3</sup>     | 1,1×10 <sup>2</sup>            |
| 09/01/98 | + (0)                         | +       | -               | +       | -       | +       | 1,0×10 <sup>4</sup>          | 4,8×10 <sup>3</sup>     | 1,1×10 <sup>2</sup>            |
| 12/01/98 | + (0)                         | + (-2)  | + (0)           | +       | -       | -       | 1,0×10 <sup>4</sup>          | 2,8×10 <sup>3</sup>     | 1,2×10 <sup>2</sup>            |
| 16/01/98 | + (0)                         | + (-1)  | -               | +       | -       | + (0)   | 7,0×10 <sup>3</sup>          | na                      | 5,8×10 <sup>1</sup>            |
| 23/01/98 | + (0)                         | + (-2)  | -               | +       | -       | + (0)   | 1,8×10 <sup>4</sup>          | na                      | 8,5×10 <sup>1</sup>            |
| 02/02/98 | + (0)                         | + (-2)  | -               | +       | -       | + (0)   | 1,9×10 <sup>4</sup>          | na                      | 8,0×10 <sup>1</sup>            |
| 11/02/98 | + (0)                         | + (-2)  | -               | +       | -       | + (0)   | 1,4×10 <sup>4</sup>          | na                      | 4,4×10 <sup>1</sup>            |
| 25/04/98 | + (-1)                        | + (-4)  | -               | +       | -       | -       | 1,0×10 <sup>5</sup>          | 1,0×10 <sup>3</sup>     | 1,0×10 <sup>1</sup>            |
| 22/03/99 | + (-3)                        | + (-4)  | + (-2)          | + (-4)  | -       | + (-2)  | 2,7×10 <sup>4</sup>          | 8,2×10 <sup>2</sup>     | 8,0×10 <sup>1</sup>            |
| 26/03/99 | + (-1)                        | + (-3)  | + (-1)          | + (-3)  | -       | + (-1)  | 2,3×10 <sup>4</sup>          | 8,6×10 <sup>2</sup>     | 1,1×10 <sup>2</sup>            |
| 16/04/99 | + (-1)                        | + (-4)  | na              | na      | -       | + (-1)  | 6,1×10 <sup>3</sup>          | 2,0×10 <sup>2</sup>     | 2,0×10 <sup>1</sup>            |

<sup>a</sup> Resultados por PCR anidada en 4 ml de agua residual para la detección de adenovirus, y 2 ml para enterovirus y virus de la hepatitis A. Se indica entre paréntesis la última dilución positiva por PCR. AdH, adenovirus humanos; EV, enterovirus; VHA, virus de la hepatitis A

<sup>b</sup> Resultados expresados en UFC/ml de muestra

<sup>c</sup> Datos aportados por J. Méndez y J. Dellundé

<sup>d</sup> na, no analizado



**Figura 2.9.**

Electroforesis en gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos por PCR para la detección de AdH, EV y VHA en una muestra de agua residual de San Adrián. A) RT-PCR y B) PCR anidada. C-, controles negativos; C+, controles positivos; M, marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 (*Hae* III).

Los resultados obtenidos a partir del análisis de las tres muestras de efluente de la planta nos indican que el tratamiento no elimina completamente los virus, ya que se detectaron AdH en 2 de las 3 muestras de efluente, y bacteriófagos, en concentraciones similares a las de muestras no tratadas (Tabla 2.10.).

**TABLA 2.10.**  
**Análisis de muestras de agua residual de la salida de la depuradora**

| Muestra  | Análisis por PCR anidada <sup>a</sup> |    |     | Bacteriófagos <sup>b,c</sup> |                         |                                |
|----------|---------------------------------------|----|-----|------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
|          | AdH                                   | EV | VHA | Colifagos somáticos          | Colifagos F-específicos | Fagos de <i>Bact. fragilis</i> |
| 12/02/96 | + (-1) / + (-3)                       | -  | -   | $1,3 \times 10^3$            | $1,7 \times 10^2$       | $6,2 \times 10^1$              |
| 24/04/96 | + (-2) / + (-4)                       | -  | -   | $3,0 \times 10^3$            | $9,8 \times 10^1$       | $1,4 \times 10^2$              |
| 10/09/96 | -                                     | -  | -   | $7,3 \times 10^3$            | $2,4 \times 10^2$       | $2,3 \times 10^1$              |

<sup>a</sup> Resultados por PCR anidada en 4 ml de agua residual para la detección de adenovirus, y 2 ml para enterovirus y virus de la hepatitis A. Se indica: 1ª PCR (límite de detección)/2ª PCR (límite de detección). AdH, adenovirus humanos; EV, enterovirus; VHA, virus de la hepatitis A

<sup>b</sup> Resultados expresados en UFC/ml de muestra

<sup>c</sup> Datos aportados por J. Méndez y J. Dellundé

**2.3.3.1.1. Concentración de virus entéricos de origen humano en agua residual no tratada y en efluente primario**

La concentración de los tres virus de origen humano estudiados en muestras de agua no tratada se valoró a partir del experimento de la dilución límite que da un resultado positivo por PCR. Se estimó la concentración de AdH y EV en muestras de agua no tratada entre <1-10 PV/ml y 10<sup>4</sup> PV/ml. La concentración de VHA se estimó entre <1-10 EG/ml y 10<sup>2</sup> EG/ml (Tabla 2.11.).

En muestras de efluente la concentración de AdH estimada estaría dentro del mismo rango que en algunas de las muestras no tratadas, mientras que los niveles de EV y VHA serían inferiores a 1-10 PV o EG/ml.

**TABLA 2.11.**  
**Concentración de virus entéricos de origen humano estimada en las muestras de agua residual**

|                  | Resultado | Reacción de amplificación |         | Nº de muestras | Porcentaje | Concentración estimada                    |
|------------------|-----------|---------------------------|---------|----------------|------------|---|
|                  |           | Primera                   | Anidada |                |            |   |
| Presencia de AdH | negativo  | -                         | -       | 2/41           | 4,8        | <1-10 PV/ml                               |
|                  | positivo  | -                         | +       | 7/39           | 17,3       | >1-10 – 10 <sup>2</sup> PV/ml             |
|                  |           | +                         | +       | 30/39          | 76,9       | > 10 <sup>2</sup> – 10 <sup>4</sup> PV/ml |
| Presencia de EV  | negativo  | -                         | -       | 11/38          | 28,9       | <1-10 PV/ml                               |
|                  | positivo  | -                         | +       | 15/38          | 39,4       | >1-10 – 10 <sup>2</sup> PV/ml             |
|                  |           | +                         | +       | 12/38          | 31,5       | >10 <sup>2</sup> – 10 <sup>4</sup> PV/ml  |
| Presencia de VHA | negativo  | -                         | -       | 21/39          | 53,8       | <1-10 EG/ml                               |
|                  | positivo  | -                         | +       | 19/39          | 48,7       | >1-10 –10 <sup>2</sup> EG/ml              |

**2.3.3.1.2. Análisis estadístico**

Se estudió la relación entre la presencia de virus entéricos de origen humano y los niveles de los tres bacteriófagos propuestos como indicadores de contaminación fecal. El modelo, para cada variable respuesta (AdH, EV y VHA), incluye el logaritmo de las variables colifagos somáticos, colifagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* como variables explicativas.

El modelo logístico aplicado no muestra una relación significativa entre Ln[colifagos somáticos], Ln[colifagos F-específicos], Ln[fagos de *Bact. fragilis*] respecto a las variables binarias AdH y VHA. En cambio EV presenta una relación estadísticamente significativa con Ln[colifagos somáticos] y Ln[fagos de *Bact. fragilis*], que se mantiene en la variable combinada EV/VHA, con un nivel de significación del 5% (Tabla 2.12.).

**TABLA 2.12.**  
**Relación entre los parámetros microbiológicos medidos en agua residual**

|   | Variable binaria |         |        |         |
|---|------------------|---------|--------|---------|
|   | AdH              | EV      | VHA    | EV/VHA  |
| Tamaño de la muestra                      | 33               | 31      | 32     | 31      |
| P valor Ln[somáticos]                     | 0,1788           | 0,0006* | 0,6038 | 0,0038* |
| P valor Ln [F-específicos]                | 0,3605           | 0,1845  | 0,9264 | 0,5347  |
| P valor Ln [fagos <i>Bact. fragilis</i> ] | 0,4323           | 0,0179* | 0,4967 | 0,0096* |

\* Nivel de significación del 5%

### 2.3.3.2. Presencia de virus entéricos en agua naturales

Se aplicó el método de detección molecular para evaluar la presencia de virus entéricos de origen humano en muestras de aguas naturales con diferentes niveles de contaminación fecal:

- muestras de agua del río Llobregat
- muestras de agua del río Ter
- muestras de agua de mar

#### 2.3.3.2.1. Contaminación vírica del agua del río Llobregat

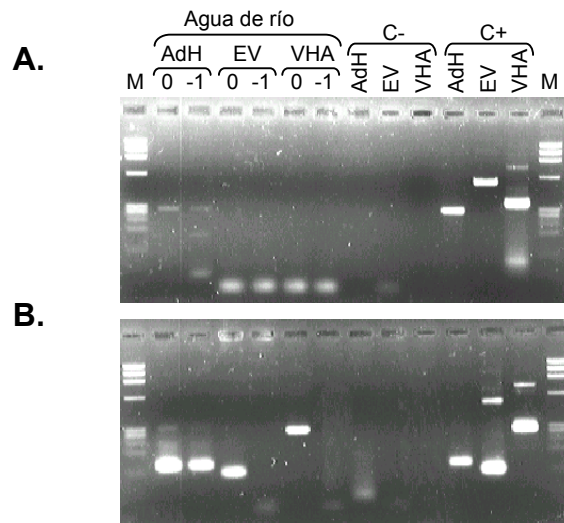
Se analizaron 56 muestras de agua del río Llobregat, recogidas a la altura del municipio de Abrera. Las muestras del río Llobregat presentan unos niveles de coliformes fecales entre  $10^2$ - $10^5$  ufc en 100 ml. Otras características microbiológicas se resumen en la Tabla 2.2.

Los virus que se detectaron con mayor frecuencia en las muestras analizadas fueron los AdH. Los resultados obtenidos por PCR anidada demostraron la presencia de AdH en 49 de



las 56 muestras de agua de río (87,50%), analizando un volumen de muestra de 2-10 l (Tabla 2.13.). Se detectó ARN de EV por RT-PCR anidada en 23 de 56 muestras (41,07%) en 1-5 l de agua, mientras que sólo 8 de 56 (14,28%) mostraron la presencia de partículas infecciosas sobre células BGM (1-4 UFC en 20 ml de concentrado equivalente a 20-100 l de agua). Esto demuestra una sensibilidad superior de la detección molecular en comparación con las técnicas de cultivo celular. Dos de las muestras que presentaron positividad en cultivo celular dieron un resultado negativo por PCR anidada (muestras 10/94 y 12/94a), lo que sugiere la posibilidad de estar detectando partículas infecciosas de otros virus (probablemente reovirus) que pueden también multiplicarse sobre la misma línea celular.

La presencia del VHA se demostró en 22 de las 56 muestras estudiadas (39,28%), en 1-5 l de agua. Diez de las muestras presentaban también AdH, y el resto eran, además, positivas para AdH y EV simultáneamente (Tabla 2.13.) (Figura 2.10.). Las características genéticas algunas de las cepas del VHA detectadas se describen en el Capítulo 4 de este trabajo.



**Figura 2.10.** Electroforesis en gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos por PCR para la detección de AdH, EV y VHA en una muestra del río Llobregat. A) primera PCR, y B) PCR anidada. C-, controles negativos; C+, controles positivos; M, marcador de peso molecular  $\Phi$ X174 (*Hae* III).

**TABLA 2.13.**  
**Análisis de muestras de agua del río Llobregat**

| Muestra | Análisis por PCR anidada <sup>a</sup> |    |     | Análisis por cultivo celular <sup>b</sup> | Bacteriología <sup>b</sup>      |
|---------|---------------------------------------|----|-----|---|---------------------------------|
|         | AdH                                   | EV | VHA | EV <sup>c</sup>                           | Coliformes fecales <sup>d</sup> |
| 01/94   | +                                     | -  | -   | 0   | 19200                           |
| 02/94   | -                                     | -  | -   | 0   | 8000                            |
| 03/94   | +                                     | -  | -   | 0   | 108                             |
| 04/94   | +                                     | -  | -   | 0   | 100                             |
| 05/94   | +                                     | +  | -   | 0   | 0                               |
| 06/94   | +                                     | -  | -   | 0   | 1000                            |
| 07/94   | +                                     | -  | -   | 0   | 0                               |
| 08/94   | +                                     | +  | +   | 0   | 8000                            |
| 09/94   | +                                     | +  | +   | 0   | 8000                            |
| 10/94   | +                                     | -  | -   | 2   | 4000                            |
| 11/94   | +                                     | -  | +   | 0   | 4800                            |
| 12/94a  | +                                     | -  | +   | 0   | 2000                            |
| 12/94b  | +                                     | -  | -   | 0   | na <sup>d</sup>                 |
| 12/94c  | +                                     | -  | +   | 0   | na                              |
| 12/94d  | +                                     | -  | +   | 4   | na                              |
| 01/95   | +                                     | -  | -   | 0   | 6800                            |
| 02/95   | +                                     | -  | -   | 0   | 1000                            |
| 03/95   | +                                     | -  | +   | 0   | 200                             |
| 05/95   | -                                     | -  | -   | 0   | 4200                            |
| 06/95   | -                                     | -  | -   | 0   | 39000                           |
| 08/95   | -                                     | -  | -   | 0   | 43000                           |
| 09/95   | +                                     | -  | +   | 0   | 3800                            |
| 10/95   | -                                     | -  | -   | 0   | 6000                            |
| 11/95   | +                                     | -  | -   | 0   | 2400                            |
| 12/95   | +                                     | -  | +   | 0   | 3200                            |
| 02/96   | +                                     | -  | -   | 0   | 4400                            |
| 03/96   | +                                     | +  | +   | 0   | 10000                           |
| 04/96   | +                                     | +  | +   | 2   | 1000                            |
| 05/96   | +                                     | +  | -   | 0   | 2950                            |
| 06/96   | -                                     | -  | -   | 0   | 2800                            |
| 07/96   | +                                     | +  | +   | 0   | 16000                           |
| 09/96   | -                                     | -  | -   | 0   | na                              |
| 10/96   | +                                     | -  | +   | 0   | 900                             |
| 11/96   | +                                     | +  | +   | 0   | na                              |
| 12/96   | +                                     | -  | +   | 0   | na                              |
| 02/97   | +                                     | +  | +   | 0   | na                              |
| 02/97   | +                                     | +  | -   | 0   | 8000                            |
| 03/97   | +                                     | +  | -   | 0   | 2000                            |
| 04/97   | +                                     | +  | -   | 0   | 15300                           |
| 05/97   | +                                     | -  | +   | 0   | 7200                            |
| 06/97   | +                                     | +  | -   | 1   | 10500                           |
| 07/97   | +                                     | +  | -   | 0   | 2200                            |
| 08/97   | +                                     | -  | +   | 1   | 9800                            |
| 09/97   | +                                     | +  | -   | 0   | 10000                           |
| 11/97   | +                                     | +  | -   | 0   | 103000                          |
| 12/97   | +                                     | +  | +   | 2   | 63000                           |
| 01/98   | +                                     | +  | -   | 0   | na                              |
| 02/98   | +                                     | +  | +   | 2   | na                              |
| 03/98   | +                                     | +  | +   | 1   | na                              |
| 04/98   | +                                     | -  | -   | 0   | na                              |
| 07/98   | +                                     | -  | -   | 0   | na                              |
| 08/98   | +                                     | +  | -   | 0   | na                              |
| 09/98   | +                                     | -  | -   | 0   | na                              |
| 10/98   | +                                     | -  | -   | 0   | na                              |
| 11/98   | +                                     | +  | -   | 0   | na                              |
| 12/98   | +                                     | +  | +   | 0   | na                              |

<sup>a</sup> Resultados por PCR anidada en 2 ml de concentrado (equivalente a 2-10 l de agua del río Llobregat) para la detección de adenovirus, y 1 ml de concentrado para enterovirus y hepatitis A (equivalente a 1-5 l de agua del río Llobregat)

<sup>b</sup> Análisis realizados por J. Méndez, J. Dellundé, L. Mocé y N. Queralt

<sup>c</sup> Resultados por cultivo celular sobre BGM en 20 ml de concentrado (equivalente a 20-100 l de agua del Llobregat)

<sup>d</sup> ufc/100 ml de agua

<sup>e</sup> na, no analizado

El análisis estadístico aplicando el modelo logístico indicó la falta de correlación entre la presencia de virus entéricos de origen humano y los coliformes fecales como índice de contaminación, ya que en muestras que no presentaban coliformes se demostró la presencia de AdH y EV (Tabla 2.13.)

La concentración de los tres virus estudiados que infectan al hombre en muestras de agua del río Llobregat se estimó a partir del experimento de la dilución límite. Se pudo estimar que la concentración de AdH oscilaba entre  $<1-5$  PV/l y  $10^3$  PV/l. Los niveles de EV estarían entre  $<10^1$  PV/l y  $10^3$  PV/l, y la concentración de VHA se estimó entre  $<10^1$  PV/l y  $10^2$  PV/l (Tabla 2.14.). En comparación con las muestras de agua residual, se ha observado una disminución en los niveles de AdH y EV de 3–4 unidades logarítmicas, y de 3 logaritmos en los niveles del VHA, en el caso de las muestras positivas.

**TABLA 2.14.**  
**Concentración de virus entéricos de origen humano estimada en las muestras de agua del río Llobregat**

|                  | Resultado | Reacción de amplificación |         | Nº de muestras | Porcentaje | Concentración estimada |
|------------------|-----------|---------------------------|---------|----------------|------------|------------------------|
|                  |           | Primera                   | Anidada |                |            |                        |
| Presencia de AdH | negativo  | –                         | –       | 7/56           | 12,5       | $<1-5$ PV/l            |
|                  | positivo  | –                         | +       | 29/39          | 74,3       | $>1-5 - 10^2$ PV/l     |
|                  |           | +                         | +       | 8/39           | 20,5       | $>10^2 - 10^3$ PV/l    |
| Presencia de EV  | negativo  | –                         | –       | 33/56          | 58,9       | $<10$ PV/l             |
|                  | positivo  | –                         | +       | 23/56          | 41,1       | $>10 - 10^3$ PV/l      |
| Presencia de VHA | negativo  | –                         | –       | 34/56          | 60,7       | $<10$ EG/l             |
|                  | positivo  | –                         | +       | 22/56          | 39,3       | $>10 - 10^2$ EG/l      |

### 2.3.3.2.2. Contaminación vírica del agua del río Ter

Se analizaron 10 muestras de agua del río Ter, recogidas a la altura del municipio de Cardedeu. Las muestras del río Ter presentan niveles de contaminación fecal menores que el río Llobregat, siendo los recuentos de coliformes fecales inferiores a 10 ufc en 100 ml. Otras características microbiológicas se resumen en la Tabla 2.2.

Los resultados obtenidos por PCR anidada dieron un resultado positivo para AdH en 6 de las 10 muestras, en 2-10 l de agua analizada (Tabla 2.15.). Se detectó la presencia de EV

por RT-PCR anidada en 4 de 10 muestras en 1-5 l de agua, mientras que sólo 1 mostró la presencia de partículas infecciosas sobre células BGM (1 UFC en 20 ml de concentrado equivalente a 20-100 l de agua) (Tabla 2.15.).

La presencia del VHA se detectó en 2 de las 10 muestras estudiadas, en 1-5 l de agua: una era, además, positiva para AdH, y la otra positiva para AdH y EV por PCR anidada.

De nuevo se ha podido observar que muestras con niveles habituales de coliformes fecales inferiores a 10 ufc/100 ml presentan concentraciones detectables de AdH, EV o VHA. La concentración estimada de AdH a partir de los experimentos de la dilución límite estaría entre <1–10 PV/l en las muestras negativas, siendo el máximo 10 PV/l en las muestras positivas. En el caso de EV y VHA la concentración máxima estaría entre 1–10 PV o EG por litro en las muestras positivas.

**TABLA 2.15.**  
**Análisis de muestras de agua de río Ter**

| Muestras | Análisis por PCR anidada <sup>a</sup> |       |       | Análisis por cultivo celular <sup>b</sup> | Bacteriología <sup>b</sup>      |
|----------|---------------------------------------|-------|-------|---|---------------------------------|
|          | AdH                                   | EV    | VHA   | EV <sup>c</sup>                           | Coliformes fecales <sup>d</sup> |
| 01/96    | +                                     | –     | + (0) | 0   | <10                             |
| 04/96    | –                                     | –     | –     | 0   | <10                             |
| 07/96    | –                                     | –     | –     | 0   | <10                             |
| 03/97    | –                                     | –     | –     | 0   | 1                               |
| 06/97    | + (0)                                 | + (0) | + (0) | 0   | na <sup>e</sup>                 |
| 12/97    | + (-1)                                | + (0) | –     | 1   | na                              |
| 03/98    | –                                     | –     | –     | 0   | na                              |
| 07/98    | +                                     | –     | –     | 0   | na                              |
| 10/98    | + (0)                                 | + (0) | –     | 0   | na                              |
| 12/98    | +                                     | +     | –     | 0   | na                              |

<sup>a</sup> Resultados por PCR anidada en 2 ml de concentrado (equivalente a 10 l de agua del río Ter) para la detección de adenovirus, y 1 ml de concentrado para enterovirus y hepatitis A (equivalente a 5 l de agua). Se indica entre paréntesis la última dilución positiva por PCR anidada.

<sup>b</sup> Datos apartados por los colaboradores indicados en el apartado 1.2.4.

<sup>c</sup> Resultados por cultivo celular sobre BGM en 20 ml de concentrado (equivalente a 100 l de agua)

<sup>d</sup> ufc/100 ml de muestra

<sup>e</sup> na, no analizado

### 2.3.3.2.3. Contaminación vírica del agua de mar

Se analizaron 23 muestras de agua del mar, recogidas en diferentes puntos a lo largo de la costa del Barcelonés, en la línea de playa. Estas muestras presentan niveles de coliformes fecales entre  $10^1$  y  $10^4$  ufc en 100 ml. Otras características microbiológicas se resumen en la Tabla 2.2.

La recuperación de partículas víricas en 14 de las muestras, recogidas entre los meses de julio y septiembre de 1995, se realizó siguiendo el mismo protocolo aplicado a las muestras de agua de río. Los análisis por PCR anidada dieron resultado negativo para todos los virus estudiados, aunque se podían detectar EV por RT-PCR en 3 muestras que fueron suplementadas con Poliovirus tipo 1. Asimismo, ninguna de las muestras dio resultado positivo sobre células BGM.

Nueve muestras recogidas entre diciembre de 1996 y abril de 1997 se concentraron por filtración-elución sobre filtros de acetato-nitrato de celulosa seguido de elución y ultracentrifugación (apartado 2.2.3.3.). Las muestras 1-4, que presentan niveles de coliformes fecales del orden de  $10^4$  ufc/100 ml fueron tomadas en puntos próximos a la desembocadura del emisario de San Adrián (Tabla 2.16.). Los resultados obtenidos por PCR anidada dieron un resultado positivo para AdH en 7 de las 9 muestras, en 50 ml de agua analizada. Se detectó la presencia de EV por RT-PCR anidada en 4 de 9 muestras en 25 ml de agua. La presencia del VHA se demostró en 3 de las 9 muestras estudiadas, en 25 ml de agua: una positiva también para AdH, y 2 positivas simultáneamente para AdH y EV (Tabla 2.16.).

La concentración máxima de partículas víricas estimada a partir del experimento de la dilución límite sería de 2 PV de AdH por ml, y entre 0,4 PV de EV o 0,4 EG de VHA por ml en las muestras positivas.

Se ha observado equivalencia entre las muestras positivas para AdH y las muestras positivas para fagos de *Bact. fragilis*, excepto en la muestra 8 en que no se detectaron fagos en 100 ml de agua, mientras que el análisis por PCR o RT-PCR anidada dio un resultado positivo para AdH en 50 ml de muestra y para EV en 25 ml de muestra (Tabla 2.16.).

**TABLA 2.16.**  
**Análisis microbiológico y virológico de muestras de agua de mar**

| Muestras | Análisis por PCR anidada <sup>a</sup> |       |       | Bacteriología <sup>b</sup>      | Bacteriofagos <sup>b</sup>                  |
|----------|---------------------------------------|-------|-------|---------------------------------|---|
|          | AdH                                   | EV    | VHA   | Coliformes fecales <sup>c</sup> | Fagos de <i>Bact. fragilis</i> <sup>d</sup> |
| 1        | + (-1)                                | + (0) | + (0) | 16875                           | 1   |
| 2        | + (0)                                 | -     | + (0) | 13800                           | na <sup>e</sup>                             |
| 3        | + (-1)                                | + (0) | + (0) | 11400                           | na  |
| 4        | + (0)                                 | -     | -     | 24540                           | na  |
| 5        | -                                     | -     | -     | 430                             | 0   |
| 6        | + (0)                                 | -     | -     | 220                             | 0,58  |
| 7        | + (-1)                                | + (0) | -     | 330                             | 1,16  |
| 8        | + (0)                                 | + (0) | -     | 160                             | 0   |
| 9        | -                                     | -     | -     | 100                             | 0   |

<sup>a</sup> Resultados por PCR anidada en 50 ml de agua de mar para la detección de adenovirus, y 25 ml para enterovirus y hepatitis A. Se indica entre paréntesis la última dilución positiva por PCR anidada.

<sup>b</sup> Datos proporcionados por J. Méndez y J. Dellundé

<sup>c</sup> ufc/100 ml de agua

<sup>d</sup> UFC/100 ml de agua

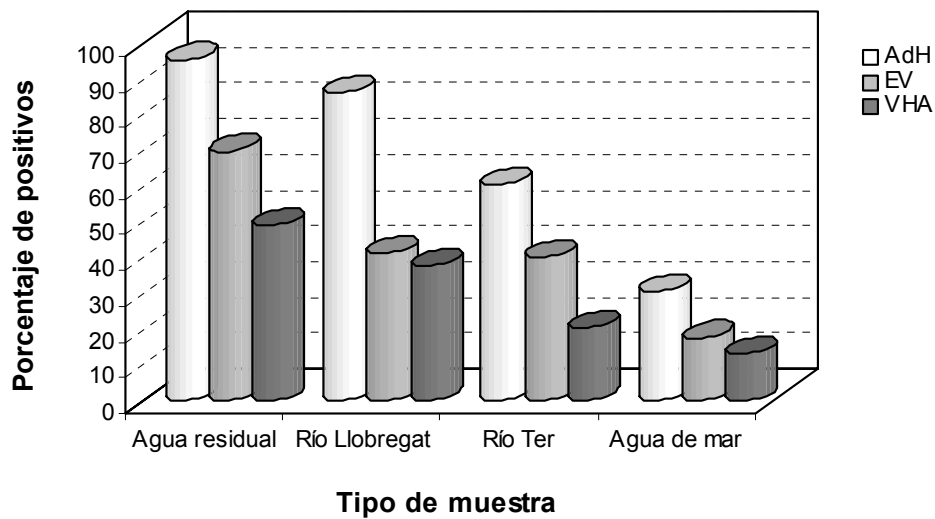
<sup>e</sup> na, no analizado

### 2.3.3.3. Variación anual y estacional de la contaminación vírica en el ambiente

A partir de los datos obtenidos sobre la prevalencia de los virus entéricos de origen humano en aguas residuales y superficiales en el período 1994–1999 se ha podido observar la evolución anual y estacional de la contaminación vírica del medio.

Los datos obtenidos indican diferencias en los niveles de contaminación viral entre las muestras de diversos orígenes, detectando niveles superiores de los tres virus de origen humano estudiados en aguas residuales, y los niveles inferiores en las muestras del río Ter, donde el factor de dilución es mayor. Los AdH se encuentran con mayor frecuencia en cualquier tipo de medio (Figura 2.11.).

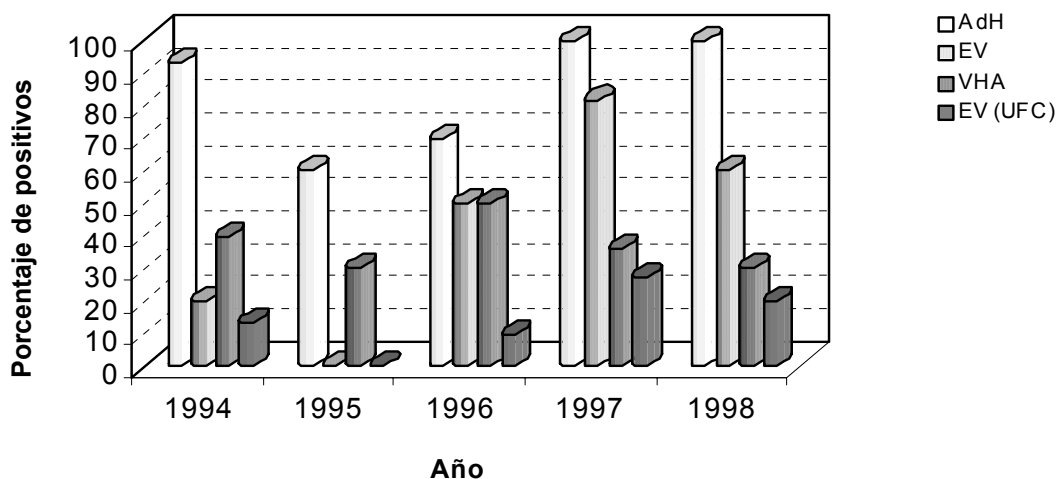
Se construyeron tablas de contingencia, y mediante el análisis estadístico exacto de Fisher se comprobó que no existían diferencias significativas entre la prevalencia de AdH y VHA en agua residual y en el agua del río Llobregat, encontrando diferencias en la prevalencia de EV en ambos medios.



**Figura 2.11.**  
Prevalencia de AdH, EV y VHA en aguas superficiales y residuales.

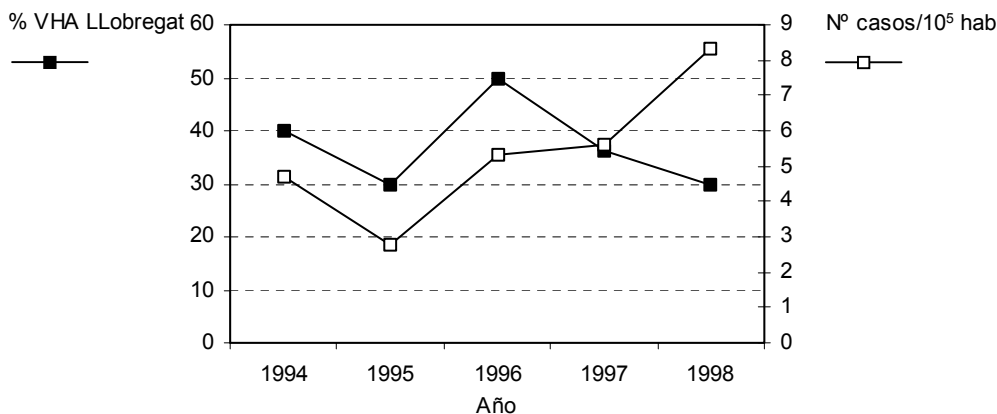
Teniendo en cuenta los datos obtenidos a partir del estudio de la contaminación vírica del río Llobregat, se ha podido apreciar una disminución en todos los parámetros víricos estudiados durante el año 1995. AdH se detectaron en un 93% de las muestras durante 1994, reduciéndose hasta el 60% en 1995, seguido de una recuperación para llegar a ser positivas el 100% de las muestras en 1997 y 1998 (Figura 2.12.).

En el caso de EV, se observó una disminución en 1995 pasando de ser detectado ARN por PCR en un 20% y enterovirus infecciosos en un 13,3%, a no detectarse en ninguna muestra durante 1995. Posteriormente los niveles alcanzaron un máximo en 1997 con un 81,8% de las muestras positivas por PCR, y un 27,2% de las muestras con enterovirus infecciosos sobre células BGM (Figura 2.12.).



**Figura 2.12.**  
Evolución de la contaminación vírica del río Llobregat entre 1994 y 1998.

Los niveles de VHA observados en el río Llobregat durante todo el período oscilan entre un 30 y un 50% (Figura 2.12.), con un mínimo durante 1995 que coincide con valores mínimos en la tasa de incidencia registrada durante el mismo año (Figura 2.13.).

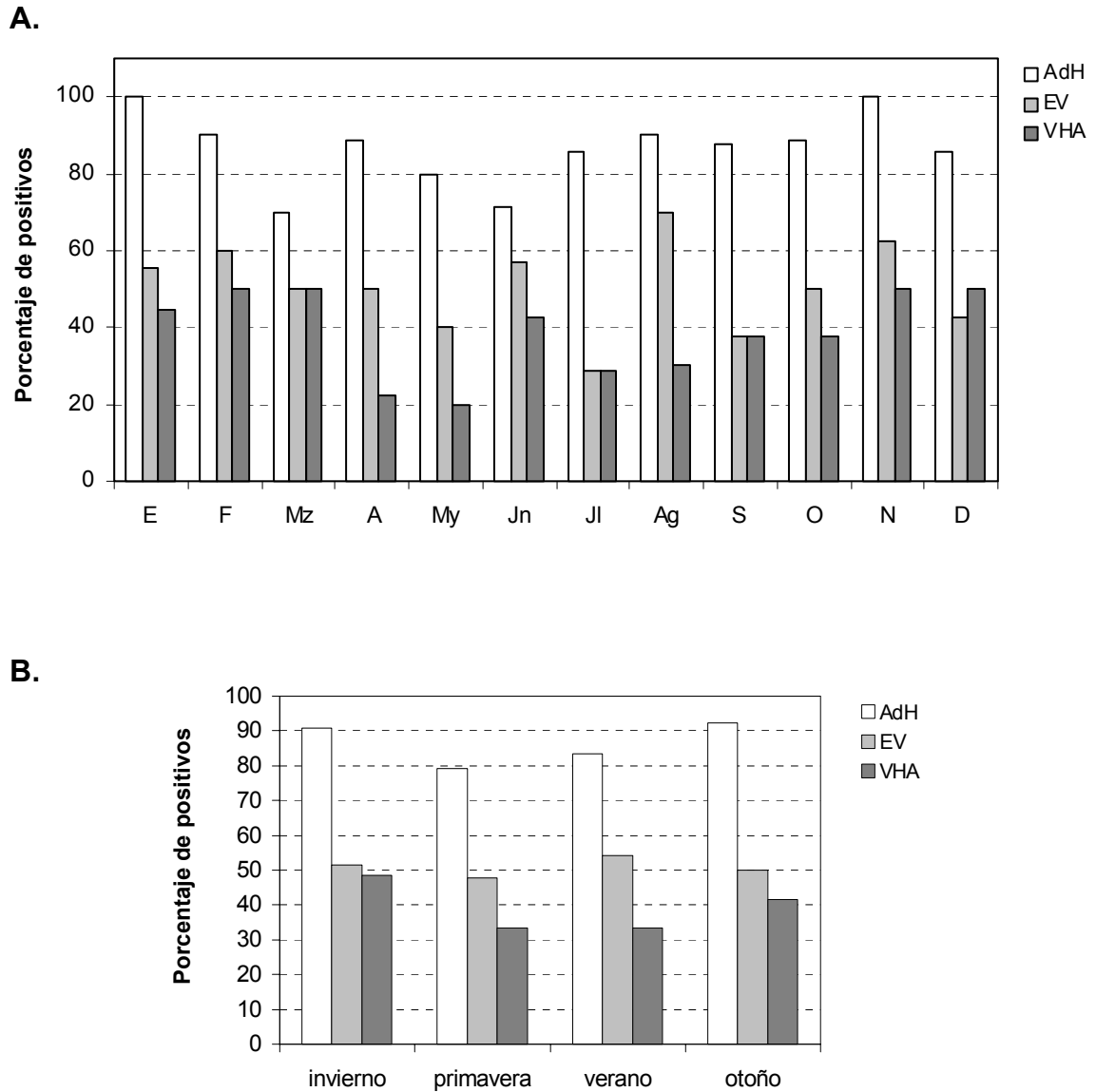


**Figura 2.13.**  
Evolución en la tasa de incidencia de la hepatitis A y de la prevalencia del VHA en agua del río Llobregat durante el periodo 1994-1998.

Considerando todos los datos combinados sobre la prevalencia de AdH, EV y VHA obtenidos de los análisis de las muestras de aguas residuales y aguas naturales superficiales, se ha podido observar su evolución estacional (Figura 2.14.). Nuestros datos sugieren que los tres parámetros estudiados aparecen durante todos los meses del año (Figura 2.14.A.), si bien



se puede apreciar una mayor frecuencia en la detección de AdH y VHA en los meses más fríos, y EV ligeramente más abundante en verano (Figura 2.14.B.).



**Figura 2.14.** Variación estacional de la contaminación vírica del medio acuático (datos combinados a partir de todas las muestras).

## **2.4. DISCUSIÓN**

Una gran cantidad de virus de origen humano se excretan a través de las heces y la orina de individuos infectados. Estos llegan a las aguas residuales y se dispersan en el medio, pudiendo llegar a contaminar posibles fuentes de abastecimiento de agua y alimentos que se convierten en focos potenciales de nuevas infecciones. En estos medios la concentración de virus suele ser habitualmente muy baja. En muchos brotes de enfermedades de transmisión hídrica presumiblemente de origen vírico, es difícil identificar el agente etiológico debido a la falta de métodos lo suficientemente sensibles y fiables. En este capítulo se ha descrito una metodología basada en técnicas moleculares para la detección de virus entéricos de origen humano que son excretados al medio ambiente. El procedimiento descrito se ha aplicado al estudio de muestras de aguas superficiales con diferente grado de contaminación (aguas residuales, aguas de río y de mar), y se ha modificado para facilitar su aplicación en laboratorios de Salud Pública y empresas interesadas en el control microbiológico del agua.

La concentración de partículas víricas a partir de las muestras de agua supone el desarrollo de técnicas lo más simple posibles que permitan la máxima eficiencia, evitando la recuperación de moléculas inhibitoras de las subsiguientes reacciones enzimáticas que nos permitirán detectar el genoma vírico. Las muestras de agua residual analizadas del área metropolitana de Barcelona contienen una alta concentración de material fecal, por lo que no se requiere la concentración de grandes volúmenes para poder analizar los diversos parámetros víricos. El método aplicado basado en la recuperación de los virus adsorbidos a materia orgánica, elución y posterior concentración por ultracentrifugación en un pequeño volumen puede ser aplicado a muestras con diversos grados de contaminación fecal, permitiendo además la eliminación de sustancias inhibitoras de la PCR que suponen un problema muy común en el análisis de muestras ambientales (Kopecka y col., 1993; Wilson, 1997). Estudios previos demostraron un porcentaje de recuperación de Poliovirus tipo 1 a partir de aguas residuales de un 70% (Puig y col., 1994).

En muestras con niveles medios o bajos de contaminación (muestras de agua de río y mar), sin embargo, es necesario una concentración primaria. La recuperación de virus por filtración-elución sobre filtros electropositivos (Sobsey y Jones, 1979; Sobsey y Glass, 1980)

seguido de floculación orgánica, ha sido aplicado en estudios ambientales (APHA, 1995; Vidal y col., 1997; Abbaszadegan y col., 1999) y en nuestros trabajos se obtuvieron buenos resultados en aguas de río. La utilización de extracto de carne favorece la elución de los virus a partir de los filtros electropositivos (Sobsey y Jones, 1979; Sobsey y Glass, 1980), pero puede interferir con los métodos moleculares de detección si no se elimina posteriormente durante la concentración secundaria (Schwab y col., 1995), o bien durante la extracción de ácidos nucleicos utilizando GuSCN (Gilgen y col., 1997).

Este mismo método aplicado a muestras de agua de mar no dio resultados positivos. La adsorción de las partículas víricas a la superficie de los filtros microporosos depende del pH, la concentración salina, los niveles de materia orgánica en suspensión, las características de las partículas víricas, y probablemente otros factores (Oshima y col., 1995; Lukasik y col., 2000). Estudios previos habían demostrado su eficiencia en la recuperación de reovirus pero no de enterovirus (Muscillo y col., 1994; Patti y col., 1996). Alternativamente la filtración-elución sobre filtros de acetato-nitrato de celulosa (Sinton y col., 1996) aplicado a este tipo de muestras proporcionaba resultados satisfactorios en la recuperación de bacteriófagos de bacterias entéricas (N. Contreras, comunicación personal), y según nuestros datos permitía también la recogida de virus entéricos de origen humano (Pina y col., 1998c), simplificando considerablemente la concentración primaria de muestras de agua de mar.

En cualquier caso, la concentración final de partículas víricas por ultracentrifugación a partir de cualquier tipo de muestra requiere un equipamiento muy costoso, que en muchos casos no es asequible a laboratorios pequeños. Una alternativa sería la recuperación de partículas víricas por ultrafiltración, aunque la colmatación de los filtros suele ser rápida y el caudal de filtración pequeño. Los datos obtenidos en este estudio indican que la recuperación de partículas víricas a partir de pequeños volúmenes por ultrafiltración podría sustituir al método convencional de concentración por ultracentrifugación en análisis rutinarios, pudiendo reducir así considerablemente el gasto en equipamiento. La aplicación de técnicas de ultrafiltración había demostrado ser eficiente en la recuperación de virus entéricos a partir de agua de mar (Patti y col., 1996) y aguas potables (Soule y col., 2000), permitiendo una reducción del título de poliovirus de  $>6$  log en ciertas soluciones (Oshima y col., 1995).

El procedimiento de extracción de ácidos nucleicos descrito por Boom y col. en 1990, fue escogido a partir de estudios previos en que se compararon varios métodos (Puig y col., 1994). Este método utiliza el GuSCN para la desnaturalización de las cápsides proteicas y ribonucleasas. Los ácidos nucleicos libres se adsorben sobre la superficie de partículas de

sílice, lo que permite que puedan ser lavados para eliminar sustancias inhibitoras. La elución final permite la máxima recuperación de ácidos nucleicos (ADN o ARN) de una forma simple y barata, en un tiempo máximo de 2 h.

Los iniciadores utilizados para la detección de adenovirus, escogidos a partir de estudios previos (Allard y col., 1990; Allard y col., 1992; Girones y col., 1993; Puig y col., 1994), permiten detectar todos los serotipos de adenovirus humanos. Cuando se utilizan de forma combinada para realizar PCR anidada se puede llegar a detectar el ADN correspondiente a una partícula vírica, y han demostrado una gran especificidad (Allard, 1992; Pina y col., 1998c). Asimismo los iniciadores específicos de enterovirus permiten la detección de 24 serotipos de enterovirus (Puig y col., 1994) con un nivel de sensibilidad de  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  UFC, que según lo estimado correspondería 1-10 partículas víricas. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por otros autores utilizando la PCR anidada para el análisis de muestras clínicas (Severini y col., 1993). Según esto, la sensibilidad obtenida por el método de detección molecular sería de 100 a 1000 veces superior a la proporcionada por las técnicas clásicas de cultivo celular (Puig y col., 1994; Gilgen y col., 1997; Puig y col., 2000).

La detección de virus entéricos de origen humano por las técnicas moleculares desarrolladas proporciona la máxima sensibilidad y especificidad, y permite obtener datos reales sobre la prevalencia de estos patógenos en el ambiente, solucionando así las limitaciones técnicas que suponen el aislamiento de muchos de estos virus sobre líneas celulares. En estudios previos realizados en aguas residuales y aguas de río, se aislaron sobre líneas celulares una gran cantidad de reovirus y enterovirus, siendo los adenovirus los menos prevalentes (Irving y Smith, 1981; Sellwood y col., 1981). No obstante es difícil conseguir multiplicar y aislar muchos adenovirus ya que sobre misma línea pueden ser infectada por más de un virus, y los de crecimiento lento son subestimados cuando existen virus de crecimiento más rápido (Irving y Smith, 1981; Sellwood y col., 1981; Tani y col., 1995). La utilización de varias líneas celulares para el aislamiento e identificación de diversos virus supone, un coste muy elevado y no garantiza la obtención de resultados fiables (Irving y Smith, 1981; Tani y col., 1992; Tani y col., 1995). Muchos virus, además, no producen efecto citopático y su detección e identificación final implicaría la utilización de técnicas inmunológicas o moleculares (Van Loon y col., 1999; Grabow y col., 1999). La utilización de forma combinada el cultivo celular seguido de RT-PCR para facilitar la detección de virus de crecimiento lento o que no producen efecto citopático, puede reducir los efectos de los

inhibidores de la PCR y permite además el análisis de volúmenes mayores de muestra (Chapron y col., 2000), aunque implica una mayor complejidad de la técnica y un aumento en el coste económico.

Según nuestros datos el número de muestras positivas para adenovirus humanos es más alto que lo descrito en trabajos previos (Sellwood y col., 1981; Tani y col., 1992; Tani y col., 1995) debido a la mayor sensibilidad de la técnica utilizada frente al cultivo celular (Girones y col., 1993; Puig y col., 1994; Pina y col., 1998c), y aparecen con más frecuencia que los EV. Se detectaron AdH en un 95% de las muestras de agua residual, un 87% de las muestras del río Llobregat, un 60% de las muestras del río Ter, y un 77% de las muestras de agua de mar recogidas en puntos con elevados niveles de contaminación fecal. Los estudios realizados a partir de muestras con elevado contenido en material fecal de origen animal corroboran los estudios previos que habían indicado la posibilidad de detectar alguna cepa de origen animal por PCR utilizando solamente los iniciadores externos (Allard, 1992). La utilización combinada de los dos pares de iniciadores, sin embargo, asegura la detección de adenovirus de origen exclusivamente humano.

De forma clásica, siguiendo los métodos estándar generalmente aceptados, se han estado utilizando los enterovirus detectados sobre líneas celulares como índice de la presencia de otros virus entéricos humanos. Varios estudios han demostrado que la mayoría de los enterovirus aislados a partir de muestras ambientales sobre líneas celulares serían cepas de poliovirus de origen vacunal (Lucena y col., 1986; Sellwood y col., 1995; Grabow y col., 1999). En España, al igual que en muchos otros países, la vacuna oral contra la poliomielitis se administra actualmente en niños en edades muy tempranas (2, 4 y 15 meses), lo que limita la dispersión de los virus en el ambiente, ya que se eliminan en los pañales y son tratados como residuos sólidos. La última dosis de virus atenuados que acostumbra a administrarse a los 6 años de edad normalmente no se multiplica en el intestino. Esto podría influir en una disminución de las cepas vacunales circulantes. En ocasiones, además, la titulación de EV infecciosos no es posible debido a la toxicidad elevada de las muestras. Recientemente se han descrito métodos alternativos al método clásico de titulación sobre monocapas de células BGM, que permiten el recuento de enterovirus adsorbidos sobre filtros de nitrato de celulosa (Papageorgiou y col., 2000), simplificando considerablemente su enumeración.

Diversas razones apoyan la hipótesis que los adenovirus humanos detectados por PCR podría ser considerado como un índice de contaminación fecal vírica de origen humano mejor que los enterovirus:

1. Su origen es exclusivamente humano, excretándose en grandes cantidades a través de las heces y la orina, y no se multiplican en el ambiente.
2. Los adenovirus y el VHA son más estables en el ambiente que los enterovirus, y más resistentes a la radiación ultravioleta y procesos de tratamiento de depuración (Irving y Smith, 1981; Peterson y col., 1983; Enriquez y col., 1995; Gantzer y col., 1998).
3. El alto número de muestras positivas para adenovirus y otros virus de origen humano, y negativas para enterovirus en cualquier ambiente. (Irving y Smith, 1981; Puig y col., 1994; Pina y col., 1998c; Vantarakis y Papapetropoulou, 1998 y 1999).
4. La detección de adenovirus humanos por PCR anidada proporciona información sobre la calidad virológica del agua de forma rápida (aproximadamente 48 h), siendo la técnica más sensible y específica.

La detección de ARN genómico de EV por RT-PCR anidada resulta, además, más compleja debido a la necesidad de pasar por un proceso de síntesis de ADNc. Este paso implica una manipulación adicional de la muestra que hace aumentar el riesgo de contaminaciones cruzadas. La ausencia de EV en una muestra no se relaciona en muchos casos con la ausencia de otros virus como el VHA.

Se compararon las concentraciones de colifagos somáticos, colifagos F-específicos y fagos de *Bacteroides fragilis* con la cantidad de virus de origen humano detectados por PCR en muestras de agua residual. Se encontró correlación significativa entre la presencia de virus humanos (EV y VHA) respecto a la presencia de colifagos somáticos y fagos de *Bact. fragilis*. Estos datos son consistentes con los estudios realizados por Gantzer y col., en 1998, que habían demostrado una correlación significativa entre la concentración de colifagos somáticos y fagos de *Bact. fragilis* y la presencia de enterovirus infecciosos o la presencia de ARN genómico de enterovirus. La falta de correlación observada entre AdH respecto a los demás parámetros es probablemente debida a la elevada prevalencia en todas las muestras analizadas.

El estudio de las muestras de agua de río confirma la falta de correlación entre coliformes fecales y la presencia de virus de origen humano determinados por PCR, ya que muestras con valores inferiores a 10 ufc/100 ml dieron resultado positivo para AdH, y EV o VHA. Los indicadores bacterianos utilizados normalmente, presentan limitaciones para asegurar la ausencia de parásitos y virus en el medio (Bosch y col., 1986; Nasser y col., 1993; Wyer y col., 1995). La determinación de la presencia de enterovirus infecciosos sobre células BGM no proporciona la suficiente sensibilidad para ser aceptado como índice de la presencia

de otros virus, como se deduce del bajo porcentaje de muestras positivas (9 muestras con 1-4 UFC/20-100 l de agua de 66 muestras de agua de río analizadas), en comparación con la detección de ARN de EV por RT-PCR anidada (27 muestras positivas de 66 muestras de agua de río analizadas). Estos resultados son probablemente debidos a la mayor eficiencia del método, la detección de partículas no infecciosas que no se multiplican en cultivo celular pero que son detectadas por técnicas moleculares (Gantzer y col., 1998), y a la presencia de cepas no citopatogénicas (Grabow y col., 1999).

Aunque los virus entéricos son excretados al ambiente en grandes cantidades (de  $10^8$  a  $10^{10}$  partículas por gramo de heces), una gran proporción son partículas no infecciosas. En cultivos celulares se ha observado una relación entre partículas formadoras de calvas/partículas físicas de 1:100 a 1:1000. Los virus excretados al medio están sometidos a procesos de inactivación natural que afectan a su supervivencia y estabilidad de la partícula vírica (Schwartzbrod, 1991; Girones y col., 1989a; Girones y col., 1989b). Estos se deben principalmente a factores físicos (luz, temperatura, fenómenos de adsorción, agregación, presión hidrostática), químicos (pH, metales pesados, oxígeno disuelto, iones) y bióticos, entre los que encuentran la actividad de ciertas bacterias y algas, depredación y la naturaleza del propio virus.

Se ha estudiado la estabilidad a lo largo del tiempo de Poliovirus tipo 1 en agua residual y en PBS a 20°C, demostrando que el título por PCR se mantiene igual que el inicial en cualquier medio hasta los dos meses después de iniciar el experimento (Capítulo 5).

La detección de EV, VHA o cualquier otro virus con genoma de ARN demuestra en cualquier caso la presencia de ARN vírico encapsidado, puesto que el ARN libre sería rápidamente degradado (Limsawat y Ohgaki, 1997; Kopecka y col., 1993). Se ha descrito la presencia de enzimas con actividad endorribonucleasa asociada con ciertos virus de ARN de origen animal, que sería también responsable de la inactivación vírica sin afectar a las cápsides (Kolakofsky y Altman, 1978; Denoya y col., 1978a; Denoya y col., 1978b; Scodeller y col, 1984). El ADN al ser más estable podría persistir durante más tiempo en el ambiente. Jiang y Paul en 1995, demostraron la presencia de ADN libre en ecosistemas marinos como parte del ADN filtrable.

La detección molecular por amplificación enzimática puede servir como índice de la presencia de virus pero no implica necesariamente que sean partículas infectivas, indica en cualquier caso una fuente de contaminación viral y un riesgo potencial (Abbaszadegan y col., 1999). El riesgo de infección real que supone la presencia de virus en el ambiente es difícil de

predecir, y esto implica el conocimiento de la dosis infecciosa mínima. Los datos disponibles indican que para algunos virus de origen humano, entre los que se encuentran los enterovirus, dosis de 1-2 UFC podrían producir una infección. El riesgo anual de infección por enterovirus se ha estimado en 1:10000 personas, suponiendo una concentración de 1 UFC/1000 l de agua de bebida y asumiendo una ingestión de 2 l/persona/día (Gerba y Haas, 1988).

Los datos recogidos durante el período 1994-1999 permiten observar la evolución estacional y anual de los parámetros víricos estudiados. Estos sugieren que los tres virus estudiados aparecen durante todos los meses del año, si bien se puede apreciar una mayor frecuencia en la detección de AdH y VHA en los meses más fríos, y EV ligeramente más abundante en verano. Estos datos concuerdan con la bibliografía en cuanto a la distribución temporal de los casos de hepatitis A declarados a lo largo del año, que muestra una acumulación hacia finales del invierno (Domínguez y col., 1995). En cuanto a los EV, estudios anteriores habían demostrado una mayor frecuencia en aguas superficiales durante los meses de verano y otoño (Sellwood y col., 1981; Krikelis y col., 1985; Carducci y col., 1995; Hovi y col., 1996). Diversos factores químicos, físicos y microbiológicos afectan a la estabilidad y supervivencia de las partículas víricas en el medio acuático, entre ellos las variaciones estacionales en la temperatura del agua (las bajas temperaturas del agua durante los meses fríos aumentan el tiempo de supervivencia de los virus) (Geldenhuis y Pretorius, 1989; Gantzer y col., 1998) y los períodos de lluvias (Hurst, 1991).

Los resultados obtenidos a partir del análisis periódico de muestras del río Llobregat entre 1994 y 1998 sugieren la existencia de oscilaciones anuales de la contaminación viral, encontrándose un mínimo en el año 1995. Estudios previos habían apuntado a la posibilidad de aparecer patrones cíclicos en la incidencia de ciertas infecciones víricas, que dan lugar a años de altos niveles de aislamientos precedidos por años de bajos niveles de virus (Walter y col., 1982). La dinámica para cada virus es diferente. En el caso del VHA, los registros sanitarios describen un mínimo en la tasa de incidencia de la enfermedad durante el año 1995 en Cataluña y una recuperación posterior (Departament de Sanitat i Seguretat Social, 1991-2000). Las infecciones por AdH o EV son más difíciles de documentar debido a la gran cantidad de casos asintomáticos, casos cuyo agente etiológico no ha sido identificado y a que las enfermedades que causan no son de declaración obligatoria (Gerba y Haas, 1988; Hovi y col., 1996).

La utilización de las técnicas moleculares en estudios ambientales proporciona información muy valiosa a tiempo real sobre la incidencia de las infecciones víricas en la



población, que de otra forma no podrían identificarse. La utilización de la PCR como herramienta habitual aplicada al control virológico de las aguas superficiales requiere la aplicación de normas de trabajo estrictas para evitar falsos negativos y contaminaciones cruzadas, y personal especializado. Alternativamente la PCR es una herramienta que permite obtener datos epidemiológicos muy valiosos, como puede ser el estudio de la variabilidad de cepas de un virus que circulan entre la población (Pina y col., 1998b; Pina y col., 2000; Bofill-Mas y col., 2000) y que se discutirán en los capítulos 4 y 5 de este trabajo.



*Capítulo 3.*

*Detección de virus entéricos de origen  
humano en moluscos bivalvos*

---



### **3.1. INTRODUCCIÓN**

Numerosos brotes infecciosos de origen vírico están relacionados con el consumo de moluscos bivalvos que han crecido en aguas contaminadas, principalmente hepatitis A y gastroenteritis por virus de Norwalk.

La falta de métodos estandarizados que permitan el control virológico de los moluscos bivalvos hace necesario el desarrollo de estrategias que hagan posible el estudio de la contaminación vírica, de forma sencilla y rápida, que no supongan un elevado coste económico y que puedan ser aplicables de forma rutinaria por laboratorios de diagnóstico.

Con el propósito de controlar esta problemática, se ha establecido una normativa para controlar la calidad sanitaria de las aguas destinadas a la producción, así como la reglamentación técnico-sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos destinados al consumo humano directo o a la transformación previa a su consumo (Directiva del Consejo 91/492/CEE; Real Decreto 308/1993 y 571/1999), y que se describe en el Capítulo 1 de esta memoria. Sin embargo esta legislación únicamente contempla parámetros bacterianos, que no son de ningún modo descriptivos de la calidad virológica de las muestras en cuestión. Esto ha conducido a la evaluación de indicadores alternativos, entre ellos, virus de origen humano (enterovirus y adenovirus humanos) (Pina y col., 1998c) y los bacteriófagos de bacterias entéricas (Lucena y col., 1994; Doré y col., 2000; Muniain-Mujika y col., 2000).

El estudio de la contaminación vírica de los moluscos bivalvos requiere la aplicación de métodos fácilmente reproducibles y que demuestren la máxima eficiencia, únicamente conseguido con las técnicas moleculares. Esto supone varias limitaciones:

- i) *La recuperación de partículas víricas.* Se han propuesto numerosos métodos para la extracción y concentración de bajas cantidades de virus a partir de los tejidos de moluscos bivalvos, la mayoría muy complejos. Estos incluyen la elución con soluciones ácidas (Sobsey y col., 1978) o básicas (Atmar y col., 1993; Lees y col., 1994; Häfliger y col., 1997; Pina y col., 1998c), floculación orgánica (Lucena y col., 1991), precipitación con polietilenglicol (Lees y col., 1994; Atmar y col., 1995), junto con la adición de polielectrolitos (Atmar y col., 1995) o tratamientos con freón para eliminar sustancias

inhibidoras (Lees y col., 1994), y concentración por ultracentrifugación (Pina y col., 1998c) o ultrafiltración (Sobsey y col., 1978; Lees y col., 1994).

- ii) *La extracción de ácidos nucleicos.* Junto con el primer paso debe ser capaz de eliminar las sustancias inhibidoras que podrían interferir en el proceso de detección. Varias aproximaciones han utilizado la digestión con proteinasa K, seguido de extracción con fenol y precipitación con etanol y bromuro de cetilmetilamonio (CTAB) (Schwab y col., 1998); extracción mediante lisis con guanidinium isotiocianato y recuperación de los ácidos nucleicos por adsorción sobre soportes de sílice (Lees y col., 1994; Pina y col., 1998c).
- iii) *La técnica de detección de virus.* Debe proporcionar la máxima sensibilidad y especificidad, y permitir la detección y/o identificación de virus en el mínimo tiempo posible. Se han propuesto varias estrategias, entre ellas la ampliación enzimática por RT-PCR o PCR, seguido de hibridación con sondas específicas o PCR anidada.

En este capítulo se describe la adecuación de la metodología descrita en el Capítulo 2 al estudio de la contaminación vírica de los moluscos bivalvos. Los objetivos planteados en este capítulo son:

- ★ Desarrollar una metodología lo más simple posible para recuperar las partículas víricas a partir del tejido de moluscos bivalvos, y que permita, además, la eliminación de sustancias inhibidoras de los procesos de detección posteriores.
- ★ Valorar la eficiencia de la recuperación y detección de virus a partir de muestras dopadas.
- ★ Aplicar la metodología desarrollada para detectar virus patógenos de origen humano en moluscos bivalvos.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. ESTUDIO DE MUESTRAS DE MEJILLONES DE MERCADO**

Para valorar inicialmente la posibilidad de aplicar la metodología descrita en el Capítulo 2 de este trabajo al estudio de la contaminación vírica de los moluscos bivalvos, se utilizaron muestras de mejillones de mercado que teóricamente cumplieran la normativa de la Unión Europea en cuanto a niveles bacterianos máximos para ser considerados aptos para el consumo.

#### **3.2.1.1. Valoración de la eficiencia en recuperación de virus a partir de tejido de mejillón**

Para el estudio inicial se tomaron 3 muestras de mejillones depurados comerciales (*Mytilus galloprovincialis*). Los animales se limpiaron externamente con agua y etanol antes de proceder a su apertura en condiciones asépticas.

Se homogeneizaron 50 g de mejillón con una batidora descartando el líquido intervalvar, y se doparon con Poliovirus tipo 1 ( $10^5$  UFC/g de tejido), incubando durante de 30 min a temperatura ambiente en agitación. Los virus adsorbidos se eluyeron con 50 ml de tampón glicina 0,25 M pH 9,5 en hielo durante 30 min en agitación. Tras la adición de 20 ml de PBS 2×, los sólidos en suspensión se separaron por centrifugación a  $48.400 \times g$  (centrifuga Beckman J2-21, rotor JA20) durante 30 min. Las partículas víricas contenidas en el sobrenadante (aproximadamente 40 ml) se recuperaron por ultracentrifugación a  $229.600 \times g$  durante 1 h a  $4^\circ\text{C}$ , y fueron finalmente resuspendidas en 100  $\mu\text{l}$  de PBS.

Paralelamente se realizó el mismo tratamiento a los mejillones sin dopar siguiendo el método descrito.

La extracción de ácidos nucleicos a partir de los concentrados víricos se realizó como se describe en el apartado 2.2.5.1., y se realizaron diluciones decimales seriadas de la suspensión obtenida para evaluar el límite de detección por amplificación enzimática.

La detección molecular de Poliovirus tipo 1 en las muestras de mejillones de mercado suplementadas o no con virus, se realizó como se describe en el Capítulo 2 (apartado 2.2.5.), analizando el equivalente a 0,5 g de tejido por reacción.

### **3.2.2. ESTUDIO DE MUESTRAS DE MOLUSCOS BIVALVOS NATURALES**

#### **3.2.2.1. Muestras de bivalvos naturales**

Para el estudio de muestras de bivalvos naturales se recogieron 4 muestras de mejillones (*M. galloprovincialis*) y 1 muestra de almejas (*Mercenaria mercenaria*) en la bahía de Alfac del delta del Ebro. Se tomaron, además, 2 muestras de mejillones en la zona costera de Gavá. Las muestras se conservaron a 4°C y se transportaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento. Los animales se limpiaron externamente con agua y etanol antes de proceder a su apertura en condiciones asépticas.

#### **3.2.2.2. Recuperación de virus a partir de muestras naturales**

Se homogeneizaron 100 g de tejido con una batidora, descartando previamente el líquido intervalvar. Los virus adsorbidos se eluyeron con 200 ml de tampón glicina 0,25 M pH 10±0,2 en agitación orbital durante 30 min. Tras la eliminación de los sólidos en suspensión por centrifugación a 2500×g (centrifuga Beckman J2-21, rotor JA10) durante 15 min a 4°C, se recogió el sobrenadante que se ajustó a pH 7±0,2 con HCl 35% (clarificado-1), y se reservó 100 ml de esta suspensión para posteriores análisis. El resto (aproximadamente 200 ml) se centrifugó a 48.400 ×g (centrifuga Beckman J2-21, rotor JA20) durante 45 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante (clarificado-2) para el análisis de virus de origen humano. Las partículas víricas contenidas en 8 ml de clarificado-2 se recuperaron por ultracentrifugación a 229.600 ×g durante 1 h a 4°C, y fueron finalmente resuspendidas en 200



μl de PBS, obteniendo un concentrado vírico de aproximadamente 300 μl, que se conservó a –80°C hasta el momento de su análisis.

### **3.2.2.3. Indicadores clásicos de contaminación**

#### **3.2.2.3.1. Coliformes fecales**

Se mezclaron 50 g de tejido homogeneizado con 50 ml de PBS durante 20 min en agitación. Se hicieron diluciones decimales en solución tamponada Ringer ¼. El recuento de coliformes fecales en las muestras de moluscos bivalvos naturales se realizó siguiendo métodos estandarizados (APHA, 1995). Estos análisis fueron realizados por Françoise Lhoest.

#### **3.2.2.3.2. Enterovirus infecciosos**

La determinación de la presencia de enterovirus infecciosos se realizó básicamente como se indicó en el apartado 2.2.4.1. Se inoculó 5 ml de clarificado-2 (equivalente a 2 g de tejido) previamente descontaminado con cloroformo, sobre células BGM creciendo en placas de cultivo de 56,7 cm<sup>2</sup> (92×21 mm) (1 ml o 0,5 ml por placa), que se incubaron 60 min a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adsorción vírica. Pasado este tiempo se eliminó el inóculo y se cubrieron las células con medio MEM suplementado con 1,5% de bicarbonato sódico, 2 mM de L-glutamina, 200 U/ml de penicilina, 200 μg/l de estreptomicina y 0,7% de agar purificado. Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo se retiró el medio, y se añadió una solución colorante fijadora.

### **3.2.2.4. Detección molecular de virus de origen humano**

#### **3.2.2.4.1. Extracción de ácidos nucleicos**

La extracción de ácidos nucleicos se realizó básicamente por el método de Boom (Boom y col., 1990) con algunas modificaciones. De manera breve: a partir de 300 μl de concentrado vírico se realizaron 3 extracciones en paralelo, utilizando para cada una 950 μl de

tampón de lisis, 60 µl de suspensión de partículas de sílice y 100 µl de concentrado vírico. Seguidamente se realizaban dos lavados consecutivos con 1 ml de tampón de lavado, dos lavados consecutivos con 1 ml de etanol 70% frío, y un lavado con acetona. La solución de ácidos nucleicos final se obtenía por elución con 50 µl de tampón de elución. La suspensión de ácidos nucleicos recuperada a partir del primer tubo se ajustaba a 50 µl y se utilizaba para la elución de los ácidos nucleicos del segundo tubo, repitiendo la misma operación para la elución de los ácidos nucleicos del tercer tubo. Así pues, a partir de 300 µl de suspensión de partículas víricas se obtenían 50 µl de solución de ácidos nucleicos, que se analizaban inmediatamente o bien se conservaban a -20°C hasta el momento del análisis.

#### **3.2.2.4.2. Amplificación enzimática**

El procedimiento seguido para la detección de AdH, EV y VHA en moluscos bivalvos se basa en el descrito en el Capítulo 2 con algunas modificaciones para poder analizar el equivalente a un mayor volumen de tejido.

La mezcla de reacción para la reacción de transcripción inversa contenía 25 µl de la solución de ácidos nucleicos, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl (tampón II 1×, Perkin-Elmer), 50 nmol de cada desoxinucleótido trifosfato y 100 pmol del iniciador externo Ent2 o VHA2. La mezcla de reacción se incubó a 95°C durante 5 min para desnaturalizar el ARN, y seguidamente se añadieron 50 pmol de DTT, 50 U de inhibidor de ARNasas y 250 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). El volumen de reacción final fue de 50 µl. La síntesis de ADNc se realizó a 42°C durante 30 min, seguido de una incubación a 95°C 5 min para desnaturalizar las enzimas.

La reacción de amplificación a partir de ADNc se hizo en un volumen total de 100 µl que contenían 50 µl de la solución de ADNc, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl (tampón II 1×, Perkin-Elmer), 100 pmol del iniciador externo Ent1 o VHA1, y 4 U de AmpliTaq<sup>®</sup> ADN polimerasa (Perkin-Elmer). Asimismo, cuando se partía de ADN adenovirus, la reacción de amplificación se realizaba en un volumen total de 100 µl que contenían, 25 µl de solución de ácidos nucleicos, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl (tampón II 1×, Perkin-Elmer), 25 nmol de cada desoxinucleótido trifosfato, 8 pmol de los iniciadores externos específicos de adenovirus humanos hexAA1885 y hexAA1913, y 4 U de AmpliTaq<sup>®</sup> ADN polimerasa (Perkin-Elmer).

La mezcla de reacción se incubó en un termociclador programable *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin-Elmer). En el primer ciclo de amplificación la desnaturalización se llevó a cabo a 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de amplificación. Las condiciones fueron, desnaturalización a 92°C durante 90 s, hibridación del iniciador a 55°C durante 75 s y extensión a 72°C durante 90 s. Tras los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72°C durante 5 min.

La PCR anidada se realizó bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 2.2.5.3.3.

Los resultados se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (apartado 2.2.5.3.5.).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. VALORACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA RECUPERACIÓN Y DETECCIÓN DE VIRUS A PARTIR DE MEJILLONES DOPADOS

Para evaluar la eficiencia del método de recuperación de partículas víricas y detección molecular inicial se realizaron pruebas preliminares con mejillones de mercado en las que se añadieron  $10^5$  UFC de Poliovirus tipo 1 por gramo, que se procesaban en paralelo junto con las muestras sin dopar.

Las muestras de mejillones en las que se añadieron virus dieron resultado positivo por RT-PCR anidada en 0,5 g de tejido. Los resultados obtenidos a partir del análisis de diluciones decimales demostraron un nivel de detección de 1 UFC en 0,5 g de tejido analizado en la reacción ( $10^2$ – $10^3$  PV en 0,5 g), que es  $2 \times \log$  inferior en comparación con la sensibilidad estimada a partir de las suspensiones de Poliovirus tipo 1 control ( $10^{-2}$  UFC/reacción, 1–10 PV/reacción) (Tabla 3.1.). Las muestras de mejillones sin dopar dieron resultado negativo para la presencia de enterovirus.

**TABLA 3.1.**  
Valoración de la eficiencia del método de recuperación y detección de virus a partir de mejillones de mercado dopados

| Dilución del ARN | UFC/reacción | Estoc de Poliovirus tipo 1 |             | Mejillón dopado <sup>a</sup> |             |
|------------------|--------------|----------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
|                  |              | RT-PCR                     | PCR anidada | RT-PCR                       | PCR anidada |
| directa          | $10^5$       | +                          | +           | +                            | +           |
| $10^{-1}$        | $10^4$       | +                          | +           | +                            | +           |
| $10^{-2}$        | $10^3$       | +                          | +           | +                            | +           |
| $10^{-3}$        | $10^2$       | +                          | +           | +                            | +           |
| $10^{-4}$        | $10^1$       | +                          | +           | –                            | +           |
| $10^{-5}$        | $10^0$       | +                          | +           | –                            | +           |
| $10^{-6}$        | $10^{-1}$    | –                          | +           | –                            | –           |
| $10^{-7}$        | $10^{-2}$    | –                          | +           | –                            | –           |
| $10^{-8}$        | $10^{-3}$    | –                          | –           | –                            | –           |

<sup>a</sup> Resultado del análisis de 0,5 g de tejido en la dilución directa

A partir de estos resultados se decidió mejorar el método de recuperación de partículas víricas utilizado (apartado 3.2.1.1), introduciendo dos pasos de clarificación del concentrado por centrifugación para eliminar material en suspensión. Se modificó también el protocolo de extracción de ácidos nucleicos y de detección molecular de virus para poder analizar un mayor volumen de tejido por reacción. Estas modificaciones se ensayaron en moluscos bivalvos naturales.

### 3.3.2. CONTAMINACIÓN VÍRICA DE LOS MOLUSCOS BIVALVOS NATURALES

Se analizaron moluscos procedentes de dos áreas con diferente grado de contaminación de acuerdo con la información facilitada por el Centro Nacional de Acuicultura.

Todas las muestras de mejillones procedentes del Delta del Ebro (punto 1) dieron un resultado negativo para los virus de origen humano estudiados. Los niveles de coliformes fecales oscilaban entre  $10^2$  y  $10^4$  ufc/100 g (Tabla 3.2.), siendo <6000 ufc/100 g en el 50% de las muestras estudiadas como corresponde a una zona clasificada como de categoría B.

Las muestras de mejillones de Gavá, recogidas en una zona cercana a la salida de un emisario submarino, y una muestra de almejas procedente del punto 2 del Delta del Ebro, presentaron niveles detectables de AdH y EV en 3,6 g de tejido, y valores de coliformes superiores a  $10^4$  ufc/100 g (Tabla 3.2.), característicos de una zona muy contaminada.

**TABLA 3.2.**  
Parámetros estudiados en moluscos bivalvos

| Punto de                    | Muestra | Especie  | Análisis por PCR anidada <sup>a</sup> |    |     | Coliformes fecales <sup>b</sup> |
|-----------------------------|---------|----------|---------------------------------------|----|-----|---------------------------------|
|                             |         |          | AdH                                   | EV | VHA |                                 |
| Delta del Ebro<br>(punto 1) | #1      | mejillón | –                                     | –  | –   | 27500                           |
|                             | #2      | mejillón | –                                     | –  | –   | 5500                            |
|                             | #3      | mejillón | –                                     | –  | –   | 75000                           |
|                             | #4      | mejillón | –                                     | –  | –   | 200                             |
|                             | #5      | mejillón | –                                     | –  | –   | na                              |
| Gavá                        | #6      | mejillón | +                                     | +  | –   | 22000                           |
|                             | #7      | mejillón | +                                     | +  | –   | 30000                           |
| Delta del Ebro<br>(punto 2) | #8      | almeja   | +                                     | +  | –   | 48000                           |

<sup>a</sup> Resultado del análisis de 3,6 g de tejido para cada virus.

<sup>b</sup> ufc/100 g de tejido. Datos aportados por F. Lhoest

Para evaluar la posible presencia de inhibidores de la reacción de amplificación, se suplementaron 5 muestras que previamente habían dado un resultado negativo para EV con Poliovirus tipo 1 ( $10^{-1}$  UFC/g), y con  $10^5$  UFC/ml de clarificado-2 en una muestra de Gavá. El análisis por PCR permitió detectar ARN en todas las muestras dopadas con una sensibilidad de  $10^{-1}$  UFC/reacción equivalente a 10–100 partículas (Tabla 3.3.). Este resultado es similar al obtenido cuando se analizaban muestras de agua residual dopadas (Capítulo 2). Estos datos sugieren la ausencia de inhibidores de la reacción de amplificación, y una eficiencia superior del método de concentración y detección aplicado respecto al los primeros estudios realizados con mejillones de mercado.

**TABLA 3.3.**  
**Valoración de la eficiencia del método de recuperación y detección de virus a partir de mejillones naturales dopados**

| Dilución del ARN | UFC/reacción | Estoc de Poliovirus tipo 1 |             | Mejillón dopado <sup>a</sup> |             |
|------------------|--------------|----------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
|                  |              | RT-PCR                     | PCR anidada | RT-PCR                       | PCR anidada |
| directa          | $10^0$       | +                          | +           | –                            | +           |
| $10^{-1}$        | $10^{-1}$    | –                          | +           | –                            | +           |
| $10^{-2}$        | $10^{-2}$    | –                          | +           | –                            | –           |
| $10^{-3}$        | $10^{-3}$    | –                          | –           | nt <sup>b</sup>              | nt          |

<sup>a</sup> Resultado del análisis de 3,6 g de tejido en la dilución directa

<sup>b</sup> nt, no testado

Todas las muestras mostraron una toxicidad elevada cuando fue inoculado sobre células BGM el equivalente a 2 g de tejido, por lo que no se pudo evaluar la presencia de enterovirus infecciosos.

### **3.4. DISCUSIÓN**

En los últimos años el interés por evaluar y controlar la contaminación vírica de los moluscos bivalvos ha conducido al desarrollo y aplicación de diversos métodos de recuperación de las partículas víricas a partir de sus tejidos, y al desarrollo de estrategias para valorar el riesgo sanitario que representan para la salud.

El análisis de la contaminación vírica de los moluscos bivalvos requiere en primer lugar de un método de recuperación de virus suficientemente eficiente, lo cual suele ser el paso limitante. En este trabajo se ha desarrollado una metodología de gran simplicidad que permite la extracción y concentración de los virus acumulados por los moluscos bivalvos, que está basado en la elución utilizando tampón glicina, clarificación y posterior recuperación por ultracentrifugación. Estudios posteriores han confirmado que la utilización del tampón glicina 0,25 M a pH 10 como eluyente proporciona los mejores resultados frente a otros eluyentes aplicados en previos estudios (Muniain-Mujika y col., 2000), como el tampón borato con extracto de carne (Lucena y col., 1994) o el tampón glicina 0,25 M a pH 7,5 (Sobsey y col., 1978). La utilización del tampón glicina a pHs básicos como eluyente ha sido descrito comúnmente en varios estudios, aunque seguido de precipitación o floculación posterior (Atmar y col., 1993; Lees y col., 1994; Häfliger y col., 1997).

Los ensayos realizados sobre células BGM demostraron una elevada toxicidad de las suspensiones víricas, haciendo imposible el recuento de enterovirus infecciosos. El problema de la elevada citotoxicidad de los extractos de moluscos bivalvos y similares había sido descrito previamente, pudiendo reducirse con la utilización de floculantes (Metcalf y col., 1980; Seidel y col., 1983), lo que supone un encarecimiento y una mayor complejidad de la técnica. De cualquier manera el cultivo celular no proporciona la suficiente sensibilidad ni rapidez requerida en ensayos rutinarios, como se discutió ya en el Capítulo 2 de este trabajo, facilitada únicamente por las técnicas moleculares.

El mayor obstáculo para la aplicación rutinaria de técnicas de amplificación molecular de ácido nucleicos es la presencia de inhibidores de la reacción (Wilson, 1997). Algunos de los inhibidores presentes en los tejidos de los moluscos bivalvos son polisacáridos (Atmar y col., 1993). El método de extracción de ácidos nucleicos que utiliza GuSCN aplicado ha sido

evaluado por otros autores, demostrando una mayor eficiencia en la eliminación de inhibidores frente a otros métodos testados (Puig y col., 1994; Lees y col., 1994). La utilización de glicina combinado con la extracción de ácidos nucleicos utilizando GuSCN consigue eliminar eficientemente los inhibidores presentes en los concentrados de moluscos bivalvos. Puesto que se ha demostrado, además, que los virus tienden a ser acumulados en el tracto digestivo (Schwab y col., 1998), la utilización de solamente este órgano en los análisis podría reducir la concentración de inhibidores.

La eficiencia del método de extracción y detección molecular aplicado se evaluó a partir de muestras de mejillones naturales dopados, y es similar a lo observado cuando se analizaban muestras de agua residual suplementadas con virus (Capítulo 1; Puig y col., 1994; Pina y col., 1998c). La aplicación de la metodología desarrollada al análisis de muestras naturales ha permitido la detección de AdH y EV en muestras de mejillones y almejas procedentes de zonas muy contaminadas, analizando 3,6 g de tejido. La sensibilidad observada fue de  $10^{-1}$  UFC/g de tejido, lo que equivale a 10–100 partículas teniendo en cuenta la proporción de partículas infecciosas/no infecciosas de 100–1000 (Puig y col., 1994). Esta sensibilidad es superior a la obtenida en otros estudios que oscilaba entre 1 UFC/g y 10 UFC/g de tejido (Jaykus y col., 1996; Hsieh y col., 1999). El método desarrollado constituye una herramienta para evaluar la contaminación vírica de los moluscos bivalvos.

Las muestras de mejillones naturales analizados presentaron niveles de coliformes fecales característicos de zonas moderadamente y muy contaminadas. La normativa vigente únicamente considera los coliformes como parámetro indicador (Directiva del Consejo 91/492/CEE; Real Decreto 308/1993 y 571/1999). Sin embargo, varios trabajos han demostrado que el control sanitario de los moluscos bivalvos debería contemplar algún parámetro vírico, ya que diversos brotes infecciosos de etiología vírica se han relacionado con el consumo de moluscos que cumplían con los niveles bacterianos establecidos por la normativa (Chalmers y McMillan, 1995; Doré y col., 2000). Esta situación es debida en ocasiones a que los procesos de depuración de los moluscos bivalvos que se aplican cumpliendo la normativa, son capaces de reducir la contaminación bacteriana pero no eliminan eficientemente los virus (Schwab y col., 1998), que siguen constituyendo un riesgo sanitario. Varios grupos de bacteriófagos de bacterias entéricas han sido propuestos como posibles indicadores alternativos a los coliformes, entre ellos los colifagos F-específicos (Doré y col., 2000) y los fagos de *Bacteroides fragilis* (Lucena y col. 1994; Muniain-Mujika y col., 2000). Su utilización como modelo podrían representar una ventaja en términos



económicos para muchos laboratorios de análisis rutinarios, aunque sus limitaciones (Capítulo 1) supondrían la necesidad de combinar varias alternativas. El principal inconveniente en ambos casos es que no presentan un origen exclusivamente humano, y en el caso de los fagos de *Bact. fragilis*, además, la baja concentración en que se encuentran en las aguas residuales.

Los resultados presentados en este estudio aportan datos sobre la eficiencia superior de las técnicas moleculares frente a los ensayos en cultivo celular que se habían estado o aplicando hasta el momento, por lo que se debería considerar el test de detección molecular de adenovirus humanos como posible índice de la presencia de virus humanos como contaminantes de los moluscos bivalvos, aunque son necesarios estudios más extensos que se están desarrollando en la actualidad.



*Capítulo 4.*

*Epidemiología molecular del virus de la  
hepatitis A*

---

---



## **4.1. INTRODUCCIÓN**

La hepatitis A es una enfermedad de distribución mundial, que puede presentarse en forma de casos esporádicos o bien en brotes epidémicos. Se transmite por vía fecal-oral o por contacto persona-persona. Dada la capacidad del virus para sobrevivir en el ambiente durante largos períodos, se producen brotes por el consumo de agua y alimentos consumidos crudos o poco cocinados y que han estado en contacto con aguas contaminadas (vegetales y moluscos bivalvos), así como alimentos manipulados por personas infectadas.

Recoger datos epidemiológicos acerca de cualquier enfermedad es difícil, y más aún si como en el caso de la hepatitis A se producen casos leves o asintomáticos que pasan inadvertidos y no están registrados en los boletines epidemiológicos. Estudios seroepidemiológicos han demostrado una seroprevalencia del 15-100% en la población general de diferentes regiones, y se estima que cada año aparecen 1,5 millones de casos (World Health Organization, 2000). La incidencia de la hepatitis A en una comunidad está relacionada directamente con los niveles de higiene y saneamiento, y con las condiciones socioeconómicas. Así pues, en regiones de endemidad media, donde los estándares sanitarios han mejorado en las últimas décadas, y en países desarrollados se ha producido un cambio en el patrón epidemiológico, observándose una reducción en los niveles de circulación del VHA entre la población infantil, y la aparición de una población creciente de individuos no inmunes. Esta situación tiene importantes implicaciones en la morbilidad y mortalidad, ya que el aumento de las personas que llegan a la edad adulta sin haber estado en contacto con el virus sugiere un aumento en la incidencia de la infección grave por hepatitis A clínica y sus posibles complicaciones.

En Cataluña desde el año 1990, la hepatitis A se considera una enfermedad de declaración individualizada obligatoria. La tasa de morbilidad en la última década ha oscilado entre un 11,7 por 100.000 habitantes en 1990 y un 2,8 por 100.000 habitantes en 1995. En los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia alcanzando una tasa de 8,3 en 1998 (Departament de Sanitat i Seguretat Social, 1991-1998), siendo la seroprevalencia de un 67,8% en la población general con un 5% de seropositivos en el grupo de 5 a 14 años de edad (Bruguera y col., 1999).

Aunque los datos clínicos son todavía numerosos, no se ha documentado en nuestra región la variabilidad genética de las cepas del VHA circulantes en la población. Se han descrito más de un centenar de cepas del VHA que se han distribuido en 7 genotipos (I, II, III y VII de origen humano, y IV, V y VI aislados de primates no humanos) que difieren en un 15-25% en la región genómica estudiada (Robertson y col., 1992). En general la secuencia de nucleótidos y aminoácidos está altamente conservada.

En este capítulo de la tesis se ha estudiado la epidemiología de la infección por VHA en nuestra región. Los objetivos planteados han sido los siguientes:

- ★ Detección e identificación de las cepas del VHA que circulan en el ambiente.
- ★ Identificación de cepas del VHA que producen casos clínicos.
- ★ Secuenciación y análisis filogenético de los virus detectados.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. IDENTIFICACIÓN DEL VHA EN EL AMBIENTE**

Para estudiar la diversidad de cepas del VHA circulantes en la población y que son excretadas al ambiente se tomaron muestras de agua de diversos orígenes:

- Agua residual urbana de la entrada del EDAR de San Adrián de Besos.
- Agua del río Llobregat a su paso por el municipio de Abrera.
- Agua del río Ter a su paso por el municipio de Cardedeu.
- Agua de mar de diferentes puntos del litoral de la comarca del Barcelonès.

Las características de estas muestras y su procesamiento se describen en el Capítulo 2 de este trabajo.

### **4.2.2. IDENTIFICACIÓN DEL VHA EN PACIENTES CON HEPATITIS AGUDA**

Se seleccionaron 14 muestras de suero humano procedentes de pacientes con hepatitis aguda de tipo A que habían acudido al hospital durante la primera semana de síntomas de la enfermedad. Estas muestras fueron tomadas entre 1989 y 1999 en el servicio de urgencias del Hospital General Universitario Valle de Hebrón de Barcelona, y fueron cedidas por la Dra. M. Buti. El patrón clínico de los pacientes fue analizado por el personal de dicho hospital, y se realizó mediante ensayos inmunoenzimáticos comerciales (Abbott, North Chicago, IL) para la detección de IgM anti-VHA.

### 4.2.3. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ARN-VHA EN MUESTRAS DE AGUA AMBIENTALES Y SUEROS HUMANOS

#### 4.2.3.1. Extracción de ácidos nucleicos y amplificación enzimática

La extracción de ARN se realizó por el método de Boom (Boom y col., 1990), utilizando guanidinium isotiocianato para la lisis de las partículas víricas y adsorción de los ácidos nucleicos sobre partículas de sílice. A partir de la suspensión de ARN se realizaba una dilución 1:10 en tampón de elución.

La reacción de transcripción inversa contenía 5 µl de la solución de ARN (correspondiente a 0,2 o 2 ml de agua residual, de 0,1 a 5 l de agua de río, 2,5 o 25 ml de agua de mar, 0,5 o 5 µl de suero), y se realizó como se indica en el apartado 2.2.5.3. En todas las pruebas de detección se utilizaron los iniciadores que amplifican un fragmento de la región 5'NTR y VP1/2A (Tabla 4.1.). Los resultados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 3% (p/v) y tinción con bromuro de etidio.

TABLA 4.1.  
Iniciadores utilizados para la amplificación del virus de la hepatitis A por RT-PCR anidada

| Región | Posición <sup>a</sup> | Nombre  | T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup> | Tamaño del producto | Secuencia <sup>c</sup>       |
|--------|-----------------------|---------|----------------------------------|---------------------|------------------------------|
| 5'NTR  | 332-352               | VHA1    | 64                               | 368 bp              | 5'-TTGGAACGTCACCTTGCAGTG-3'  |
|        | 680-700               | VHA2    | 64                               |                     | 5'-CTGAGTACCTCAGAGGCAAAC-3'  |
|        | 371-391               | neVHA1  | 58                               | 290 bp              | 5'-ATCTCTTTGATCTTCCACAAG-3'  |
|        | 641-661               | neVHA2  | 64                               |                     | 5'-GAACAGTCCAGCTGTCAATGG-3'  |
|        | 332-351               | VHA1d   | 62                               | 376 bp              | 5'-TTGGRACGTCDCCTTGCAGT-3'   |
|        | 689-708               | VHA2d   | 65                               |                     | 5'-AAATGCCCTGRGTACCTCAG-3'   |
|        | 644-661               | neVHA2d | 57                               | 290 bp              | 5'-GWAMWGTCCAGCWYHAATGG-3'   |
| VP1/2A | 2906-2929             | HHA1    | 59                               | 532 bp              | 5'-TGCAAATTAYAAYCAYTCTGATGA- |
|        | 3416-3438             | HHA2    | 61                               |                     | 5'-TTTCTGTCCATTTYTCATCATT-3' |
|        | 2940-2960             | HHA3    | 48                               | 436 bp              | 5'-TTYAGTTGYTAYTTGTCTGT-3'   |
|        | 3357-3376             | HHA4    | 55                               |                     | 5'-TCAAGAGTCCACACTTC-3'      |

<sup>a</sup> La posición corresponde a la secuencia de la cepa HM-175 del VHA (Cohen y col., 1987b)

<sup>b</sup> La temperatura de fusión se calculó según la ecuación  $T_m = 4 \times (n^\circ \text{ pares GC}) + 2 \times (n^\circ \text{ pares AT})$

<sup>c</sup> R= A o G; D= G, A o T; W= A o T; Y= C o T; M= A o C; H= A, T o C



En todos los análisis se siguieron las medidas de control básicas que se describen en el apartado 2.2.5.3.4. para reducir la posibilidad de contaminación cruzada con moléculas de ADN amplificado producto de reacciones previas, y para evitar falsos negativos.

### **4.2.3.1. Purificación de fragmentos de ADN**

La metodología aplicada para la purificación de fragmentos de ADN amplificado en solución o a partir de geles de agarosa se eligió en función de las características del ADN y de su concentración: electroelución en sacos de diálisis, y el *kit* de purificación de productos de PCR QIAquick (Qiagen).

#### ***4.2.3.1.1. Purificación de fragmentos de ADN por electroelución***

Este método se utilizó en el caso de que el ADN producto de PCR no formara en el gel de agarosa una única banda sino que aparecieran bandas accesorias.

El volumen total de ADN amplificado obtenido por PCR anidada se sometía a electroforesis en un gel de agarosa al 3% (2% NuSieve GTG-1% Seakem ME, FMC., Bioproducts) en TBE 1×, que se había preparado con los pocillos lo suficientemente grandes para poder albergar toda la muestra. Los fragmentos de ADN se separaron en un campo eléctrico a 100 V. durante aproximadamente 1 h. Pasado este tiempo, el ADN se tiñó en una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml durante 15-30 min. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne. El fragmento de agarosa que contenía el ADN de interés se escindía con ayuda de un bisturí, y se procedía a extraer el ADN por electroelución. Para esto, el fragmento se disponía en un tubo de diálisis con un volumen apropiado de TBE 0,5× (500 µl por centímetro), y una vez cerrado, se aplicaba un campo eléctrico a 80 V en tampón TBE 0,5× durante 1 h. La completa elución del ADN a partir del gel de agarosa se comprobó en el transiluminador.

Pasado este tiempo se recuperaba el ADN en solución en un microtubo. Para limpiar el ADN se realizaban un lavado con un volumen de fenol (pH 8), mezclando por inversión y se centrifugaba 2 min a 16.000 ×g. Una vez recuperada la fase acuosa en un microtubo, se realizó un lavado con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) de la misma manera, y se continuó con un lavado con un volumen de cloroformo. El ADN se

precipitaba con etanol absoluto y 0,3 M de acetato sódico pH 5,5 a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 12 h, y se secó al vacío (Speed-Vac SC100). El ADN precipitado se resuspendió en 30  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril, y se guardaba a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis.

#### **4.2.3.1.2. Purificación de fragmentos de ADN producto de PCR utilizando el kit QIAquick (Qiagen)**

Este método se utilizó en el caso de que el ADN producto de PCR formara en el gel de agarosa una sola banda, sin que aparezcan bandas inespecíficas. El método de purificación está basado en la capacidad de los ácidos nucleicos para unirse sobre membranas de gel de sílice en un medio con alta concentración de sales (Vogelstein y col., 1979). Esto permite realizar una serie de lavados para eliminar iniciadores y nucleótidos no incorporados, y enzimas, y posteriormente eluir el ADN. La recuperación suele ser de un 90-95% del ADN (de 100 a 10 kb) (QIAquick Spin Handbook, Qiagen).

El procedimiento seguido fue el indicado por el fabricante. Brevemente, el ADN producto de PCR en solución se mezcló con 5 volúmenes del tampón PB (QIAGEN), y se dispuso en el tubo que contenía la membrana de sílice. Tras centrifugar las muestras a  $16.000 \times g$  durante 1 min para permitir la unión del ADN a la membrana, se realizó un lavado con 750  $\mu\text{l}$  de tampón PE (QIAGEN), y se volvió a centrifugar 2 min a  $16.000 \times g$  para eliminar los materiales no adsorbidos sobre la membrana. Finalmente el ADN se eluía con 30  $\mu\text{l}$  de TrisHCl pH 8,5, y se guardaba a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análisis posteriores.

#### **4.2.3.2. Cuantificación de la concentración de ADN purificado**

La cuantificación de la concentración del ADN purificado recuperado en solución se realizó en un gel de agarosa por comparación con un patrón de ADN de concentraciones conocidas. Se realizaron diluciones seriadas de ADN del fago  $\Phi\text{X174}$  digerido con *Hae* III, utilizado normalmente como patrón de peso molecular, y se cargaron en un gel de agarosa al 3% volúmenes que contenían 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng y 15,62 ng del ADN patrón, junto con alícuotas de diluciones seriadas del ADN que se quería cuantificar. Los fragmentos de ADN se separaron en un campo eléctrico y posteriormente se tiñeron en una solución de

bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron y se registraron utilizando el sistema ImageMaster®VDS (Pharmacia-Biotech). La concentración de ADN en las muestras se calculó por comparación de la intensidad de las bandas en cada dilución en relación con la intensidad de las bandas del ADN patrón de tamaño molecular más aproximado.

#### **4.2.3.3. Reacción de secuenciación del ADN**

La secuencia de nucleótidos de las dos cadenas del ADN amplificado se obtuvo utilizando el sistema ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* con AmpliTaq® ADN polimerasa FS (Perkin-Elmer, Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos la reacción de secuenciación se realizó en un volumen total de 10 µl que contenían 1,6 pmol del iniciador correspondiente neVHA1 o neVHA2 y aproximadamente 10 ng del ADN a analizar. La reacción se llevaba a cabo en un termociclador programable *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer) durante 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 10 s, hibridación del iniciador a 50°C durante 5 s y extensión a 60°C durante 4 min. El ADN producto de la reacción se precipitó con etanol 95% y acetato sódico 0,3 M pH 5,5 durante 10 min en hielo. Tras centrifugar el ADN durante 20 min a 20.000 ×g a temperatura ambiente, se lavaba con 125 µl de etanol 70%, y se secaba al vacío en una centrifuga Speed-Vac SC100 durante 10 min. Las secuencias se analizaban en el secuenciador automático ABI PRISM™ 377 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems; Servicios Científico-Técnicos, UB).

#### **4.2.3.4. Análisis de las secuencias**

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con aquellas contenidas en los bancos de datos GenBank y EMBL (European Molecular Biology Library) utilizando el programa BLASTN v.2.0.8 (Genetics Computers Group, Md., Wis.) (Altschul y col., 1997), y se alinearon con los fragmentos homólogos de las demás cepas de VHA mediante el programa CLUSTALW v.1.8 (Thompson y col., 1994). El sombreado de los alineamientos para resaltar las diferencias entre las secuencias se realizó con el programa GeneDoc v.2.5.000.

El estudio de la relación filogenética entre las cepas detectadas y las demás cepas descritas y depositadas en los bancos de datos se realizó utilizando diversos programas

incluidos en el paquete PHYLIP (Felsenstein, 1993). La matriz de distancias genéticas se calculó con el programa DNADIST por el método de la máxima verosimilitud. El árbol filogenético se calculó a partir de la matriz de distancias con el programa NEIGHBOR v.3.573c, utilizando el algoritmo UPGMA. La representación gráfica se hizo con el programa TREEVIEW v.1.5 (Page, 1996).

Los números de acceso de las secuencias de nucleótidos de las cepas de VHA depositadas en el GenBank se recogen en la Tabla 4.2.

**TABLA 4.2.**  
**Secuencias de VHA utilizadas en el análisis filogenético**

| <b>Cepa vírica</b> | <b>Lugar de aislamiento y año</b> | <b>Origen</b>                 | <b>Genotipo</b> | <b>Nº acceso GenBank</b> | <b>Referencia</b>      |
|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------|------------------------|
| HM-175             | Australia, 1976                   | Humano                        | IB              | M14707                   | Cohen y col., 1987b    |
| HM-175/24a         | -----                             | Humano<br>(células FRhK-4)    | IB              | M59810                   | Lemon y col., 1991     |
| HM-175/43c         | -----                             | Humano<br>(células FRhK-4)    | IB              | M59809                   | Lemon y col., 1991     |
| HM-175/18f         | -----                             | Humano<br>(células BS-C-1)    | IB              | M59808                   | Lemon y col., 1991     |
| HM-175/7MK5        | -----                             | Humano<br>(células AGMK)      | IB              | M16632                   | Cohen y col., 1987a    |
| HAF-203            | Brasil, 1992                      | Humano                        | IB              | AF268396                 | No publicado           |
| MBB                | Norte de Africa, 1978             | Humano                        | IB              | M20273                   | Paul y col., 1987      |
| L-A-1              | China                             | Humano                        | IB              | AF314208                 | No publicado           |
| LA                 | USA, 1975                         | Humano                        | IA              | K02990                   | Najarian y col., 1985  |
| HAS-15             | USA, 1979                         | Humano                        | IA              | X15464                   | Sverdlov y col., 1987  |
| GBM                | Alemania, 1976                    | Humano                        | IA              | X75215                   | Graff y col., 1994     |
| CR326              | Costa Rica, 1960                  | Humano                        | IA              | M10033                   | Linemeyer y col., 1985 |
| FG                 | Italia, 1985                      | Humano                        | IA              | X83302                   | Beneduce y col., 1995  |
| FH1                | Japón, 1998                       | Humano                        | IA              | AB020567                 | No publicado           |
| FH2                | Japón, 1998                       | Humano                        | IA              | AB020568                 | No publicado           |
| FH3                | Japón, 1998                       | Humano                        | IA              | AB020569                 | No publicado           |
| AH1                | Japón, 1998                       | Humano                        | IA              | AB020564                 | No publicado           |
| AH2                | Japón, 1998                       | Humano                        | IA              | AB020565                 | No publicado           |
| AH3                | Japón, 1998                       | Humano                        | IA              | AB020566                 | No publicado           |
| CF53               | Francia, 1979                     | Humano                        | II              | M63025                   | Brown y col., 1991     |
| PA21               | Panamá, 1980                      | <i>Aotus trivirgatus</i>      | IIIA            | M63026                   | Brown y col., 1991     |
| CY145              | Filipinas, 1988                   | <i>Macaca fascicularis</i>    | IV              | M59286                   | Nainan y col., 1991    |
| AGM-27             | Kenia, 1985                       | <i>Cercopithecus aethiops</i> | V               | D00924                   | Tsarev y col., 1991    |

## 4.3. RESULTADOS

### 4.3.1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VHA A PARTIR DE MUESTRAS AMBIENTALES

Para estudiar la diversidad de cepas del VHA circulantes en la población se estudió la secuencia del ADN amplificado producto de PCR anidada, obtenido a partir de las muestras de agua residual, agua de río y agua de mar descritas en el Capítulo 2. Se detectó ARN del VHA en 44 de las 128 muestras analizadas (34,3%) (Tabla 4.3.), y se estudió la secuencia de la región amplificada del extremo 5'NTR en 27 muestras y de la región del VP1/2A en 16 muestras.

**TABLA 4.3.**  
**Detección del VHA en muestras de agua ambientales por RT-PCR anidada**

| Tipo de muestra        | Nº muestras analizadas | Presencia de VHA <sup>a</sup> | Nº muestras secuenciadas |
|------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Agua residual          | 39                     | 19                            | 18                       |
| Agua del río Llobregat | 56                     | 21                            | 9                        |
| Agua del río Ter       | 10                     | 2                             | 2                        |
| Agua de mar            | 23                     | 2                             | 2                        |
| Total                  | 128                    | 44                            | 31                       |

<sup>a</sup> Muestras positivas en: 4 ml de agua residual, 1-5 l de agua de río, 25 ml de agua de mar

#### 4.3.1.1. Región 5'NTR

Las secuencias obtenidas de la región 5'NTR se compararon entre si y con la de la cepa HM-175 utilizada como control positivo, observándose un grado de identidad del 94,75–99,1% (Figura 4.1.; Tabla 4.4.).

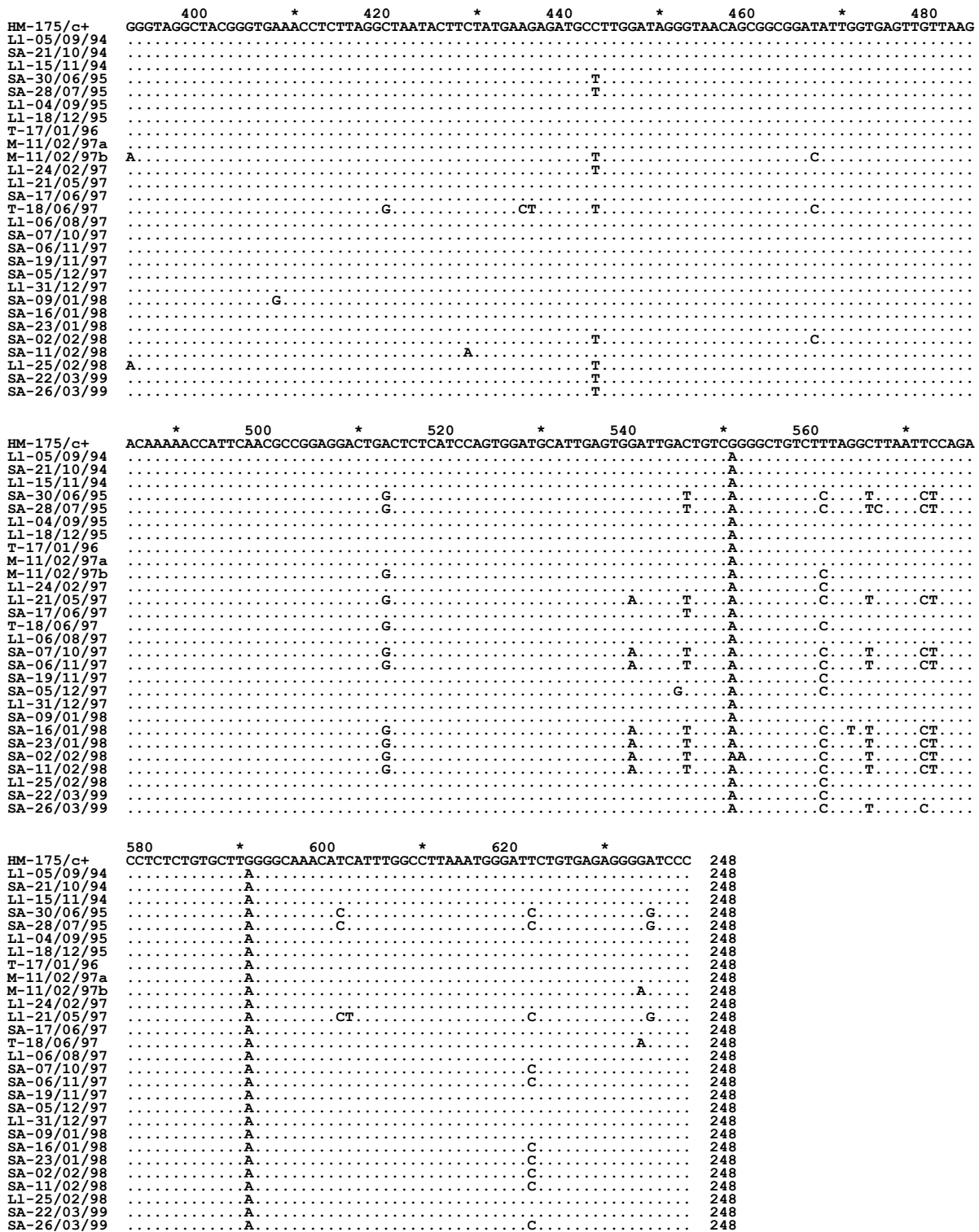


Figura 4.1.

Alineación de la secuencia de nucleótidos de la región del 5'NTR (248 nt) de las cepas del VHA detectadas en muestras de agua ambientales respecto a la cepa HM-175 utilizada como control. Se indican sólo las diferencias.

SA, muestra de agua residual; Ll, muestra de agua del río Llobregat; T, muestra del río Ter; M, agua de mar.

En 9 de las 28 muestras estudiadas (31%) la secuencia de nucleótidos difería de la cepa control solamente en los nucleótidos 551 y 591 (G en la cepa control, A en las cepas ambientales) (99% de identidad). Dieciocho cepas presentaban entre 3 y 13 sustituciones en el fragmento de 248 nt estudiado, entre las que se encontraban siempre las de los nucleótidos 551 y 591 (Figura 4.1.).

Las secuencias se compararon con las regiones homólogas de 23 cepas del VHA caracterizadas previamente. En 13 muestras la cepa identificada era un 99,5–100% idéntica a la cepa HM-175/wt. Se identificaron 5 variantes de la cepa MBB con un 96,7–99,5% de identidad, 4 variantes de la cepa FG con un 97,9–98,7% de identidad, 1 variante de las cepas FH3 con un 99,1% de identidad, y 4 variantes de las cepas GBM y LA con un 97,9–100% de identidad. Según estos datos, las muestras de agua ambientales contienen cepas del VHA pertenecientes a los genotipos IA y IB.

**TABLA 4.4.**  
**Comparación con las cepas ambientales con otras cepas de VHA en la región del 5'NTR (248 nt)**

| Muestra     | Identidad con la cepa control |                         | Identidad con la cepa más próxima |                         | Cepa más similar |
|-------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|------------------|
|             | Nucleótidos idénticos         | Porcentaje de identidad | Nucleótidos idénticos             | Porcentaje de identidad |                  |
| Ll-05/09/94 | 246                           | 99,1%                   | 248                               | 100%                    | HM-175, HAF-203  |
| SA-21/10/94 | 246                           | 99,1%                   | 248                               | 100%                    | HM-175, HAF-203  |
| Ll-15/11/94 | 246                           | 99,1%                   | 248                               | 100%                    | HM-175, HAF-203  |
| SA-30/06/95 | 236                           | 95,1%                   | 248                               | 100%                    | GBM, LA          |
| SA-28/07/95 | 235                           | 94,7%                   | 247                               | 99,6%                   | GBM, LA, HAS-15  |
| Ll-04/09/95 | 246                           | 99,1%                   | 248                               | 100%                    | HM-175, HAF-203  |
| Ll-18/12/95 | 246                           | 99,1%                   | 248                               | 100%                    | HM-175, HAF-203  |
| T-17/01/96  | 246                           | 99,1%                   | 248                               | 100%                    | HM-175, HAF-203  |
| M-11/02/97a | 240                           | 96,7%                   | 244                               | 93,3%                   | MBB              |
| M-11/02/97b | 246                           | 99,1%                   | 248                               | 100%                    | HM-175, HAF-203  |
| Ll-24/02/97 | 244                           | 98,3%                   | 246                               | 99,1%                   | MBB              |
| Ll-21/05/97 | 235                           | 94,7%                   | 246                               | 99,1%                   | FH3              |
| SA-17/06/97 | 245                           | 98,7%                   | 247                               | 99,5%                   | HM-175, HAF-203  |
| T-18/06/97  | 238                           | 95,9%                   | 240                               | 96,7%                   | MBB              |
| Ll-06/08/97 | 246                           | 99,1%                   | 248                               | 100%                    | HM-175, HAF-203  |
| SA-07/10/97 | 238                           | 95,9%                   | 245                               | 98,7%                   | FG               |
| SA-06/11/97 | 238                           | 95,9%                   | 245                               | 98,7%                   | FG               |
| SA-19/11/97 | 245                           | 98,7%                   | 247                               | 99,5%                   | HM-175, HAF-203  |
| SA-05/12/97 | 244                           | 98,3%                   | 247                               | 99,5%                   | HM-175, HAF-203  |
| Ll-31/12/97 | 246                           | 99,1%                   | 248                               | 100%                    | HM-175, HAF-203  |
| SA-09/01/98 | 245                           | 98,7%                   | 247                               | 99,6%                   | HM-175, HAF-203  |
| SA-16/01/98 | 237                           | 95,5%                   | 244                               | 98,3%                   | FG               |
| SA-23/01/98 | 238                           | 95,9%                   | 244                               | 98,3%                   | GBM, LA, FG      |
| SA-02/02/98 | 235                           | 94,7%                   | 243                               | 97,9%                   | GBM, LA          |
| SA-11/02/98 | 237                           | 95,5%                   | 244                               | 98,3%                   | FG               |
| Ll-25/02/98 | 243                           | 97,9%                   | 247                               | 99,5%                   | MBB              |
| SA-22/03/99 | 244                           | 98,3%                   | 246                               | 99,1%                   | MBB              |
| SA-26/03/99 | 241                           | 97,1%                   | 243                               | 97,9%                   | GBM, LA          |

### 4.3.1.2. Región VP1/2A

Las secuencias de nucleótidos se compararon con la de la cepa control, encontrando entre 2 y 44 diferencias (Figura 4.2.), lo que representaba un 88,9–99,5% de identidad. En todos los casos se observó la sustitución de los nucleótido C-3018 presente en la cepa control, por un nucleótido timina característico de las cepas salvajes.

La comparación con las secuencias de las cepas previamente caracterizadas permitió identificar 3 cepas con un grado de identidad del 100% con variantes de la cepa HM-175 y 2 cepas similares a la MBB con un 97,9–98,3% de identidad, todas ellas clasificadas como genotipo IB. Se registraron también variantes con un 95,4–99,2% de similitud respecto a la cepa GBM, FG y FH1 pertenecientes al genotipo IA (Tabla 4.5.).

Los resultados demostraron una concordancia del 65% respecto a la identificación lograda a partir de los datos de las dos regiones estudiadas, con un 44% de cepas clasificadas como genotipo IA y un 55% de variantes del genotipo IB.

**TABLA 4.5.**  
**Comparación con las cepas ambientales con otras cepas de VHA en la región del VP1/2A (398 nt)**

| Muestra     | Identidad con la cepa control |                         | Identidad con la cepa más próxima |                         |                  |
|-------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|------------------|
|             | Nucleótidos idénticos         | Porcentaje de identidad | Nucleótidos idénticos             | Porcentaje de identidad | Cepa más similar |
| SA-21/10/94 | 354                           | 88,9%                   | 392                               | 98,5%                   | GBM              |
| LI-15/11/94 | 393                           | 98,7%                   | 398                               | 100%                    | HM-175           |
| SA-30/06/95 | 359                           | 90,2%                   | 395                               | 99,2%                   | GBM              |
| SA-28/07/95 | 355                           | 89,1%                   | 393                               | 98,7%                   | GBM              |
| LI-18/12/95 | 393                           | 98,7%                   | 398                               | 100%                    | HM-175           |
| SA-12/02/96 | 374                           | 93,9%                   | 379                               | 95,2%                   | FG               |
| SA-17/06/97 | 366                           | 91,9%                   | 383                               | 96,2%                   | GBM              |
| SA-01/08/97 | 396                           | 99,5%                   | 398                               | 100%                    | HM-175           |
| SA-19/11/97 | 356                           | 89,4%                   | 379                               | 95,2%                   | GBM              |
| SA-05/12/97 | 355                           | 89,1%                   | 386                               | 96,9%                   | FH1              |
| SA-16/01/98 | 369                           | 92,7%                   | 379                               | 95,2%                   | FG               |
| SA-02/02/98 | 357                           | 89,7%                   | 380                               | 95,4%                   | GBM              |
| SA-11/02/98 | 365                           | 91,7%                   | 380                               | 95,4%                   | FG               |
| SA-22/03/99 | 374                           | 93,9%                   | 390                               | 97,9%                   | MBB              |
| SA-26/03/99 | 359                           | 90,2%                   | 391                               | 98,3%                   | GBM              |
| SA-16/04/99 | 376                           | 94,4%                   | 391                               | 98,3%                   | L-A-1            |



|             |  |   |      |   |      |   |      |   |      |   |
|-------------|--|---|------|---|------|---|------|---|------|---|
|             | 2960   | * | 2980 | * | 3000 | * | 3020 | * | 3040 | * |
| HM-175/c+   | CACAGAACAATCAGAGTTTTTTTCCAGAGCTCCATTGAACTCAAATGCCATGTTACCCACTGAATCAATGATGAGCAGAAATGCAGCTGG |   |      |   |      |   |      |   |      |   |
| SA-21/10/94 |  |   |      | T |      | T | GT   |   | G    | T |
| L1-15/11/94 |  |   |      |   |      |   | T    | T |      |   |
| SA-30/06/95 |  |   |      | T |      | T | GT   |   | G    | T |
| SA-28/07/95 |  |   |      | T |      | T | GT   |   | G    | T |
| L1-18/12/95 |  |   |      |   |      |   | T    | T |      |   |
| SA-12/02/96 |  |   |      |   |      |   | T    |   |      |   |
| SA-17/06/97 |  | A |      |   |      | T |      |   | C    | T |
| SA-01/08/97 |  |   |      |   |      | T |      |   | G    |   |
| SA-19/11/97 |  |   | C    | T |      | A | T    |   | G    | C |
| SA-05/12/97 |  |   | C    | T |      | A | T    |   | G    | C |
| SA-16/01/98 | G  |   |      |   |      | A | T    |   | G    | C |
| SA-02/02/98 |  |   | C    | T |      | A | T    |   | G    | C |
| SA-11/02/98 |  |   |      |   |      | A | T    |   | G    | C |
| SA-22/03/99 | T  |   |      |   |      | A | T    |   | G    | C |
| SA-26/03/99 |  |   |      | T |      | A | T    |   | G    | C |
| SA-16/04/99 | T  |   |      |   | T    | A | T    |   | G    | C |

|             |  |   |      |   |      |   |      |   |      |
|-------------|--|---|------|---|------|---|------|---|------|
|             | 3060   | * | 3080 | * | 3100 | * | 3120 | * | 3140 |
| HM-175/c+   | AGACTTGGAGTCATCAGTGGATGATCCCTAGATCAGAGGAAGATAAAAGATTGAGAGTCATATAGAATGCAGGAAGCCATATAAAGAACTGG |   |      |   |      |   |      |   |      |
| SA-21/10/94 |  |   |      |   | A    | G | C    | G |      |
| L1-15/11/94 |  |   |      |   |      |   |      |   |      |
| SA-30/06/95 | T  |   |      |   | G    | C | G    |   |      |
| SA-28/07/95 |  |   |      |   | G    | C | G    |   |      |
| L1-18/12/95 |  |   |      |   |      |   |      |   |      |
| SA-12/02/96 |  |   |      |   | G    | C | G    |   |      |
| SA-17/06/97 | G  |   |      |   |      |   |      |   | T    |
| SA-01/08/97 |  |   |      |   |      |   |      |   | T    |
| SA-19/11/97 |  |   |      |   |      |   |      |   | T    |
| SA-05/12/97 | C  |   |      |   |      |   |      |   | T    |
| SA-16/01/98 |  |   | G    |   |      |   |      |   | T    |
| SA-02/02/98 |  |   |      |   |      |   |      |   | T    |
| SA-11/02/98 |  |   |      |   |      |   |      |   | T    |
| SA-22/03/99 |  |   |      |   |      |   |      |   | T    |
| SA-26/03/99 |  |   |      |   |      |   |      |   | T    |
| SA-16/04/99 |  |   |      |   |      |   |      |   | T    |

|             |  |      |   |      |   |      |   |      |   |    |
|-------------|--|------|---|------|---|------|---|------|---|----|
|             | *  | 3160 | * | 3180 | * | 3200 | * | 3220 | * | 32 |
| HM-175/c+   | ATTAGAAGTTGGGAAACAAAGACTCAAGTATGCTCAGGAAGAATGTCAAATGAAGTACTTCCACCCCTAGGAAAATGAAGGGACTGTTTTTC |      |   |      |   |      |   |      |   |    |
| SA-21/10/94 | G  | G    |   |      |   | G    |   |      |   | A  |
| L1-15/11/94 |  |      |   |      |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-30/06/95 | G  | G    |   | A    |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-28/07/95 | G  | G    |   | T    | A | G    |   |      |   | A  |
| L1-18/12/95 |  |      |   |      |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-12/02/96 | G  | G    |   |      |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-17/06/97 | T  | G    |   | A    |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-01/08/97 |  |      |   |      |   |      |   |      |   | A  |
| SA-19/11/97 | T  | G    |   | A    |   |      |   |      |   | A  |
| SA-05/12/97 | G  | G    |   | A    |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-16/01/98 | G  | G    |   | A    |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-02/02/98 | T  | G    |   | A    |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-11/02/98 | G  | G    |   | A    |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-22/03/99 | G  | G    |   | A    |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-26/03/99 | G  | G    |   | A    |   | G    |   |      |   | A  |
| SA-16/04/99 | G  | G    |   | A    |   | G    |   |      |   | A  |

|             |  |   |      |   |      |   |      |   |      |   |
|-------------|--|---|------|---|------|---|------|---|------|---|
|             | 40   | * | 3260 | * | 3280 | * | 3300 | * | 3320 | * |
| HM-175/c+   | ACAAGCCCAATATTTCTCTTTTATACGTAGGAGCATGAAATGATGAAGTTTTCCTGGAGAGGTGTGACTGCTGATACTAGAGCTTTAAGGAG |   |      |   |      |   |      |   |      |   |
| SA-21/10/94 | T  | G | T    | A |      | A | A    | T |      | A |
| L1-15/11/94 |  |   |      |   |      | A |      |   |      | A |
| SA-30/06/95 | C  | G | T    | A |      | A | A    | T |      | A |
| SA-28/07/95 | C  | G | T    | A |      | A | A    | T |      | A |
| L1-18/12/95 |  |   |      |   |      | A |      |   |      | A |
| SA-12/02/96 |  |   |      |   |      | A | A    | T |      | A |
| SA-17/06/97 |  |   |      |   |      | A | A    | T |      | A |
| SA-01/08/97 |  |   |      |   |      | A |      |   |      | A |
| SA-19/11/97 |  | T | A    |   |      | A | A    | T |      | A |
| SA-05/12/97 |  | G | T    | G |      | A | A    | T |      | A |
| SA-16/01/98 |  |   |      |   |      | A | A    | T |      | A |
| SA-02/02/98 |  |   |      |   |      | A | A    | T |      | A |
| SA-11/02/98 |  |   |      |   |      | A | A    | T |      | A |
| SA-22/03/99 |  |   |      |   |      | A | A    | T |      | A |
| SA-26/03/99 | T  |   |      |   |      | A | A    | T |      | A |
| SA-16/04/99 |  | T |      |   |      | A | A    | T |      | A |

|             |                           |     |
|-------------|---------------------------|-----|
|             | 3340                      | *   |
| HM-175/c+   | GTTTGGATTCTCTTTGGCCGAGGCA | 398 |
| SA-21/10/94 | A                         | T   |
| L1-15/11/94 |                           |     |
| SA-30/06/95 | A                         | T   |
| SA-28/07/95 | A                         | T   |
| L1-18/12/95 |                           |     |
| SA-12/02/96 | A                         | T   |
| SA-17/06/97 | A                         | T   |
| SA-01/08/97 |                           |     |
| SA-19/11/97 | A                         | T   |
| SA-05/12/97 | A                         | T   |
| SA-16/01/98 |                           |     |
| SA-02/02/98 | A                         | T   |
| SA-11/02/98 |                           |     |
| SA-22/03/99 |                           |     |
| SA-26/03/99 | A                         | T   |
| SA-16/04/99 |                           |     |

**Figura 4.2.** Alineación de la secuencia de nucleótidos de la región del VP1/2A (398 nt) de las cepas del VHA detectadas en muestras de agua ambientales respecto a la cepa HM-175 utilizada como control. Se indican sólo las diferencias. SA, muestra de agua residual; LI, muestra de agua del río Llobregat.

*Capítulo 5.*

*Epidemiología molecular del virus de la  
hepatitis E*

---



## **5.1. INTRODUCCIÓN**

La hepatitis de tipo E es una enfermedad autolimitada transmitida entéricamente, responsable de numerosos casos de hepatitis aguda esporádicos y epidémicos en países tropicales y subtropicales (Balayan, 1997). La infección está generalmente asociada al consumo de agua o alimentos, principalmente moluscos bivalvos, contaminados fecalmente. En el continente europeo y Norte América, la infección por VHE es poco común, y algunos de los casos documentados son importados de zonas endémicas (Center for Disease Control and Prevention, 1993; Zaaijer y col., 1993; Dupuy y col., 1998; Coursaget y col., 1994; Jänisch y col., 1997). Sin embargo, se han descrito casos esporádicos no asociados a viajes a países endémicos en Estados Unidos (Kwo y col., 1997), Holanda (Zaaijer y col., 1993), Grecia (Psichogiou y col., 1995), España (Torné y col., 1988; Romero-Gómez y col., 1997), Portugal (Araújo y col., 1997), Alemania (Wang y col., 1993), Turquía (Koksal y col., 1994), Italia (Zanetti y col., 1994; Cacopardo y col., 1997), Austria (Worm y col., 1998), Reino Unido (McCrudden y col., 2000).

Diversos estudios serológicos han descrito prevalencias de anti-VHE que oscilan entre 1-3% en la población general en diversos países europeos (Balayan, 1997), incluido España (Jardí y col., 1993; Buti y col., 1995; Mateos y col., 1999), más altas que lo que cabría esperar considerando los pocos casos clínicos descritos. Estos datos sugieren la existencia de infecciones subclínicas provocadas por virus circulantes en la población, o bien que los tests de diagnóstico serológico no son fiables cuando son aplicados en zonas no endémicas, debido a una baja especificidad.

La detección de anticuerpos anti-VHE en el suero de diversas especies de animales salvajes y domésticos ha demostrado la posible implicación de éstos como posible reservorio de la infección. Además de en varias especies de primates, se ha observado la infección natural en cerdos, pollos, ganado bovino y ovino, y roedores en regiones endémicas, con una seroprevalencia de IgG similar a la observada en humanos de la misma zona (Yarborough, 1997). Recientemente se ha demostrado la presencia de anti-VHE en cerdos y ratas en Estados Unidos (Meng y col., 1997; Kabrane-Lazizi y col., 1999; Favorov y col., 2000), y se ha podido aislar y caracterizar una cepa de VHE de origen porcino (Meng y col., 1997). Estudios moleculares han relacionado esta cepa con otras aisladas a partir de pacientes con hepatitis

aguda en la misma región, y que presentan aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de nucleótidos respecto a las cepas tipo procedentes de regiones endémicas (Meng y col., 1997; Schlauder y col., 1998). De igual manera se ha aislado una cepa de VHE en cerdos en Taiwan estrechamente relacionada con cepas de origen humano de la misma zona endémica, pero genéticamente distintas a las aisladas en Estados Unidos (Hsieh y col., 1999). Estos datos sugieren la posibilidad de infecciones inter-específicas, que podrían ser responsables de la relativa elevada prevalencia de anti-VHE en países no endémicos. Se requieren más estudios para evaluar la naturaleza zoonótica de la infección, y identificar posibles reservorios de la enfermedad.

Resulta necesario documentar la presencia de cepas circulantes del VHE y la existencia de casos autóctonos de infección aguda para poder evaluar la importancia sanitaria de la infección por VHE poblaciones de áreas geográficas consideradas como no endémicas. Dada la dificultad para aislar el virus en cultivo celular, la amplificación del ARN viral mediante PCR en muestras clínicas, animales y ambientales parece ser la única alternativa válida en la actualidad.

En este capítulo de la tesis se estudió la epidemiología de la infección por VHE en una zona considerada como no endémica. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- ★ Detección de las cepas del VHE presentes en el ambiente.
- ★ Multiplicación *in vivo* de la cepa BCN del VHE aislada a partir de agua residual, y análisis bioquímico, serológico y virológico de la infección en monos rhesus.
- ★ Secuenciación y clonaje de la cepa BCN del VHE.
- ★ Identificación de nuevas cepas del VHE en pacientes con hepatitis agudas.
- ★ Evaluar la existencia de un reservorio animal del VHE en nuestra zona.

## **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.1. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL VHE EN AGUAS RESIDUALES**

#### **5.2.1.1. Muestras de agua residual**

Se analizaron 40 muestras de agua residual no tratada de la entrada de la planta depuradora de San Adrián de Besós (Barcelona) durante el período comprendido entre septiembre de 1994 y abril de 1999 (Tabla 5.1.). Las muestras se recogieron y se procesaron como se indica en el Capítulo 1. Quince de las muestras se procesaron, además, por un método que permitía una mayor concentración de los virus presentes en las muestras. Brevemente, 250 ml de agua residual se centrifugó a 15.300  $\times g$  durante 1 h a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-14) para recuperar el material particulado. Una vez eliminado parte del sobrenadante, se resuspendía el precipitado en aproximadamente 90 ml del mismo. Cuarenta mililitros de esta muestra pre-concentrada se volvían a centrifugar a 48.400  $\times g$  durante 3 h 45 min a 4°C (Beckman J2-21, rotor JA-20) para recuperar todo el material en suspensión junto con los virus. Las partículas víricas retenidas en el sedimento se eluyeron con 4 ml de tampón glicina 0,25 M pH 9,5 en hielo durante 30 min. Tras la adición de 4 ml de PBS 2 $\times$ , los sólidos en suspensión se separaron por centrifugación a 3.000  $\times g$  (Medifuge) durante 20 min. Las partículas víricas contenidas en el sobrenadante se recuperaron por ultracentrifugación a 229.600  $\times g$  durante 1 h a 4°C, y fueron finalmente recogidas en 100  $\mu l$  de PBS. El concentrado vírico y 50 ml de muestra pre-concentrada se conservaban a -80°C. Con este tratamiento se conseguía una suspensión de partículas víricas aproximadamente 1100 veces más concentrada que la muestra original.

**TABLA 5.1.**  
**Muestras de agua residual en que se estudió la**  
**presencia de VHE**

| Año   | Nº muestras |
|-------|-------------|
| 1994  | 4           |
| 1995  | 8           |
| 1996  | 3           |
| 1997  | 16          |
| 1998  | 6           |
| 1999  | 3           |
| Total | 40          |

### 5.2.1.2. Suspensiones víricas control

Se utilizaron como controles para los experimentos de PCR suspensiones fecales al 10% en PBS pH 7,3 obtenidas a partir de monos *Macaca fascicularis* infectados con la cepa de origen humano de VHE Sar-55, que fueron cedidas por los Drs. S.U. Emerson y R.H. Purcell (National Institutes of Health, USA). La concentración de dichas suspensiones había sido determinada por infectividad en *Macaca fascicularis* (Tsarev y col., 1994), presentando un título de  $10^5$  DI<sub>50</sub>/ml.

Se utilizaron como controles en los experimentos de estabilidad suspensiones de Poliovirus tipo 1 LSc 2ab obtenidas por cultivo sobre células BGM ( $10^{7-8}$  PFU/ml), como se indica en el apartado 2.2.1.3.2.

### 5.2.1.3. Detección de ARN de VHE en muestras de agua residual

La detección de ARN de VHE en muestras de agua residual se hizo básicamente como se indica en el apartado 2.2.5., utilizando iniciadores específicos de VHE (Tabla 5.2.). La extracción de ácidos nucleicos se realizó por el método descrito por Boom y col., según se describe en el apartado 2.2.5.1., utilizando GuSCN y adsorción de los ácidos nucleicos sobre partículas de sílice. De cada una de las suspensiones de ARN obtenidas se realizó una dilución 1:10 en tampón de elución.

La reacción de síntesis de ADNc contenía 5 µl de la solución de ARN directa o de la dilución 1:10. Esto correspondía a 2 o 0,2 ml de agua residual concentrada por el método habitual, o 5,5 o 0,55 ml de las muestras procesadas por el método que permitía una mayor concentración. El análisis se realizó bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 2.2.5.3., utilizando el iniciador externo 473R (Tabla 5.2.) complementario al ARN de VHE. Se realizaron 30 ciclos de amplificación con iniciadores externos (51-473R) y 30 ciclos con iniciadores internos (101-383R). Estos cebadores reconocen la secuencia de ARN de las cepas humanas del VHE.

Posteriormente se realizó el mismo análisis utilizando iniciadores degenerados de la región del ORF2 que reconocen la secuencia de nucleótidos del VHE de las cepas de origen humano y porcino. Así se realizó la síntesis de ADNc con el iniciador 6417R, seguido de 30 ciclos de amplificación con iniciadores externos (5687d/6417R) y 30 ciclos con iniciadores internos (5972d/6319Rd). Los resultados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

**TABLA 5.2.**  
**Iniciadores utilizados para la detección de ARN-VHE por PCR anidada**

| Región                | Posición <sup>a</sup> | Reacción | Iniciador | Producto (pb) | Secuencia <sup>b</sup>        |
|-----------------------|-----------------------|----------|-----------|---------------|-------------------------------|
| VHE ORF1              | 51-70                 | Primera  | 51        | 422           | 5'-GGCTCCTGGCCTCACTACTG-3'    |
|                       | 451-473               | Primera  | 473R      |               | 5'-CCTCGAAGCAGTAAGTGCGGTC-3'  |
|                       | 101-120               | Segunda  | 101       | 282           | 5'-ACTCTGCCCTTGCGAATGCT-3'    |
|                       | 364-383               | Segunda  | 383R      |               | 5'-TACCAACGCTGAACATCACG-3'    |
| VHE ORF2 <sup>c</sup> | 5687-5708             | Primera  | 5687d     | 730           | 5'-AAATATGCMCAGTACCGGGTTG-3'  |
|                       | 6395-6417             | Primera  | 6417R     |               | 5'-CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC-3' |
|                       | 5972-5993             | Segunda  | 5972d     | 347           | 5'-GTYATGYTYTGCATACATGGCT-3'  |
|                       | 6298-6319             | Segunda  | 6319Rd    |               | 5'-AGCCGACGAAATYAATTCTGTC-3'  |

<sup>a</sup> La posición se refiere a la secuencia de la cepa de Birmania (Tam y col, 1991)

<sup>b</sup> Y = C o T; M = A o C; V = G, A o C; B = G, T o C; R = A o G

<sup>c</sup> Los iniciadores degenerados del ORF2 fueron tomados de Meng y col., 1997

Para eliminar la posibilidad de falsos positivos debidos a contaminación con ADN amplificado producto de reacciones anteriores, se siguieron siempre las normas descritas en el apartado 2.2.5.3.4., y cada análisis se realizó por duplicado en experimentos independientes.



#### **5.2.1.4. Sensibilidad del método de detección y evaluación de la estabilidad del VHE en agua residual**

Para poder evaluar la sensibilidad del método utilizado para la detección de VHE, se inoculó una suspensión control de VHE Sar-55 en agua residual y en PBS pH 7,3, a una concentración final de  $10^3$  DI<sub>50</sub> de VHE Sar-55 por mililitro. Paralelamente se inoculó Poliovirus tipo 1 en PBS y en agua residual como control ( $10^5$  PFU/ml muestra). Las muestras se incubaron a 20°C, y se extrajeron volúmenes de 1 ml a diferentes tiempos (0 h, 12 h, 24 h, 9 días, 1 mes y 2 meses). Las partículas víricas contenidas en las alícuotas se concentraron por ultracentrifugación (apartado 2.2.3.1.1.), resuspendiendo el sedimento en 100 µl de PBS. Los ácidos nucleicos se extrajeron por el método descrito en el apartado 2.2.5.1. Se analizaron por RT-PCR anidada diluciones decimales utilizando los iniciadores específicos correspondientes, para estudiar el límite de detección para cada uno de los virus en los dos medios a lo largo del tiempo.

#### **5.2.1.5. Secuenciación de los fragmentos de genoma viral amplificado**

Para confirmar los resultados obtenidos por RT-PCR anidada en las muestras de agua residual urbana y descartar una posible contaminación, se analizó la secuencia de nucleótidos del ADN amplificado obtenido con los iniciadores del ORF1. Paralelamente se analizó también la secuencia de ADN del producto de PCR anidada obtenido a partir de la cepa control Sar-55.

El ADN obtenido con los iniciadores del ORF1 se purificó por electroelución (apartado 4.2.3.1.1.). La secuenciación de las dos cadenas del ADN se realizó utilizando el sistema ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* con AmpliTaq® ADN polimerasa FS (Perkin-Elmer, Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante (apartado 4.2.3.3.). La reacción de secuenciación se realizó en un volumen total de 10 µl que contenían 1,6 pmol del iniciador 101 o 383R y aproximadamente 10 ng del ADN a analizar. El ADN producto de la reacción se precipitó con etanol absoluto y acetato sódico 0,3 M pH 5,5 durante 10 min en hielo. Tras centrifugar el ADN durante 20 min a  $20.000 \times g$ , se secaba en

una centrifuga Speed Vac durante 10 min y se analizaban con el secuenciador automático ABI PRISM™ 377 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems).

La secuencia obtenida se comparó con la región homóloga de la cepa de VHE Sar-55 que se utilizó como control, para descartar una posible contaminación, y posteriormente con las secuencias de las demás cepas de VHE depositadas en los bancos de datos GenBank y EMBL (European Molecular Biology Library) mediante el programa FASTA del GCG v.9.0 (Genetic Computers's Group, Md., Wisc.). Las secuencias se alinearon con el programa CLUSTALW v.1.8 (Thompson y col., 1994), y se sombrearon con el programa GeneDoc v.2.5.000. De este modo se pudo hacer una valoración inicial de las diferencias que presentaba la cepa detectada respecto a las demás previamente caracterizadas.

## **5.2.2. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCIÓN PRODUCIDA POR LA CEPA BCN DEL VHE**

### **5.2.2.1. Cultivo de la cepa BCN del VHE en animales experimentales**

El estudio de las características genéticas y patogenicidad de la cepa de VHE detectada en agua residual requiere la multiplicación del virus en un animal de experimentación, dada la dificultad para cultivar este virus sobre líneas celulares.

Dos monos rhesus (*Macaca mulatta*) previamente inmunizados contra la hepatitis A, fueron inoculados por vía intravenosa con 25 ml de agua residual (5 ml/día en cada animal), que previamente había dado un resultado positivo por PCR.

### **5.2.2.2. Análisis bioquímico, serológico y virológico de la infección**

Durante el período post-inoculación se tomaron muestras de sangre y heces semanalmente, para analizar la evolución de la enfermedad.

Se analizó la actividad de los enzimas hepáticos alanina aminotransferasa, isocitrato deshidrogenasa y  $\gamma$ -glutamyl transferasa (Tsarev y col., 1992). La detección de anticuerpos IgM e IgG se realizó por ensayo inmunoenzimático ELISA, utilizando antígenos recombinantes derivados del ORF2 de la cepa de Méjico y Birmania (Tsarev y col., 1992). Este trabajo se realizó en colaboración con los Drs. R.H. Purcell y S.U. Emerson (National Institutes of Health, USA).

Para analizar la presencia de partículas víricas en la sangre y heces de los monos inoculados, se analizaron por RT-PCR anidada alícuotas de suero y suspensiones fecales al 10% en PBS pH 7,3. La extracción de ácidos nucleicos se realizó por el método descrito por Boom y col. en 1990. De cada una de las suspensiones de ARN obtenidas se realizó una dilución 1:10 en tampón de elución. Se analizaron 5  $\mu$ l de la solución de ARN directa o de la dilución 1:10 (correspondientes a 5 o 0,5  $\mu$ l de suero o suspensión fecal) por RT-PCR seguido de PCR anidada siguiendo la metodología que se indica en el apartado 2.2.5., utilizando los iniciadores de detección del ORF1 (Tabla 5.2.). Los resultados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 3% en TBE, y tinción con bromuro de etidio.

### ***5.2.3. CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA DE LA CEPA BCN DEL VHE***

Para poder caracterizar con detalle la cepa de VHE aislada a partir de agua residual urbana, se estudió la secuencia de nucleótidos de las partículas víricas contenidas en las heces de los monos rhesus infectados experimentalmente. Esto permitiría establecer la relación filogenética respecto a otras cepas del VHE.

#### **5.2.3.1. Amplificación parcial del genoma de la cepa BCN**

El método utilizado se basa en la amplificación enzimática de diferentes regiones solapadas del genoma viral y el posterior análisis de la secuencia de los amplicones. Se recogieron las secuencias genómicas completas de 9 cepas del VHE depositadas en los bancos de datos GenBank y EMBL, que se alinearon utilizando el programa CLUSTALW v.1.8 (Thompson y col., 1994), y se sombrearon las diferencias utilizando el programa PrettyBox

(GCG, Md., Wis.). A partir de esta representación se escogieron regiones conservadas y se diseñaron iniciadores específicos que permitieran obtener fragmentos de ADN por PCR anidada o semianidada (Tabla 5.3.), utilizando el programa OLIGO v.4.01s (National Biosciences, Inc.). Se utilizaron estos iniciadores para obtener fragmentos de ADN amplificado solapados a lo largo de todo el genoma del virus aislado. Esto proporcionaría suficiente material genético para el posterior estudio de la secuencia de nucleótidos.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó por el método de Boom (apartado 2.2.5.1.) a partir de alícuotas de una suspensión fecal al 10% obtenida a partir de los monos infectados experimentalmente, que como se había comprobado previamente, contenía partículas víricas del VHE. En todos los casos la elución se realizó en la mitad del volumen inicial para obtener así una solución de ARN doble concentrada, y se realizaba una dilución 1:10 en tampón de elución. A partir del ARN extraído, se realizó RT-PCR seguida de PCR anidada o semianidada para poder amplificar diferentes regiones según se indica a continuación (Figura 5.1.).

#### **5.2.3.1.1. Región 5'ORF1 (Dominio metiltransferasa)**

A partir de 5 µl de ARN (correspondientes a 10 µl o 1 µl de suspensión fecal) se amplificó un fragmento de 668 pb por RT-PCR con los iniciadores 25/693R. A partir de este producto se realizó PCR anidada con los iniciadores 51/473R y 101/383R, y PCR semianidada con los iniciadores 25/383R y 101/693R (Tabla 5.3.; Figura 5.1.), bajo las mismas condiciones indicadas en el apartado 2.2.5.3. Se obtuvieron cuatro fragmentos solapados de 422, 282, 358 y 592 pb respectivamente, en suficiente cantidad para realizar posteriores estudios.

#### **5.2.3.1.2. Región ORF1 (Dominio Y – Proteasa)**

Se utilizó el sistema Superscript One-Step™ RT-PCR (Gibco) y ELONGASE™ (Gibco) para poder obtener un fragmento de 2115 pb por RT-PCR larga.

Diez microlitros de la solución de ARN (dilución  $2 \times 10^{-1}$ , correspondiente a 2 µl de suspensión fecal) se desnaturalizaron durante 5 min a 65°C, y seguidamente se añadieron 10 nmol de DTT y 10 U de inhibidor de ARNasas. La mezcla de reacción contenía 11 µl de ARN

desnaturalizado, mezcla de reacción 1× suplementada con MgSO<sub>4</sub> 5 mM para conseguir una concentración final de 1,5 mM, 25 pmol de los iniciadores 101 y 2216R (Tabla 5.3.), 1 µl de RT/Taq (Gibco) y 1 µl de ELONGASE™ (Gibco), en un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin-Elmer) durante 45 min a 50°C para permitir la síntesis de ADNc, seguido de 2 min a 94°C, y a continuación se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 35 s, hibridación a 55°C durante 30 s y elongación a 68°C durante 3 min, y una incubación final a 68°C durante 10 min. El resultado se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1% y tinción en bromuro de etidio.

Para poder obtener suficiente ADN, a partir 5 µl ADN obtenido por RT-PCR larga se realizó una segunda reacción de amplificación utilizando iniciadores internos, en un volumen final de 50 µl que contenía, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl (1×tampón II, Perkin-Elmer), 12,5 nmol de cada desoxinucleótido trifosfato, 25 pmol de los iniciadores 1000/1457R, 1000/1940R, 1698/1940R o 1698/2216R (Tabla 5.3.), y 2 U de AmpliTaq® ADN polimerasa (Perkin-Elmer). La reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 2.2.5.3.3. El resultado se analizó por electroforesis en gel de agarosa 3% y tinción en bromuro de etidio, y se comprobó la síntesis de cuatro fragmentos de 520, 1002, 260 y 537 pb respectivamente.

#### **5.2.3.1.3. Región ORF1 (Anillo poli-Pro – Dominio X)**

A partir de 2,5 µl de ARN (correspondientes a 5 µl de suspensión fecal) se amplificó un fragmento de 620 pb por RT-PCR con los iniciadores 2000/2700R. A partir de este producto se realizó PCR semianidada con los iniciadores 2000/2450R (Tabla 5.3.; Figura 5.1.), bajo las mismas condiciones indicadas en el apartado 2.2.5.3.3. Con esto se obtendría un fragmento de 370 pb.

#### **5.2.3.1.4. Región ORF1 (Dominio X–Helicasa–ARN polimerasa)**

Se utilizó el sistema Superscript One-Step™ RT-PCR (Gibco) y ELONGASE™ para poder obtener un fragmento de 3623 pb por RT-PCR larga, que contenía 2/3 del ORF1, el ORF3 completo solapado con 1/3 del ORF2. La reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que para la amplificación del dominio Y – proteasa, utilizando los iniciadores

2000/5700R (25 pmol) (Tabla 5.3.), aunque al tratarse de un fragmento más largo el tiempo de elongación se prolongó a 5 min.

A partir 10 µl ADN obtenido por RT-PCR larga se realizó una segunda amplificación utilizando los iniciadores internos 2540/5120R (Tabla 5.3.). Esto produciría un fragmento de 2587 pb. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, que contenían 60 mM de Tris-SO<sub>4</sub> (pH 9,1 a 25°C), 18 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 200 µM de cada NTP y 1 µl de enzima ELONGASE™. La mezcla de reacción se incubó durante 3 min a 94°C, y se continuó con 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 1 min, hibridación a 50°C 30 s y elongación a 68°C 4 min, y una elongación final a 68°C durante 10 min. El resultado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

#### **5.2.3.1.5. Región ORF1 (Helicasa – ARN polimerasa)**

A partir de 2,5 µl de ARN (correspondientes a 5 µl de suspensión fecal) se amplificó un fragmento de 1012 pb por RT-PCR con los iniciadores 3000/4000R. A partir de este producto se realizó PCR anidada con los iniciadores 3209/3740R y 3209/3474R, y PCR semianidada con los iniciadores 3000/3474R (Tabla 5.3.; Figura 5.1.), bajo las mismas condiciones indicadas en el apartado 2.2.5.3.3., para obtener tres fragmentos solapados de 551, 284 y 450 pb respectivamente.

#### **5.2.3.1.6. Región ORF1 (ARN polimerasa)**

A partir de 2,5 µl de ARN (correspondientes a 5 µl de suspensión fecal) se amplificó un fragmento de 746 pb por RT-PCR con los iniciadores 3740/4469R. A partir de este producto se realizó PCR semianidada con los iniciadores 3740/4000R y 4000/4469R (Tabla 5.3.; Figura 5.1.) (apartado 2.2.5.3.3), para obtener dos fragmentos de 314 y 450 pb respectivamente.

#### **5.2.3.1.7. Región 3'ORF1 – ORF3 – 5'ORF2**

Se utilizó el sistema Superscript One-Step™ RT-PCR (Gibco) y ELONGASE™ para poder obtener un fragmento de 2698 pb por RT-PCR larga, que contenía la zona de solapamiento de

los tres ORFs. La reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que para la amplificación del dominio Y – proteasa, utilizando los iniciadores 3740/6419R (35 pmol), aunque al tratarse de un fragmento más largo el tiempo de elongación fue de 4 min.

A partir de 10 µl ADN obtenido por RT-PCR larga se realizó una segunda amplificación utilizando los iniciadores internos 4000/6318R y 4380/6000R (Tabla 5.3.). Esto produciría dos fragmentos de 2032 y 1597 pb. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, que contenían 60 mM de Tris-SO<sub>4</sub> (pH 9,1 a 25°C), 18 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 200 µM de cada NTP y 1 µl de enzima ELONGASE™. La mezcla de reacción se incubó durante 3 min a 94°C, y se continuó con 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 35 s, hibridación a 55°C 30 s y elongación a 68°C 4 min, y una elongación final a 68°C durante 10 min. El resultado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

#### **5.2.3.1.8. Región 3'ORF2**

A partir de 2,5 µl de ARN (correspondientes a 5 µl de suspensión fecal) se amplificó un fragmento de 760 pb por RT-PCR con los iniciadores 6240/7000R. A partir de este producto se realizó PCR semianidada con los iniciadores 6240/6419R, 6318/7000R y 6419/7000R (Tabla 5.3.; Figura 5.1.) (apartado 2.2.5.3.3), para obtener tres fragmentos solapados de 198, 682 y 581 pb.

#### **5.2.3.1.9. Región 3'ORF2 – 3'NTR – pA**

A partir de 5 µl de ARN (correspondientes a 10 µl de suspensión fecal) se amplificó un fragmento de aproximadamente 240 pb por RT-PCR con los iniciadores 7000/pT. La reacción se llevó a cabo básicamente como se indica en el 2.2.5.3., añadiendo 25 pmol del iniciador 7000 y 0,5 µg del iniciador pT (Gibco), y la hibridación de los iniciadores se realizó a 45°C. A partir de este producto se realizó PCR semianidada con los iniciadores 7000/pTHE (Tabla 5.3.; Figura 5.1.), bajo las mismas condiciones indicadas en el apartado 2.2.5.3.3.

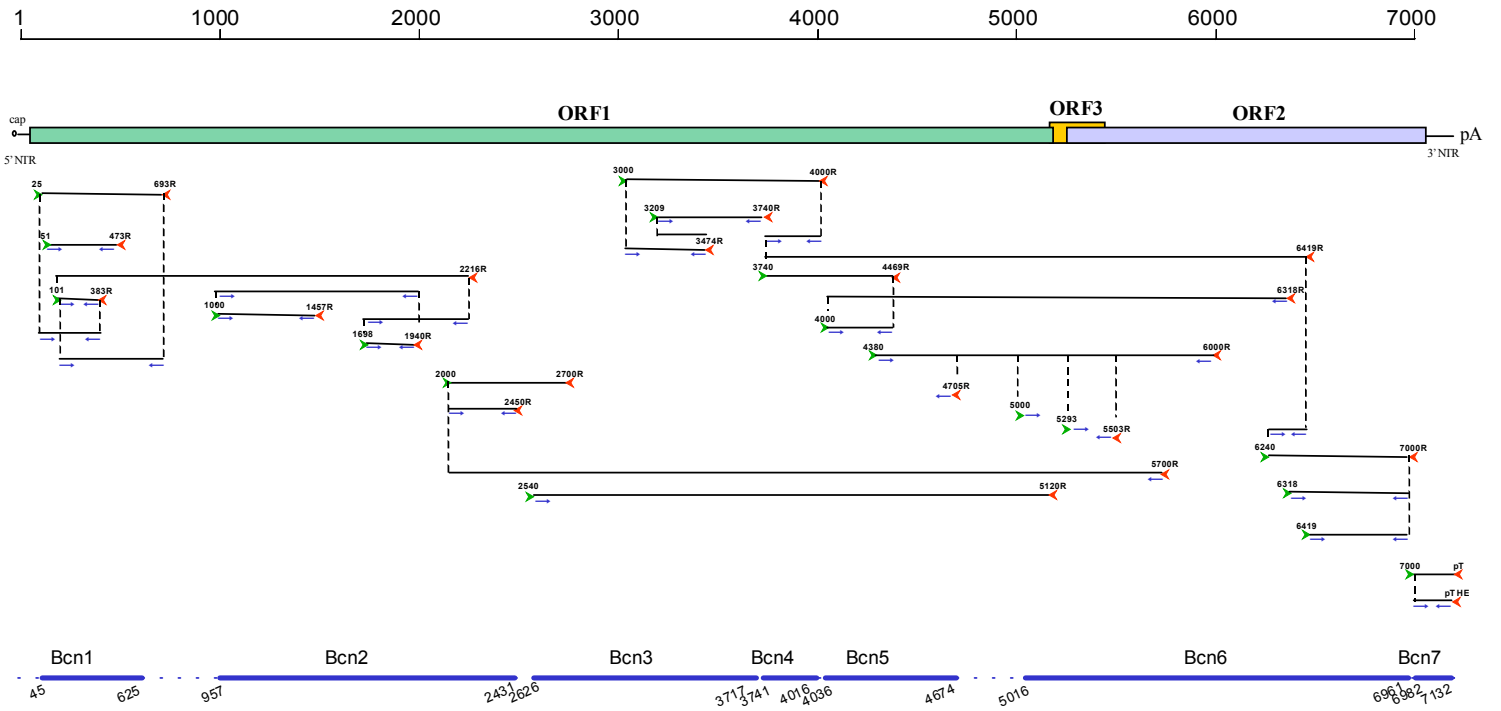
**TABLA 5.3.**  
**Oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial y secuenciación del genoma de la cepa BCN del VHE**

| Región  | Posición <sup>a</sup> | Reacción            | Nombre | T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup> | Secuencia  |
|---|-----------------------|---------------------|--------|----------------------------------|--|
| <b>5'ORF1:</b><br>Metiltransferasa                        | 25-44                 | Primera             | 25     | 64                               | 5'-GCCATGGAGGCCCATCAGTT-3'                       |
|   | 674-693               |                     | 693R   | 62                               | 5'-CCCTCATACGTCACCACAAC-3'                       |
|   | 51-70                 | Primera/Anidada     | 51     | 70                               | 5'-GGCTCCTGGCATCACTACTGCT-3'                     |
|   | 451-473               |                     | 473R   | 74                               | 5'-CCGTGGAAGCAGTAAGTGC GGTC-3'                   |
|   | 101-120               | Anidada/Semianidada | 101    | 68                               | 5'-ACTCTGCCCTTGCGAATGCTGT-3'                     |
|   | 364-383               |                     | 383R   | 60                               | 5'-TACCAACGCTGAACATCACG-3'                       |
| <b>ORF1:</b><br>Dominio Y,<br>Proteasa                    | 101-120               | Primera larga       | 101    | 68                               | 5'-ACTCTGCCCTTGCGAATGCTGT-3'                     |
|   | 2197-2216             |                     | 2216R  | 54                               | 5'-CTACTAGGTATAGAAGGCTC-3'                       |
|   | 937-956               | Anidada             | 1000   | 60                               | 5'-ACCTCATGCTCCACTAAGTC-3'                       |
|   | 1679-1698             |                     | 1698   | 62                               | 5'-CAGTAAAGGTCTCCAGGTC-3'                        |
|   | 1438-1457             |                     | 1457R  | 60                               | 5'-AGCCACTTCATGAAGCAGCA-3'                       |
|   | 1920-1939             |                     | 1940R  | 62                               | 5'-GTGAAACACCGGGGGCAAAA-3'                       |
| <b>ORF1:</b><br>Anillo poli-Pro,<br>Dominio X             | 2081-2099             | Primera             | 2000   | 62                               | 5'-GGCATGTTTGGGAGTCGGC-3'                        |
|   | 2681-2701             |                     | 2700R  | 68                               | 5'-GTATATGCCGGTCCCGAGGAG-3'                      |
|   | 2432-2451             | Semianidada         | 2450R  | 60                               | 5'-TTAGACGCGTTAACGAGCCA-3'                       |
| <b>ORF1:</b><br>Dominio X,<br>Helicasa, ARN<br>polimerasa | 2081-2099             | Primera             | 2000   | 62                               | 5'-GGCATGTTTGGGAGTCGGC-3'                        |
|   | 5685-5704             |                     | 5700R  | 58                               | 5'-CGTACTGGGCATAATTAGA-3'                        |
|   | 2539-2558             | Anidada larga       | 2540   | 70                               | 5'-CGACGGTGGCGCCGCTACA-3'                        |
|   | 5107-5126             |                     | 5120R  | 52                               | 5'-GCAAAGACATGTTATTCAT-3'                        |
| <b>ORF1:</b><br>Helicasa,<br>ARN polimerasa               | 3023-3041             | Primera             | 3000   | 60                               | 5'-GAGTTGCGTAATGCCTGGC-3'                        |
|   | 4017-4035             |                     | 4000R  | 60                               | 5'-GGGATAAAACGGGCGAGAG-3'                        |
|   | 3189-3209             | Anidada/Semianidada | 3209   | 68                               | 5'-ACCGAACCAGATCCAGCCA-3'                        |
|   | 3721-3740             |                     | 3740R  | 68                               | 5'-GGCAAGACGGCGGGAAGGCA-3'                       |
|   | 3454-3473             |                     | 3474R  | 68                               | 5'-TGTAGGTAGCGCCCTGCGCC-3'                       |
| <b>ORF1:</b><br>ARN polimerasa                            | 3721-3740             | Primera             | 3740   | 68                               | 5'-TGCCTTCCCGCGTCTTGCC-3'                        |
|   | 4448-4467             |                     | 4469R  | 58                               | 5'-ATAATAGCACACTTAGGCC-3'                        |
|   | 4017-4035             | Semianidada         | 4000   | 60                               | 5'-CTCTCGCCCGTTTTATCCC-3'                        |
|   | 4017-4035             |                     | 4000R  | 60                               | 5'-GGGATAAAACGGGCGAGAG-3'                        |
| <b>3'ORF1-ORF3-<br/>5'ORF2</b>                            | 3721-3740             | Primera larga       | 3740   | 68                               | 5'-TGCCTTCCCGCGTCTTGCC-3'                        |
|   | 6400-6419             |                     | 6419R  | 60                               | 5'-ACCCTTATCCTGCTGAGCAT-3'                       |
|   | 4017-4035             | Anidada larga       | 4000   | 60                               | 5'-CTCTCGCCCGTTTTATCCC-3'                        |
|   | 6299-6319             |                     | 6318R  | 62                               | 5'-GCCGACGAAATCAATTCTGTC-3'                      |
|   | 4381-4406             | Anidada             | 4380   | 76                               | 5'-AAAGGCATCCATGGTGTTCGAGAATG-3'                 |
|   | 5959-5978             |                     | 6000R  | 60                               | 5'-CATAACAAGACCAGAGGTGG-3'                       |
|   | 5290-5309             | Anidada             | 5293   | 64                               | 5'-CTCCGCCCTTCGCAATCCC-3'                        |
|   | 4995-5015             |                     | 5000   | 60                               | 5'-TCGTTCATAACCTGATTGGCA-3'                      |
|   | 5685-5704             |                     | 5700R  | 58                               | 5'-CGTACTGGGCATAATTAGA-3'                        |
|   | 5485-5504             |                     | 5503R  | 68                               | 5'-GGTGTCTATGGGCCGGAGCGA-3'                      |
| <b>3'ORF2</b>   | 6221-6240             | Primera             | 6240   | 62                               | 5'-AATGGTGTGGTGAGATCGG-3'                        |
|   | 6962-6981             |                     | 7000R  | 62                               | 5'-CCTCAAGCAATGCTAGCGCA-3'                       |
|   | 6400-6419             | Semianidada         | 6419   | 60                               | 5'-ATGCTCAGCAGGATAAGGGT-3'                       |
|   | 6299-6319             |                     | 6318   | 62                               | 5'-GACAGAATTGATTCGTCGGC-3'                       |
|   | 6400-6419             |                     | 6419R  | 60                               | 5'-ACCCTTATCCTGCTGAGCAT-3'                       |
| <b>3'ORF2-3'NTR-<br/>poliA</b>                            | 6962-6981             | Primera             | 7000   | 62                               | 5'-TGCCTAGCATTGCTTGAGG-3'                        |
|   | 7205-...              |                     | pT     | 32-36                            | 5'-T <sub>12-18</sub> -3'                        |
|   | 7190-7225             | Semianidada         | pTHE   | 126                              | 5'-CCCAGATCTGGT <sub>20</sub> CAGGGAGCGCGAAAC-3' |

<sup>a</sup> La posición se refiere a la secuencia de la cepa de Birmania (Tam y col, 1991)

<sup>b</sup> La temperatura de fusión se calculó según la ecuación  $T_m = 4 \times (\text{número de pares GC}) + 2 \times (\text{número de pares AT})$





**Figura 5.1.** Amplificación parcial y secuenciación del genoma de la cepa BCN del VHE

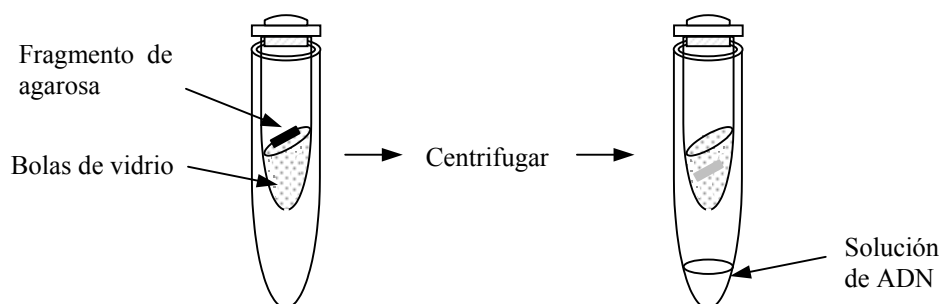
- Iniciador directo
- Iniciador reverso
- ADN amplificado
- Dirección de la secuenciación
- Secuencia estudiada
- Fragmento no secuenciado

### 5.2.3.2. Purificación de fragmentos de ADN

La metodología aplicada para la purificación de fragmentos de ADN en solución o a partir de geles de agarosa se eligió en función de las características del ADN obtenido y de su concentración:

- 1) *Electroelución en sacos de diálisis* (Capítulo 4, apartado 4.2.3.1.1.)
- 2) *Purificación de ADN producto de PCR utilizando el kit QIAquick* (Qiagen) (Capítulo 4, apartado 4.2.3.1.2.)
- 3) *Columnas de bolas de vidrio*

El método de purificación de fragmentos de ADN mediante columna de bolas de vidrio se utilizó para purificar fragmentos de longitudes superiores a 1 kb a partir de geles de agarosa de baja concentración (1% en TBE). Una vez separadas las bandas, se tiñeron durante 15 min en una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml, y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Se recuperó la banda de interés por escisión de la región de agarosa que la contenía con ayuda de un bisturí. El fragmento de agarosa se dispuso en el interior de un microtubo de 0,5 ml en el que se había construido una columna de bolas de vidrio y al que se la había practicado un pequeño orificio en el fondo. La muestra se centrifugó durante 4 min a 16.000 ×g, para recuperar el ADN en solución en un tubo situado para recogerlo (Figura 5.2.). La completa elución de la muestra a través de la columna de bolas de vidrio se comprobó en el transiluminador. En el caso de visualizar restos de bromuro de etidio en el tubo pequeño, se repetía la centrifugación hasta completar la recuperación.



**Figura 5.2.** Esquema de la columna de bolas de vidrio utilizada en la purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Una vez recuperada la fase acuosa en un microtubo, se realizó un lavado con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y de la misma manera se continuó con un lavado con un volumen de cloroformo. El ADN se precipitaba con etanol absoluto y 0,3 M de acetato sódico pH 5,5 a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 12 h, y se secó al vacío (Speed-Vac SC100). El ADN precipitado se resuspendió en el volumen inicial de agua bidestilada estéril, y se guardaba a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis.

### **5.2.3.3. Cuantificación de la concentración de ADN purificado**

La cuantificación de la concentración del ADN purificado recuperado en solución se realizó en un gel de agarosa por comparación con un patrón de ADN de concentraciones conocidas (Capítulo 4, apartado 4.2.3.2.). Para la cuantificación de fragmentos pequeños ( $<1$  kb) se realizaron diluciones seriadas de ADN del fago  $\Phi\text{X174}$  digerido con *Hae* III, y se cargaron en un gel de agarosa al 3% volúmenes que contenían 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng y 15,62 ng del ADN patrón, junto con alícuotas de diluciones seriadas del ADN que se quería cuantificar. En el caso de fragmentos mayores ( $>1$  kb) se utilizó como patrón diluciones del ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind* III, que contenían 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng, 15,62 y 7,81 ng de ADN, que se cargaron en geles de agarosa al 1% junto con diluciones de la muestra. La concentración de ADN en las muestras se calculó por comparación de la intensidad de las bandas en cada dilución con relación a la banda del patrón de tamaño molecular más aproximado.

### **5.2.3.4. Secuenciación y análisis del ADN**

La secuencia de nucleótidos de las dos cadenas del ADN se obtuvo utilizando el sistema ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* con AmpliTaq® ADN polimerasa FS (Perkin-Elmer, Applied Biosystems), como se indica en el Capítulo 4 apartado 4.2.3.3. En todos los casos la reacción de secuenciación se realizó en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$  que contenían 1,6 pmol del iniciador correspondiente y un volumen equivalente a 10 ng del ADN a analizar.

Las secuencias obtenidas de las dos cadenas se ensamblaron y se compararon con las regiones análogas de las cepas de VHE depositadas en los bancos de datos mediante el

programa BLASTN v.2.0.8 (GCG, Md., Wis.) (Altschul y col., 1997). Los fragmentos homólogos de las cepas de VHE se alinearon mediante el programa CLUSTALW v.1.8 (Thompson y col., 1994). El sombreado se realizó con el programa GeneDoc v.2.5.000.

La relación filogenética entre las cepas detectadas y las demás cepas de VHE descritas y depositadas en los bancos de datos se realizó por el método de la máxima verosimilitud utilizando el programa DNAML v.3.572c contenido en el paquete PHYLIP v.3.5c (Felsenstein 1993). La bondad de los agrupamientos se determinó analizando 100–1000 posibles agrupamientos con los programas BOOTSTRAP, DNADIST, NEIGHBOR y CONSENSE, contenidos en el paquete PHYLIP v.3.5c. La representación gráfica fue creada con el programa TREEVIEW v.1.5 (Page, 1996).

La secuencia de las proteínas codificadas por cada fragmento se dedujo con el programa MAP (GCG, Md. Wis.), y se compararon y se alinearon con las secuencias de otras cepas de igual manera que las secuencias de nucleótidos.

#### **5.2.4. CLONAJE DEL GENOMA DE LA CEPA BCN DEL VHE**

##### **5.2.4.1. Obtención de los fragmentos de ADN para clonar**

Para tener suficiente ADN para posteriores experimentos se clonaron tres regiones del genoma de la cepa BCN del VHE:

- Región 5'–ORF1, entre los nucleótidos 25 y 488, que engloba el segmento que amplifican los iniciadores utilizados normalmente para la detección de VHE en muestras ambientales
- Región hipervariable, entre los nucleótidos 1960 y 2450, que incluye una región descrita como de alta variabilidad genética.
- Región ORF3, entre los nucleótidos 5021 y 5518, que incluye la región de solapamiento de los tres ORFs, con el ORF3 completo.

La obtención de los fragmentos de ADN se obtuvo por PCR anidada o semianidada a partir de los fragmentos obtenidos con los iniciadores 25/693R, 1698/2700R y 5000/5700R por RT-PCR siguiendo el método explicado anteriormente. Para la segunda amplificación se utilizó *Pfu* ADN polimerasa (Stratagene). Este enzima termoestable presenta una tasa de error

1,8 veces inferior que la *Taq* ADN polimerasa, por lo que es adecuada para experimentos en que se requiere una gran fidelidad. Su baja sensibilidad, sin embargo, hace imposible su uso en los experimentos de detección, así como en la primera amplificación. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, que contenían tampón de la *Pfu* 1× (20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% Triton<sup>®</sup> X-100, 0,1 mg/ml BSA), 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 µM de cada dNTP, 25 pmol de cada iniciador, 5 µl del ADN molde y 2,5 U de *Pfu* ADN polimerasa. El enzima se añadía en último lugar para minimizar la degradación de los iniciadores debido a su actividad exonucleasa 3'-5'. La mezcla se incubó a 95°C durante 3 min, y a continuación se hicieron 30 ciclos de incubación durante 1 min a 95°C, 1 min a la temperatura de hibridación apropiada (Tabla 5.4.) y 1,5 min a 72°C, seguido de una extensión final a 72°C durante 5 min. Debido al bajo rendimiento obtenido en estas reacciones, cada uno de los fragmentos se amplificó varias veces independientemente para conseguir suficiente cantidad de ADN para los experimentos de clonaje. El resultado se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 3% y tinción con bromuro de etidio. Posteriormente se purificó por electroelución seguido de fenolización y precipitación (apartado 4.2.3.1.1.) en etanol, y se cuantificó la concentración de ADN (apartado 4.2.3.2.) en las soluciones obtenidas.

**TABLA 5.4.**  
**Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del ADN viral con *Pfu* ADN polimerasa**

| Fragmento clonado    | Posición <sup>a</sup>  | Iniciador     | T <sup>a</sup> de hibridación | Producto (pb) | Secuencia  |
|----------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|--|
| Región 5'ORF1        | 25-44<br>469-488       | 25<br>480R    | 50°C                          | 463           | 5'-GCCATGGAGGCCCATCAGTT-3'<br>5'-CTACAGCCAGAAAACCCGTC-3' |
| Región hipervariable | 1959-1979<br>2432-2451 | 1960<br>2450R | 55°C                          | 492           | 5'-GTCACCGCCTTCTGCTCTGC-3'<br>5'-TTAGACGCGTTAACGAGCCA-3' |
| Región ORF3          | 5023-5042<br>5499-5518 | 5030<br>5520R | 59°C                          | 495           | 5'-GGCTGTTGCTGATGGCAAGG-3'<br>5'-TCAGGCACTGGCGGGGTGTC-3' |

<sup>a</sup> La posición se refiere a la secuencia de la cepa de Birmania (Tam y col, 1991)

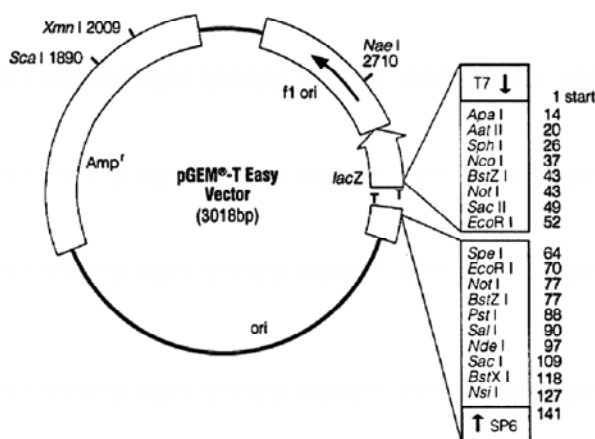
### 5.2.4.2. Cepas bacterianas y vector

Las cepas bacterianas utilizadas en los experimentos de clonaje se describen en la Tabla 5.5.

**TABLA 5.5.**  
**Cepas bacterianas utilizadas para el clonaje del genoma de la cepa BCN del VHE**

| Cepa                                     | Características genotípicas   | Fuente                       |
|--|---|------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF <sup>7</sup> | D( <i>mcrA</i> )183 Δ ( <i>merCB-hsdSMR-mrr</i> )<br>173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i><br><i>relA1 lac</i> [F <sup>+</sup> <i>proAB lac</i> <sup>q</sup> ZΔM15<br>Tn10( <i>Tet</i> <sup>r</sup> )] | Stratagene, La Jolla, Calif. |
| <i>E. coli</i> JM109                     | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i><br>(r <sub>K</sub> -,m <sub>K</sub> +) <i>relA1 supE44 Δ(lac-proAB)</i><br>[F <sup>+</sup> <i>traD36 proAB lacI</i> <sup>q</sup> ZΔM15]                                | Promega Corp., Md., Wis.     |

La estrategia adoptada para el clonaje de productos de PCR fue el sistema A/T. El vector utilizado fue el pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega Corp., Md., Wis.), que proviene del pGEM<sup>®</sup>-5Zf(+) digerido con el enzima de restricción *EcoR* V, y al que se le ha añadido una timidina en los extremos 3' del vector linearizado (Figura 5.3.). La presencia de este 3'-T favorece la eficiencia de la ligación de productos de PCR, ya que crea un extremo compatible con los extremos 3'-A del ADN generado por ciertas polimerasas termoestables (Clark, 1988). La presencia de una zona de clonaje múltiple permite la recuperación del inserto mediante digestión con un enzima de restricción.



**Figura 5.3.**  
Mapa circular del vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) utilizado en los experimentos de clonaje de la cepa BCN del VHE.

### 5.2.4.3. Reacción de 'tailing'

Los fragmentos de ADN obtenido por PCR utilizando la *Pfu* ADN polimerasa presentan extremos romos, ya que este enzima no presenta la actividad desoxinucleotidil-transferasa terminal que permite a otras polimerasas añadir un nucleótido protuberante en los extremos 3' de los amplicones. El clonaje de los fragmentos en un vector A/T requiere un paso previo para modificar los extremos. Para ello, la reacción de *tailing* se realizó en un volumen de 10 µl que contenían aproximadamente 70 ng de ADN, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 de mM KCl, 0,2 mM de dATP y 4 U de AmpliTaq® ADN polimerasa (Perkin-Elmer). La mezcla de reacción se incubó a 70°C 45 min. El ADN así tratado se utilizó directamente en los experimentos de clonaje.

### 5.2.4.4. Reacción de ligación

La reacción de ligación se realizó en un volumen de 10 µl que contenían 20-70 ng del fragmento de ADN que se quería clonar, 50 ng de ADN del vector pGEM®-T Easy, 30 mM de Tris-HCl pH 7,8 – 10 mM MgCl<sub>2</sub> – 10 mM DTT – 1 mM de ATP y 3 U de enzima ligasa de ADN del fago T4 (Promega). Las muestras se incubaron a 4°C durante 18-22 h.

### 5.2.4.5. Preparación de células competentes

Las suspensiones de células bacterianas competentes se prepararon antes de ser utilizadas y se conservaron a –80°C en CaCl<sub>2</sub> 0,1M – glicerol 15%.

Con el asa de siembra se rascó la superficie de los estocs de las células bacterianas que se querían hacer competentes, conservados a –80°C, y se resuspendió en 50 ml de medio Luria-Bertani (LB) si se trataba de *E. coli* JM109, o en LB suplementado con tetraciclina (12,5 µg/ml) en el caso de *E. coli* XL1-Blue MRF'. Se incubó la suspensión en agitación (Centromat® C, 200 rpm) a 37°C durante 18-22 h. Se hizo una dilución 1/50 del cultivo en medio fresco LB o LB-tetraciclina, y se incubó a 37°C en agitación hasta llegar a la fase exponencial (DO<sub>600</sub> = 0,4-0,5). Tras incubar el cultivo en hielo durante 10 min, se centrifugaron 10 ml del cultivo bacteriano a 3000 ×g a 4°C durante 20 min. El sedimento se resuspendió en MgCl<sub>2</sub> 0,1M frío (1/2 del volumen inicial), y se volvió a centrifugar bajo las

mismas condiciones anteriores durante 10 min. Una vez descartada la solución salina, se resuspendió el sedimento en CaCl<sub>2</sub> 0,1M frío (1/5 del volumen inicial). La suspensión se incubó en hielo durante 18-22 h, y seguidamente se recuperaron las células por centrifugaron a 3000 ×g a 4°C durante 10 min. El sedimento se resuspendió en CaCl<sub>2</sub> 0,1 M – glicerol 15% (1/10 parte del volumen inicial). Esta suspensión de células competentes se repartió en microtubos de 1,5 ml (100 µl/tubo) y se congelaron al instante sumergiéndolos en un baño de nieve carbónica y etanol absoluto. Las células se guardaron a –80°C hasta su utilización.

#### **5.2.4.6. Transformación de células competentes**

Se añadieron 70-120 ng de ADN producto de la ligación inserto-vector a un tubo con 50-100 µl de células competentes descongeladas. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. A continuación se realizó un choque térmico para permitir la entrada del ADN en las bacterias, sumergiendo los tubos que contenían las muestras en un baño a 41°C durante 45 seg, y seguidamente en hielo durante 30 seg. Inmediatamente se añadió a cada muestra 0,9 ml de medio SOC, y se incubó a 37°C en agitación durante 2 h. Tras este tiempo se sembraron 200 µl de cultivo en placas de medio LB suplementadas con tetraciclina (12,5 µg/ml) o sin este antibiótico si se trataba de la cepa JM109, ampicilina (100 µg/ml), isopropyl-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, 0,5 mM) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal, 200 mg/ml), y se incubaron a 37°C durante 18-22 h.

#### **5.2.4.7. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico**

A partir de las placas sembradas, se seleccionaron aquellas colonias de bacterias transformadas que posiblemente contenían inserto, que podían ser de color blanco o blanco con el centro de la colonia azul, y se procedió al aislamiento del clon y a la identificación de la presencia de inserto.

##### **5.2.4.7.1. Aislamiento de los clones**

Con ayuda del asa de siembra se resembró por estría cada colonia presuntamente transformante en placas de medio LB suplementado con tetraciclina-ampicilina (para la cepa



XL1-Blue MRF') o sólo con ampicilina (para la cepa JM109), IPTG y X-gal a la concentración apropiada. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-22 h. Una vez aisladas las colonias se inocularon en tubos de 5 ml de medio LB suplementado con tetraciclina y ampicilina, o sólo con ampicilina a la concentración adecuada. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 18-22 h.

#### **5.2.4.7.2. Purificación de ADN plasmídico**

El método aplicado para la recuperación de ADN plasmídico está basado en la lisis alcalina de las células del cultivo (Sambroock y col., 1989) con modificaciones (M. Puig, 1998).

Los cultivos obtenidos a partir de cada clon se centrifugaron a 5000 ×g durante 10 min, y se descartó el sobrenadante. Las bacterias contenidas en el sedimento se resuspendieron en 100 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 – EDTA 10 mM – ARNasa A 0,1 mg/ml. Seguidamente se añadió a cada tubo 200 µl de una solución de NaOH 0,2 M – SDS 1%, homogeneizando la mezcla por inversión. Se incubó 5 min a temperatura ambiente, y se añadió 150 µl de acetato potásico 3 M pH 4,7 por tubo, mezclando por inversión. Los restos celulares se separaron por centrifugación a 10.000 ×g durante 10 min. El sobrenadante se recuperó en un nuevo tubo, se trató con 300 µl de isopropanol y se volvió a centrifugar a 16.000 ×g durante 30 min para precipitar el ADN. El precipitado obtenido se lavó con 500 µl de etanol 70%, y se secó al vacío (Speed-Vac SC100). El ADN plasmídico se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril.

#### **5.2.4.8. Identificación del inserto**

Para comprobar la presencia de inserto en los plásmidos se realizaron digestiones con endonucleasas de restricción, y alternativamente se hizo PCR a partir de la colonia directamente o de la solución de ADN plasmídico.

#### **5.2.4.8.1. Identificación del inserto mediante restricción enzimática**

Las digestiones enzimáticas del ADN plasmídico se hicieron con *EcoR* I (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor. En las digestiones se utilizaron aproximadamente 3-5 µl de la solución de ADN. Posteriormente los fragmentos generados se separaron por electroforesis en geles horizontales de agarosa 1-1,5% en tampón TBE, y tinción con bromuro de etidio. Los marcadores de peso molecular utilizados para este análisis fueron ADN del fago ΦX-174 digerido con *Hae* III (Promega) y ADN del fago λ digerido con *Hind* III o con *Hind* III – *EcoR* I (Promega).

#### **5.2.4.8.2. Identificación del inserto por PCR**

La reacción de amplificación a partir de ADN plasmídico se hizo en un volumen total de 50 µl que contenía 1 µl de la solución de ADN, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C), 50 mM KCl (1×tampón II, Perkin-Elmer), 12,5 nmol de cada desoxinucleótido trifosfato, 20 pmol de cada iniciador, y 2 U de AmpliTaq® ADN polimerasa (Perkin-Elmer). La mezcla de reacción se incubó en un termociclador programable *GeneAmp PCR System* 2400 (Perkin-Elmer). En el primer ciclo de amplificación la desnaturalización se llevó a cabo a 95°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de amplificación. Las condiciones fueron, desnaturalización a 95°C durante 1 min, hibridación de los iniciadores correspondientes a 47-55°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min. Tras los 30 ciclos se realizó una extensión final a 72°C durante 5 min.

Alternativamente la identificación del inserto se hizo por PCR partiendo directamente de la colonia (Starnbach y col., 1989), bajo las mismas condiciones anteriormente indicadas. El inóculo de la muestra se hizo con ayuda del asa de siembra resuspendiendo una pequeña cantidad de cada colonia en cada tubo con la mezcla de reacción de PCR.

## **5.2.5. DESCRIPCIÓN DE NUEVAS CEPAS DEL VHE EN MUESTRAS CLÍNICAS HUMANAS**

### **5.2.5.1. Muestras de suero humano**

Se seleccionaron 37 muestras de suero humano tomadas entre octubre de 1989 y mayo de 1999 en el servicio de urgencias del Hospital General Universitario Valle de Hebrón de Barcelona, procedentes de pacientes que habían acudido a la unidad durante la primera semana de síntomas de hepatitis aguda. Estas muestras fueron amablemente cedidas por la Dra. M. Buti.

El patrón clínico de los pacientes fue analizado por el personal del Hospital General Universitario Valle de Hebrón. Catorce muestras provenían de pacientes con hepatitis aguda tipo A, 8 de pacientes con hepatitis que presentaban anticuerpos IgG anti-VHE y 15 eran de pacientes con hepatitis aguda no-A/no-E. Las hepatitis agudas víricas se definieron por la presencia de los síntomas clínicos característicos: niveles de alanina aminotransferasa en suero superiores a 10 veces el valor normal y la exclusión de otras causas de enfermedad hepática, incluyendo medicación, alcohol, enfermedad biliar, hepatitis autoinmune y otras infecciones (citomegalovirus y virus de Epstein-Barr).

Para el diagnóstico clínico del tipo de hepatitis se utilizaron ensayos inmunoenzimáticos comerciales (Abbott, North Chicago, IL) para la detección de HBsAg, IgM anti-HBc, IgM anti-VHA, IgG anti-VHE y anti-VHC. El ARN-VHC se detectó por RT-PCR utilizando el *kit* Amplicor VHC (Monitor Test Version 2.0, Roche Laboratories, Nueva Jersey, USA). Los criterios de diagnóstico fueron los siguientes:

- hepatitis A aguda, presencia de anticuerpos IgM anti-VHA
- hepatitis B aguda, presencia de anticuerpos IgM anti-HBc
- hepatitis C aguda, presencia de ARN-HCV por PCR y/o anticuerpos anti-VHC
- hepatitis E aguda, presencia de anticuerpos IgG anti-VHE

Los pacientes que no presentaban ninguno de estos marcadores se diagnosticaron como hepatitis aguda no-A/no-E.

## **5.2.6. DETECCIÓN DE CEPAS RELACIONADAS CON EL VHE EN CERDOS**

Para poder evaluar la posible función de los cerdos como reservorio de cepas víricas relacionadas con el VHE, se analizó la seroprevalencia de anticuerpos IgG en los cerdos, y se intentó identificar alguna de estas variantes a partir de muestras de heces y de agua residual de mataderos porcinos.

### **5.2.6.1. Muestras de suero porcino**

Se tomaron 60 muestras de suero de cerdos sanos (*Sus scrofa domesticus*) de diferentes edades, procedentes de 6 granjas comerciales de Cataluña: 26 hembras reproductoras de 7 meses a 2 años de edad, 24 cerdos de engorde de 5-6 meses, y 10 cochinitos de 3 semanas a 2 meses de edad. Las muestras fueron facilitadas por J. Piella.

### **5.2.6.2. Muestras de heces de cerdo**

Se recogieron en contenedores estériles 6 muestras de heces de cerdos de diferentes granjas, y se conservaron a 4°C por un tiempo no superior a 8 h, hasta que eran procesadas. Cada muestra era una mezcla de las heces de 10-12 cerdos. La recuperación de partículas víricas se realizó mediante elución con tampón glicina 0,25 M pH 9,5 a partir de una suspensión al 10% en PBS pH 7,3, como se indica en el apartado 2.2.3.4.

### **5.2.6.3. Muestras de agua residual de mataderos porcinos**

Se tomaron 12 muestras de aguas residuales de dos mataderos de cerdos. Las muestras contenían orina, heces y el contenido intestinal de los animales sacrificados diluido en agua. Se recogieron en botellas de vidrio estériles y se conservaron a -80°C hasta que eran procesadas. Se conocía que 5 muestras podían presentar un nivel bajo de contaminación fecal de origen humano y las otras 7 presentaban contaminación únicamente de origen animal, pues

los sanitarios de la planta desembocaban en un punto diferente al punto de muestreo. La recuperación de partículas víricas se realizó como se indica en el apartado 2.2.3.1.1.

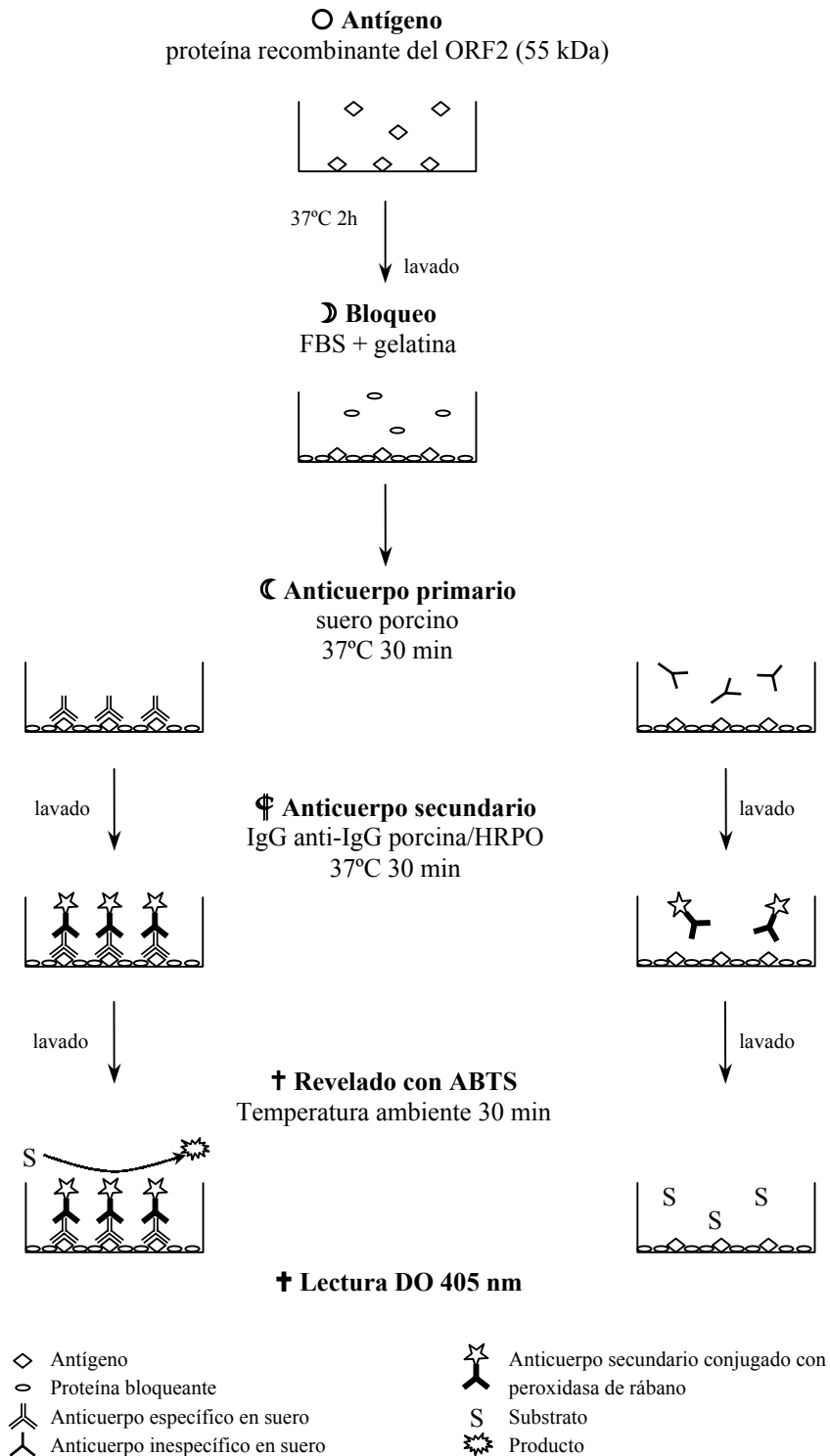
#### **5.2.6.4. ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-VHE en muestras de suero porcino**

La detección de anticuerpos IgG anti-VHE se realizó por ELISA según el método descrito por Tsarev y col. para muestras de suero de chimpancé (Tsarev y col., 1993b) (Figura 5.4.). Los ensayos se realizaron en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano. Se utilizó como antígeno una proteína recombinante truncada de 55 kDa codificada por el ORF2 de la cepa humana de VHE Sar-55, que había sido clonada y expresada en baculovirus (Tsarev y col., 1992 y 1993a; Meng y col., 1997 y 1998b) cedida por los Drs. S.U. Emerson y R.H. Purcell (National Institutes of Health, USA). Las placas se cubrieron con aproximadamente 0,6 µg de proteína antigénica por pocillo diluida en tampón carbonato pH 9,6, a 37°C durante 2 h. Tras eliminar la solución de antígeno, se realizó un bloqueo con PBS pH 7,3 – 0,05% Tween-20 – 10% FBS – 0,5% gelatina (solución de bloqueo).

Se analizaron 100 µl de las diluciones 1:20, 1:100, 1:200 y 1:1000 en solución de bloqueo de las muestras de suero de cerdo. Como control positivo se utilizó suero porcino hiper-inmune procedente de un animal inoculado con la cepa de VHE Meng (Meng y col., 1997), que se analizó en duplicado en cada test a una dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Como controles negativos se utilizó suero pre-inmune de un cerdo no inoculado diluido 1:20, 1:100, 1:200 y 1:1000 en solución de bloqueo, y un suero humano a una dilución 1:20 y 1:100. Los sueros porcinos hiper-inmune y pre-inmune fueron cedidos por los Drs. S.U. Emerson y R.H. Purcell (National Institutes of Health, USA). Para permitir la unión de los anticuerpos al antígeno se incubó a 37°C durante 30 min, y posteriormente se eliminó mediante cuatro lavados con solución de lavado (PBS pH 7,3 – 0,05% Tween-20).

A continuación se añadieron 100 µl de una solución 1:100 en solución de bloqueo del anticuerpo secundario. Se utilizó una IgG anti-IgG porcina obtenida en conejo y conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma), y se incubó a 37°C durante 30 min para permitir el reconocimiento. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante cuatro lavados con solución de lavado, y el revelado se hizo con 100 µl/pocillo de una solución de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) 0,2 mM, durante 30 min a temperatura ambiente. La

densidad óptica a 405 nm se midió utilizando el lector Labsystems iEMS Reader MF y el programa iEMS Ascent v.2.1. Las muestras de suero se consideraron positivas para la presencia de anticuerpos anti-VHE si se cumplía que: la densidad óptica era  $\geq 0,2$  y era más del doble de la densidad óptica del suero pre-inmune a la misma dilución.



**Figura 5.4.** ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-VHE en muestras de suero de cerdo.

## **5.2.7. ANÁLISIS GENÉTICO DE NUEVAS CEPAS DEL VHE EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DE ORIGEN ANIMAL**

### **5.2.7.1. Extracción de ácidos nucleicos**

A partir de las muestras de suero la extracción de ácidos nucleicos se realizó por el método de Boom y col., según se describe en el apartado 2.2.5.1., utilizando GuSCN y adsorción de los ácidos nucleicos sobre partículas de sílice. Para las muestras de suero humano, partiendo de 20-25  $\mu\text{l}$  de suero se obtuvieron 20-25  $\mu\text{l}$  de solución de ácidos nucleicos. Para las muestras de suero porcino se siguió el mismo método y, además, se hicieron extracciones a partir de 40  $\mu\text{l}$  de suero para obtener 20  $\mu\text{l}$  de solución de ácido nucleicos doble concentrada. Tres muestras de suero porcino de 400  $\mu\text{l}$  se ultracentrifugaron (229.600  $\times g$  durante 1 h a 4°C) y se resuspendió el sedimento en 20  $\mu\text{l}$  de PBS1 $\times$ . A continuación se realizó la extracción de ácidos nucleicos a partir de 10  $\mu\text{l}$  de concentrado para obtener 10  $\mu\text{l}$  de solución de ARN.

### **5.2.7.2. Síntesis de ADNc, amplificación enzimática y secuenciación**

La reacción de transcripción inversa contenía 5  $\mu\text{l}$  de la solución de ARN (correspondiente a 5  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  o 100  $\mu\text{l}$  de suero), y se realizó como se indica en el apartado 2.2.5.3.1. En todas las pruebas de detección se utilizaron los iniciadores degenerados de la región de ORF2 (Tabla 5.2.) (Meng y col., 1997) que reconocen cepas de VHE humanas y de origen porcino. Las muestras que resultaron positivas por este análisis, se sometieron a una nueva reacción de amplificación utilizando iniciadores degenerados del extremo 5' del ORF1 (Tabla 5.6.) (Meng y col., 1998b; Schlauder y col., 1999) que también reconocen todas las cepas del VHE.

**TABLA 5.6.**  
**Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de ARN-VHE en muestras suero**

| Región   | Posición <sup>a</sup> | Reacción | Iniciador | Producto (pb) | Secuencia <sup>b</sup>                       |
|----------|-----------------------|----------|-----------|---------------|--|
| VHE ORF1 | 12-33                 | Primera  | 12        | 548           | 5'-ATATGTGGTTCGATGCCATGGAG-3' <sup>c</sup>   |
|          | 541-560               | Primera  | 560Rd     |               | 5'-CATVGCYTTCBGCRCACATCAG-3'                 |
|          | 56-79                 | Segunda  | 56d       | 417           | 5'-CTGGCATYACTACTGTCYATTGAGC-3' <sup>d</sup> |
|          | 451-473               | Segunda  | 473Rd     |               | 5'-CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC-3' <sup>d</sup>   |

<sup>a</sup> La posición se refiere a la secuencia de la cepa de Birmania (Tam y col, 1991)

<sup>b</sup> Y = C o T; V = G, A o C; B = G, T o C; R = A o G

<sup>c</sup> Tomado de Meng y col., 1998b

<sup>d</sup> Tomado de Schlauder y col., 1999

Los resultados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 3% (p/v) y tinción con bromuro de etidio

En todos los análisis se siguieron las medidas de control básicas que se describen en el apartado 2.2.5.3.4. para reducir la posibilidad de contaminación cruzada con moléculas de ADN amplificado producto de reacciones previas, y para evitar falsos negativos.

El ADN amplificado se purificó y se analizó la secuencia de nucleótidos como se indica en el Capítulo 4.

### 5.2.7.3. Evaluación de la sensibilidad de la reacción de RT-PCR anidada en muestras de suero y heces

Los iniciadores degenerados del ORF2 utilizados para detectar ARN del VHE en muestras de suero, heces y aguas residuales de mataderos (Tabla 5.2.) fueron tomados a partir de trabajos previos realizados por otros autores (Meng y col., 1997). Su sensibilidad fue evaluada por medio de diversos análisis.

Se analizaron por RT-PCR seguido de PCR anidada diluciones seriadas del ARN extraído a partir de una alícuota de la suspensión estoc de VHE Sar-55, que había sido previamente titulada por infectividad en monos ( $10^5$  DI<sub>50</sub>/ml) (Tsarev y col., 1994). Del mismo modo se analizaron diluciones obtenidas a partir de una suspensión fecal de VHE BCN para evaluar el límite de detección.



Para poder evaluar una posible inhibición de la reacción de amplificación debido al efecto de sustancias inhibidoras presentes en el suero, 100  $\mu$ l de suero porcino se suplementó con una alícuota de 10  $\mu$ l de suspensión estoc de BCN. A continuación se realizó extracción de ácidos nucleicos, y se estudió el límite de detección del ARN vírico en este tipo de muestra.

Del mismo modo para poder descartar un resultado negativo debido a la inhibición de la reacción de amplificación, se suplementó una muestra de 1 g de heces con 10  $\mu$ l de suspensión estoc de BCN. Tras un tiempo de contacto de 20 min, las partículas víricas se eluyeron de las heces por adición de 4 ml tampón glicina 0,25 M pH 9,5 y agitación durante 30 min a 4°C. Tras la adición de 4 ml de PBS 2 $\times$ , la materia orgánica en suspensión se eliminó por centrifugación a 12.000  $\times$ g durante 30 min, y el sobrenadante se ultracentrifugó a 229.600  $\times$ g. Las partículas víricas recogidas en el sedimento se recuperaron en 100  $\mu$ l de PBS. A continuación se realizó extracción de ácidos nucleicos por el método descrito anteriormente, y se estudió el límite de detección del ARN vírico en este tipo de muestra.

#### **5.2.7.4. Análisis del genoma de las nuevas cepas del VHE**

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con aquellas contenidas en los bancos de datos GenBank y EMBL (European Molecular Biology Library) y se alinearon con los fragmentos homólogos de las cepas de VHE utilizando programas informáticos. La relación filogenética entre las cepas detectadas y las demás cepas de VHE descritas y depositadas en los bancos de datos se realizó por el método de la máxima verosimilitud como se indicó en el apartado 5.2.3.4.

Los números de acceso de las secuencias de nucleótidos de las cepas de VHE depositadas en el GenBank se recogen en la Tabla 5.7.

**TABLA 5.7.**  
**Secuencias de VHE utilizadas en el análisis filogenético**

| <b>Cepa vírica</b> | <b>Lugar de aislamiento</b> | <b>Origen del aislamiento</b> | <b>Nº acceso en GenBank</b> | <b>Referencia</b>       |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Porcina            | Estados Unidos              | Suero de cerdo                | Af082843                    | Meng y col. 1997        |
| US1                | Estados Unidos              | Suero humano                  | Af060668                    | Erker y col. 1999       |
| US2                | Estados Unidos              | Suero humano                  | Af060669                    | Erker y col. 1999       |
| India1             | Madras, India               | ?                             | X99441                      | No publicado            |
| India2             | Hyderabad, India            | Suero humano                  | Af076239                    | No publicado            |
| India3             | India                       | ?                             | X98292                      | Donati y col. 1997      |
| Birmania1          | Rangún, Birmania            | Heces humanas                 | M73218                      | Tam y col. 1991         |
| Birmania2          | Rangún, Birmania            | ?                             | D10330                      | Aye y col. 1993         |
| Barcelona          | Barcelona, España           | Agua residual urbana          | Af058984                    | Pina y col. 1998b       |
| Nepal              | Katmandú, Nepal             | Heces humanas                 | Af051830                    | Gouvea y col. 1998      |
| Pakistán           | Sarghoda, Pakistán          | Heces humanas                 | M80581                      | Tsarev y col. 1992      |
| China1             | China                       | Heces humanas                 | L25547                      | Yin y col. 1994         |
| China2             | Xinjiang, China             | Heces humanas                 | L08816                      | Bi y col. 1993          |
| China3             | Xinjiang, China             | Suero humano                  | D11092                      | Aye y col. 1992         |
| China4             | Uigh, China                 | Heces humanas                 | D11093                      | No publicado            |
| China5             | Kashi, China                | Heces humanas                 | L25595                      | Yin y col. 1994         |
| China6             | Hebei, China                | ?                             | M94177                      | Bi y col. 1993          |
| Marruecos1         | Marruecos                   | Heces humanas                 | Af010428                    | Chatterjee y col., 1997 |
| Marruecos2         | Marruecos                   | Heces humanas                 | Af065061                    | Meng y col. 1999        |
| Egipto             | Egipto                      | Heces humanas                 | Af051351                    | Tsarev y col. 1999      |
| Grecia1            | Grecia                      | Suero humano                  | Af110388                    | Schlauder y col. 1999   |
| Grecia2            | Grecia                      | Suero humano                  | Af110389                    | Schlauder y col. 1999   |
| Italia1            | Italia                      | Suero humano                  | Af110387                    | Schlauder y col. 1999   |
| Méjico             | Telixtac, Méjico            | Heces humanas                 | M74506                      | Huang y col. 1992       |

## **5.3. RESULTADOS**

### **5.3.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA INFECCIOSA DEL VHE A PARTIR DE AGUA RESIDUAL URBANA**

#### **5.3.1.1. Detección de cepas del VHE en muestras de agua residual urbana**

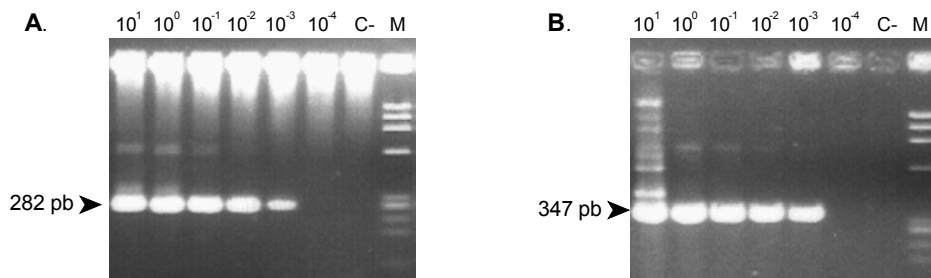
Se analizaron un total de 41 muestras de agua residual no tratada recogida de la planta depuradora de San Adrián de Besós, por RT-PCR anidada utilizando los iniciadores específicos de cepas humanas del VHE que amplifican la región 5' del ORF1.

En una primera etapa (1994-1995) se recogieron 15 muestras (una por mes), y se obtuvo un concentrado vírico por el método normal y siguiendo el proceso que permitía la concentración de las partículas contenidas en la muestra unas 1100 veces. Como resultado de estos experimentos, una de las muestras (recogida el 31/08/95) dio resultado positivo por PCR anidada en 5 µl de ARN de las diluciones directa y 1:10 (correspondiente a 2 y 0,2 ml de muestra). El resultado se confirmó en dos experimentos sucesivos independientes realizados bajo las mismas condiciones. En el análisis de la suspensión de partículas víricas super-concentrado se repitió el resultado positivo en la misma muestra por PCR anidada en 5 µl de la dilución directa, equivalente a 5,5 ml de muestra. Dicha muestra dio resultado positivo para la presencia de AdH y EV, y negativo para VHA (Capítulo 1), y no presentaba ninguna característica diferencial en comparación con las otras muestras. En las 14 muestras restantes en las que se concentraron de la misma forma, no se detectó ARN de VHE ni en la suspensión vírica normal ni en la super-concentrada.

En las demás muestras recogidas entre 1996 y 1999 no se detectó ARN de VHE tras realizar PCR anidada con los iniciadores del ORF1. Las muestras recogidas en 1997-98 se analizaron, además, por RT-PCR anidada utilizando iniciadores degenerados del ORF2 que detectan cepas humanas y porcinas del VHE, dando todas ellas un resultado negativo.

### 5.3.1.2. Sensibilidad del método de detección de VHE en muestras de agua residual urbana

La sensibilidad de la técnica de detección por RT-PCR seguida de PCR anidada utilizando los iniciadores degenerados que delimitan una región del ORF2, se valoró inicialmente a partir de una suspensión fecal de la cepa Sar-55 de VHE. Esta solución había sido previamente titulada por infectividad en monos, resultando ser de  $10^5$  DI<sub>50</sub>/ml de estoc (Tsarev y col., 1994). Se hicieron diluciones decimales seriadas (desde  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) a partir de una solución de ARN de dicha cepa, y se analizaron 5 µl de cada dilución que contenían el ARN equivalente a  $5 \times 10^2$ – $5 \times 10^{-4}$  DI<sub>50</sub>. Tras una primera amplificación con los iniciadores externos del ORF1 o del ORF2, se realizó una segunda amplificación con los iniciadores internos, llegándose a detectar bandas visibles hasta la dilución  $10^{-5}$ , equivalente a  $10^{-3}$  DI<sub>50</sub> de Sar-55 (Figura 5.5.) por PCR anidada con los dos grupos de iniciadores.



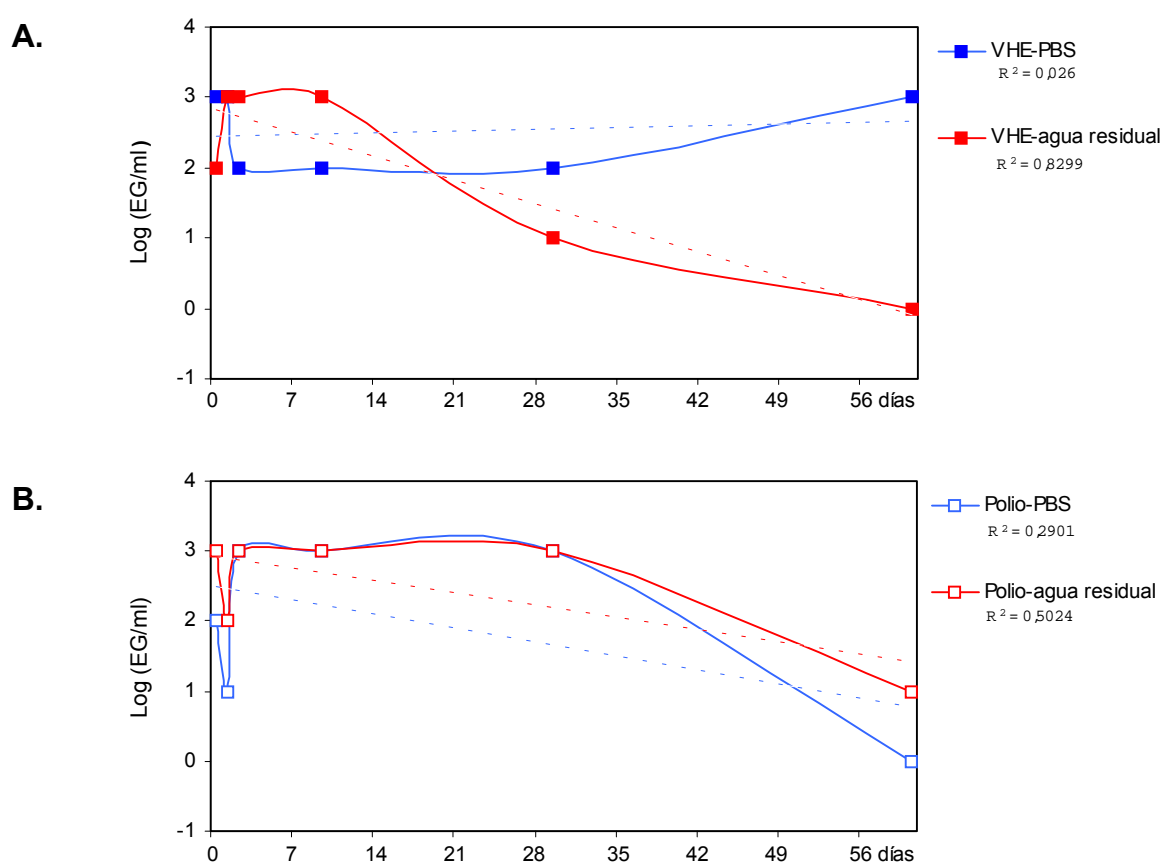
**Figura 5.5.** Sensibilidad en la detección de VHE Sar-55 por PCR anidada utilizando los iniciadores del extremo 5' del ORF1 (A), o los iniciadores degenerados del ORF2 (B). Se indican las dosis infecciosas correspondientes a cada dilución. C-, control negativo. M, marcador de peso molecular (ADN de ΦX174 digerido con *Hae* III).

### 5.3.1.3. Evaluación de la estabilidad del VHE en agua residual

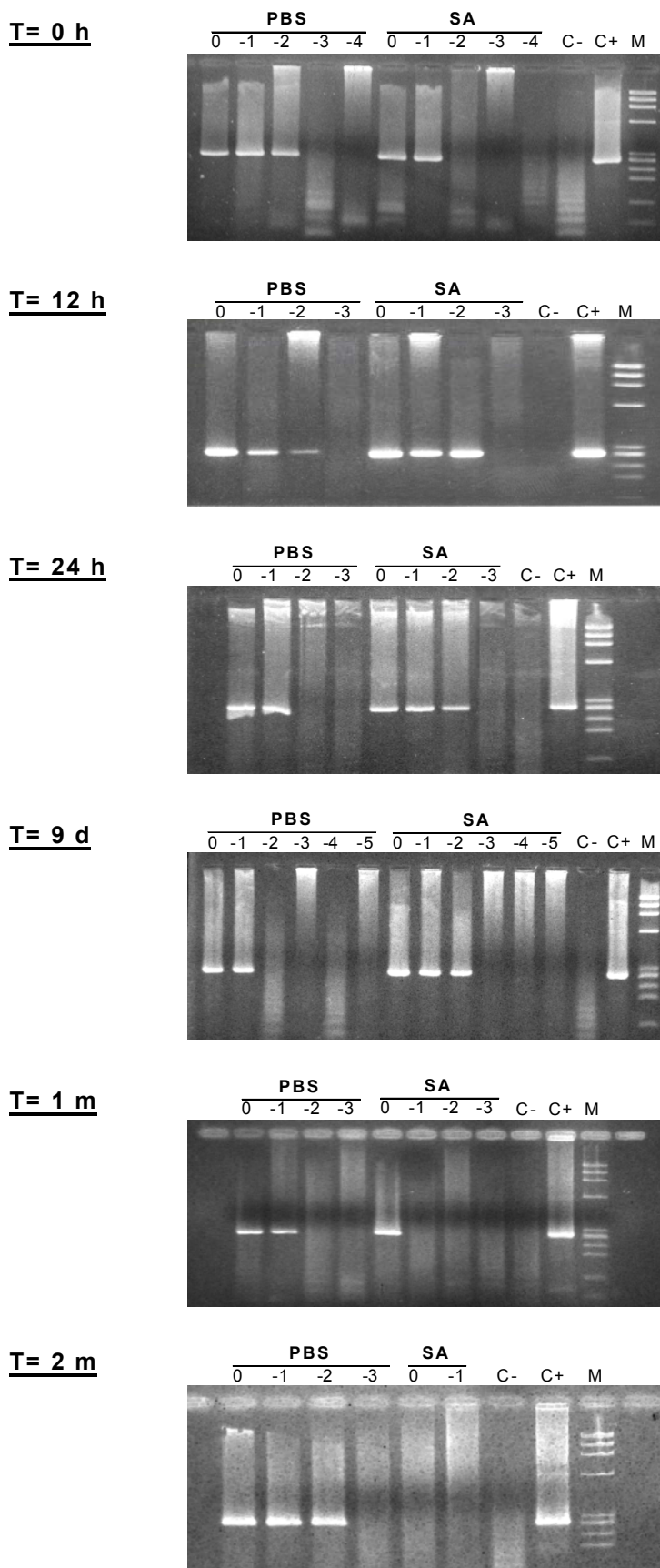
Para descartar la posibilidad de tener resultados negativos debido a inhibición de la reacción de amplificación producida por sustancias contenidas en el agua residual, y evaluar la sensibilidad del método de detección de ARN-VHE, se suplementó una muestra con  $10^3$  DI<sub>50</sub>/ml. Al mismo tiempo se estudió la estabilidad de la partícula vírica en este medio, en comparación con la estabilidad que presenta en PBS a 20°C a lo largo del tiempo.

Se comprobó que la concentración de partículas víricas en PBS se mantenía en los mismos niveles desde el tiempo inicial hasta los dos meses después de iniciar el experimento (Figura 5.6.A), detectándose hasta las diluciones  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ , equivalentes a  $5 \times 10^0$ – $5 \times 10^{-1}$   $DI_{50}$ . En la muestra de agua residual suplementada se detectó ARN del VHE hasta las diluciones  $10^{-1}$ – $10^{-2}$  hasta 9 días después de ser añadida, y se observó una reducción de la concentración 1 mes después, detectándose solamente en la dilución 0 (equivalente a  $5 \times 10^{-1}$   $DI_{50}$ ). A los 2 meses no hay niveles detectables de VHE en la muestra de agua residual. Esto correspondería a una reducción del título desde  $10^3$   $DI_{50}/ml$  de muestra a las 0 h ( $T=0$ ), hasta 10  $DI_{50}/ml$  un mes después ( $T=1$  m) y  $<10$   $DI_{50}/ml$  dos meses después ( $T=2$  m) (Figura 5.6. y 5.7.). Se ha calculado una  $T_{90} = 20$  d y  $T_{99} = 39$  d en agua residual.

El mismo experimento realizado paralelamente con Poliovirus-1 demostró los mismos niveles de detección en la muestra inicial y dos meses después tanto en PBS como en agua residual (Figura 5.6.B), demostrando así que la estabilidad de la partícula se mantiene durante al menos dos meses, con una  $T_{90} = 38$  d y  $T_{99} = 79$  d en agua residual. Así pues, la estabilidad del VHE en agua residual observada en este experimento fue inferior que la de Poliovirus-1.



**Figura 5.6.** Estabilidad de (A) VHE y (B) Poliovirus-1 en agua residual y en PBS a 20°C.



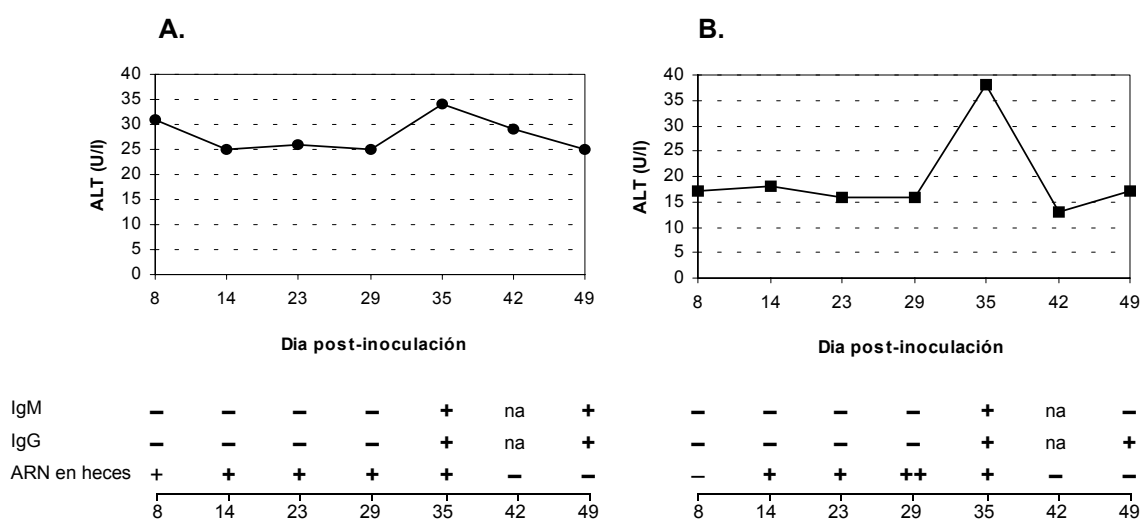
**Figura 5.7.** Estabilidad de VHE Sar-55 en agua residual (SA) y en PBS a lo largo del tiempo. Se indican las diluciones decimales del ARN. C-, control negativo. M, marcador de peso molecular (ADN de  $\Phi$ X174 digerido con *Hae* III).

### 5.3.1.4. Caracterización de la infección producida por la cepa BCN del VHE en primates

El seguimiento de los parámetros serológicos y virológicos reveló la presencia de una infección producida por VHE en los monos inoculados con el agua residual que previamente había dado resultado positivo por PCR.

El análisis por PCR anidada a partir de las muestras fecales recogidas semanalmente demostró la excreción de partículas víricas del VHE durante el período comprendido entre la primera o segunda semana post-inoculación y la semana quinta (Figura 5.8.). Los ensayos serológicos confirmaron la presencia de IgM y IgG anti-VHE en los dos monos a las 5 semanas de la inoculación, coincidiendo con el final de la excreción de virus en las heces. Uno de ellos presentaba todavía niveles detectables de IgM a las 6 semanas, mientras que en el otro ya habían desaparecido y sólo se detectaban IgG. El análisis por PCR de muestras de suero no indicó la presencia de viremia.

En cuanto a los parámetros bioquímicos, los niveles de las enzimas transaminasas hepáticas permanecieron normales, a excepción de un ligero aumento en la actividad alanina aminotransferasa en la semana 5 (Figura 5.8.B). Estos datos confirman el aislamiento de una cepa del VHE viable.



**Figura 5.8.**

Seguimiento bioquímico (ALT), serológico y virológico de la infección producida por la cepa BCN del VHE en monos rhesus (mono A y B). El análisis de la presencia de ARN en heces se hizo por PCR anidada.

na, no analizado; - negativo por PCR anidada; + positivo débil tras PCR anidada; + positivo tras PCR anidada; ++ positivo tras RT-PCR

### **5.3.1.5. Caracterización molecular de la cepa BCN del VHE**

Para poder estudiar la secuencia de nucleótidos de la cepa BCN se amplificaron por RT-PCR 8 segmentos del genoma, y a partir de ellos se obtuvieron por PCR anidada 21 fragmentos de ADN solapados. La secuencia de estos fragmentos se comparó con los bancos de datos, y se ensamblaron mediante programas informáticos, dando lugar a 7 segmentos llamados Bcn1, Bcn2, Bcn3, Bcn4, Bcn5, Bcn6 y Bcn7 (Figura 5.1.). En total se secuenciaron 6206 nt, que representan un 86,2% del genoma.

#### **5.3.1.5.1. Fragmento Bcn1**

En análisis de la secuencia de nucleótidos de las dos cadenas de 4 fragmentos de ADN solapados del extremo 5' del ORF1, dio como resultado un fragmento de 581 nt. Esta secuencia se depositó en el banco de datos de GenBank con el nº acceso AF058679. Esta presentaba aproximadamente un 98% de identidad respecto a la secuencia de nucleótidos de las regiones homólogas de una cepa de Nepal, un 93-96% de identidad respecto de cepas de India y Birmania, un 92-93% respecto al grupo de cepas de China y Pakistán, y un 77% de identidad con la cepa aislada en Méjico (Tabla 5.8.).

Al nivel de la secuencia de aminoácidos esto representaba más de un 98% respecto a la cepa de Nepal, un 95-98% de identidad respecto a las demás cepas asiáticas, y un 92% respecto a la cepa mejicana (Tabla 5.9.). En esta región se han identificado los residuos descritos como representativos del dominio metiltransferasa (Koonin y col., 1992).

#### **5.3.1.5.2. Fragmento Bcn2**

El análisis de la secuencia de nucleótidos de las dos cadenas de 5 fragmentos de ADN solapados de la mitad 5' del ORF1, dio como resultado un fragmento de 1474 nt. Esta secuencia se depositó en el banco de datos de GenBank con el nº acceso AF058680. Ésta presentaba un 97,5% de identidad respecto a la cepa de Nepal, 94-96% de identidad respecto a cepas de India y Birmania, un 89-92% con el grupo en el que engloban India3, China y Pakistán, y un 66% de identidad con la cepa aislada en Méjico (Tabla 5.8.). En esta región está localizada un segmento de máxima variabilidad entre los nucleótidos 1055-1384



(correspondientes a la región entre los nucleótidos 2011-2331 de la cepa Birmania1) (Tsarev y col., 1992). En esta zona, BCN presenta la máxima identidad con la cepa India1 y Nepal (96,88%), mientras que para las demás cepas asiáticas varía entre 86-92%, y solamente un 54% con la cepa de Méjico. En relación con cepas aisladas en el norte de Africa (Marruecos1), se observó un 79% de identidad en la región hipervariable.

Al nivel de la secuencia de aminoácidos esto representaba un 94-96% de identidad respecto a las cepas asiáticas, y un 69% respecto a la cepa mejicana (Tabla 5.9.). En esta región se han localizado los residuos conservados representativos de los dominios Y, *papain-like* proteasa y el dominio X (Koonin y col., 1992).

#### **5.3.1.5.3. Fragmento Bcn3**

Se estudió de la secuencia de nucleótidos de 3 fragmentos de ADN solapados de la región intermedia del ORF1, obteniendo una secuencia de 676 nt que se depositó en el banco de datos de GenBank con el n° acceso AF058681. Posteriormente se obtuvo una secuencia de 416 nt inmediatamente anterior, que se ensambló para dar lugar a un fragmento de 1092 nt. El análisis comparativo demostró un 97,5% de identidad respecto a la cepa de Nepal, un 96-97% respecto a las cepas de India1 y 2 y Birmania, un 92-93% con las demás cepas asiáticas, y un 75% de identidad con la cepa de Méjico (Tabla 5.8.).

A nivel de la secuencia de aminoácidos se observó un 96-98% de identidad respecto a las cepas asiáticas, y un 87% respecto a la cepa mejicana (Tabla 5.9.). En esta región se han localizado los residuos conservados representativos del dominio X, la región de la helicasa y parte de la región que codifica la ARN polimerasa-ARN dependiente (Koonin y col., 1992).

#### **5.3.1.5.4. Fragmento Bcn4 y Bcn5**

A partir de 3 fragmentos se obtuvieron dos secuencias contiguas de 276 nt (Bcn4) y 639 nt (Bcn5) que se depositaron en el banco de datos de GenBank con el n° acceso AF061581 y AF058683 respectivamente. El estudio comparativo demostró un mayor grado de similitud con las cepas aisladas en Nepal. India y Birmania (94,2-97,8%), mientras que en las demás oscilaba entre 89-93% en ambas regiones, y un 75-79% de identidad con la cepa aislada en Méjico (Tabla 5.8.).

En las secuencia de aminoácidos se observó una identidad del 84-100% y 96-99% respecto a las cepas asiáticas, 100% y 88% respecto a la cepa mejicana (Tabla 5.9.) respectivamente. En estas regiones se han localizado residuos conservados representativos la ARN polimerasa (Koonin y col., 1992).

#### **5.3.1.5.5. Fragmento Bcn6**

El fragmento más largo de los analizados, Bcn6 (nº acceso GenBank Af058684) de 1946 nt, comprende el extremo 3' del ORF1, el ORF3 completo y 1813 nt del ORF2. Se obtuvo a partir de los fragmentos solapados del extremo 3' y por secuenciación progresiva a partir de 3 fragmentos de ADN amplificado por PCR larga, única estrategia que dio un resultado satisfactorio en la zona de solapamiento de los tres ORFs dada la dificultad para amplificarla, como se había descrito previamente (Yin y col., 1994). En esta región se observó nuevamente una mayor identidad con la cepa de Nepal (98%), 95-96% con las cepas de India y Birmania, un 92-93% respecto al grupo de cepas de China y Pakistán, 89-90% respecto a dos cepas aisladas en Egipto y Marruecos (Marruecos2), y 80% de identidad con la cepa mejicana (Tabla 5.8.).

Al nivel de la secuencia proteica se observó un 96-100% de identidad en la secuencia correspondiente al ORF1, un 97-98% en el ORF2 y un 97-99% en el ORF3 respecto a las cepas asiáticas y del norte de África (Tabla 5.9.).

#### **5.3.1.5.6. Fragmento Bcn7**

La secuencia del fragmento Bcn7 de 199 nt (nº acceso GenBank AF058682) contiene 148 nt del extremo 3' del ORF2 y 51 nt de la región no codificante. El grado de identidad observado en esta región es de un 95,9-96,9% respecto a cepas de India y Birmania, 72-94% respecto a las demás cepas asiáticas, y 79,9% respecto a Méjico en la secuencia de nucleótidos. Respecto a la secuencia de aminoácidos del extremo terminal de la proteína codificada por el ORF2 la identidad es del 97,9-100% respecto a las cepas asiáticas (91% en la cepa de Méjico).

**TABLA 5.8.**  
**Identidad entre la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de BCN respecto a otras cepas del VHE**

| Cepa       | Fragmento de BCN (%) |                    |       |       |       |       |       | Total |
|------------|----------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | Bcn1                 | Bcn2               | Bcn3  | Bcn4  | Bcn5  | Bcn6  | Bcn7  |       |
| Birmania1  | 95,52                | 94,98              | 96,70 | 96,01 | 97,03 | 96,97 | 95,98 | 96,25 |
| Birmania2  | 95,00                | 94,37              | 96,06 | 94,20 | 97,03 | 95,89 | 83,42 | 95,12 |
| China1     | 92,76                | 90,37              | 92,77 | 91,30 | 93,58 | 92,91 | 93,47 | 92,28 |
| China2     | 92,76                | 90,37              | 92,95 | 91,30 | 92,96 | 93,11 | 93,97 | 92,33 |
| China3     | 92,59                | 90,37              | 93,13 | 92,03 | 92,96 | 93,27 | 94,47 | 92,44 |
| China4     | 92,93                | 92,74              | 92,77 | 89,13 | 93,90 | 92,65 | 94,97 | 92,77 |
| China5     | 92,76                | 90,37              | 92,77 | 91,30 | 93,58 | 92,91 | 93,47 | 92,28 |
| China6     | 92,76                | 90,23              | 92,95 | 91,30 | 92,96 | 93,11 | 93,97 | 92,30 |
| Egipto     | —                    | —                  | —     | —     | —     | 90,13 | —     | —     |
| India1     | 94,31                | 96,54              | 97,62 | 91,30 | 97,97 | 95,99 | 96,98 | 96,28 |
| India2     | 96,21                | 95,79              | 96,61 | 96,38 | 94,84 | 96,97 | 72,86 | 95,54 |
| India3     | 93,62                | 89,82              | 92,49 | 92,75 | 92,96 | 92,65 | 95,48 | 92,17 |
| Marruecos1 | —                    | 79,44 <sup>a</sup> | —     | —     | —     | —     | —     | —     |
| Marruecos2 | —                    | —                  | —     | —     | —     | 89,08 | —     | —     |
| Méjico     | 77,93                | 66,21              | 75,00 | 79,35 | 75,90 | 80,16 | 79,90 | 75,25 |
| Nepal      | 98,28                | 97,49              | 97,89 | 97,46 | 97,81 | 98,10 | 85,93 | 97,49 |
| Pakistán   | 92,76                | 90,57              | 92,40 | 91,30 | 93,27 | 92,70 | 88,44 | 92,01 |

<sup>a</sup> La secuencia comparada incluye solamente la región hipervariable

**TABLA 5.9.**  
**Identidad entre la secuencia de aminoácidos de los fragmentos de BCN respecto a otras cepas del VHE**

| Cepa       | Fragmento de BCN (%) |                    |       |       |       |        |       |       |       | Total |
|------------|----------------------|--------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
|            | Bcn1                 | Bcn2               | Bcn3  | Bcn4  | Bcn5  | Bcn6   |       |       | Bcn7  |       |
|            |                      |                    |       |       |       | 3'Orf1 | Orf2  | Orf3  |       |       |
| Birmania1  | 97,93                | 96,95              | 98,07 | 100   | 99,06 | 96,67  | 98,18 | 97,56 | 100   | 98,00 |
| Birmania2  | 96,37                | 95,93              | 97,80 | 97,80 | 99,06 | 100    | 97,52 | 95,12 | 100   | 97,22 |
| China1     | 97,93                | 95,32              | 98,62 | 95,60 | 99,53 | 100    | 98,01 | 99,19 | 100   | 97,68 |
| China2     | 97,41                | 94,70              | 98,62 | 100   | 98,11 | 96,67  | 97,68 | 99,19 | 100   | 97,40 |
| China3     | 96,89                | 94,70              | 98,62 | 98,90 | 99,06 | 100    | 98,34 | 97,56 | 97,92 | 97,49 |
| China4     | 97,41                | 94,70              | 97,80 | 100   | 99,53 | 100    | 97,52 | 97,56 | 97,92 | 97,26 |
| China5     | 97,93                | 95,32              | 98,62 | 96,70 | 99,53 | 100    | 98,01 | 97,56 | 97,92 | 97,59 |
| China6     | 97,41                | 94,50              | 98,62 | 100   | 98,11 | 96,67  | 97,68 | 97,56 | 97,92 | 97,22 |
| Egipto     | —                    | —                  | —     | —     | —     | —      | 97,52 | 99,19 | —     | —     |
| India1     | 95,85                | 95,93              | 98,62 | 98,90 | 96,23 | 100    | 97,85 | 99,19 | 97,92 | 97,35 |
| India2     | 96,37                | 95,32              | 96,42 | 84,62 | 98,58 | 100    | 97,02 | 97,56 | 97,92 | 96,19 |
| India3     | 97,93                | 94,50              | 97,80 | 98,90 | 99,06 | 100    | 97,35 | 97,56 | 97,92 | 97,12 |
| Marruecos1 | —                    | 77,57 <sup>a</sup> | —     | —     | —     | —      | —     | —     | —     | —     |
| Marruecos2 | —                    | —                  | —     | —     | —     | —      | 98,34 | 99,19 | —     | —     |
| Méjico     | 92,23                | 69,94              | 87,88 | 100   | 88,21 | 96,67  | 92,38 | 99,19 | 91,67 | 86,99 |
| Nepal      | 98,45                | 97,96              | 98,62 | 92,31 | 98,11 | 73,33  | 97,85 | 97,56 | 97,92 | 97,49 |
| Pakistán   | 97,93                | 94,91              | 98,62 | 100   | 99,06 | 100    | 98,51 | 86,18 | 97,92 | 96,94 |

<sup>a</sup> La secuencia comparada incluye solamente la región hipervariable

### 5.3.1.5.7. Análisis de la secuencia de aminoácidos

Las diferencias observadas en la secuencia de nucleótidos son en su mayoría sustituciones en la tercera posición del codón, por lo que no altera la secuencia de aminoácidos. El grado de divergencia entre la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la cadena de nucleótidos respecto a las demás cepas caracterizadas de Asia y África es de menos de 4% (Tabla 5.9.). Se observaron sustituciones de aminoácidos en los péptidos codificados por los tres ORFs, características de la cepa BCN (Tabla 5.10.).

**TABLA 5.10.**  
Sustituciones en la secuencia de aminoácidos de BCN  
respecto a las cepas asiáticas de VHE

| Región | Fragmento | Posición <sup>a</sup> | Sustitución <sup>b</sup> |
|--------|-----------|-----------------------|--------------------------|
| ORF1   | Bcn1      | 19                    | Ala→ <u>Asp</u> *        |
|        |           | 179                   | Phe→ <u>Ser</u> *        |
|        | Bcn2      | 475                   | Lys→ <u>Arg</u>          |
|        |           | 700                   | Leu→ <u>Ile</u>          |
|        |           | 747                   | Asp→ <u>Ala</u> *        |
|        |           | 755                   | Pro→ <u>Ser</u> *        |
|        | Bcn3      | 905                   | Asn→ <u>Lys</u> *        |
|        |           | 906                   | His→ <u>Asp</u> *        |
|        | Bcn5      | 1601                  | Gly→ <u>Arg</u> *        |
|        | ORF2      | Bcn6.2                | 25                       |
| 49     |           |                       | Gln→ <u>Pro</u> *        |
| 105    |           |                       | Ala→ <u>Thr</u> *        |
| 258    |           |                       | Trp→ <u>Arg</u> *        |
| 268    |           |                       | Glu→ <u>Gln</u> *        |
| 289    |           |                       | Thr→ <u>Ser</u> *        |
| 308    |           |                       | Phe→ <u>Leu</u> *        |
| 368    |           |                       | Thr→ <u>Asn</u> *        |
| ORF3   | Bcn6.3    | 63                    | Ser→ <u>Arg</u> *        |

<sup>a</sup> Numeración de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del péptido deducido a partir de la secuencia de aminoácidos de la cepa de Birmania (Tam y col., 1991).

<sup>b</sup> Subrayado el aminoácido correspondiente a BCN.

\* Sustituciones no conservativas.

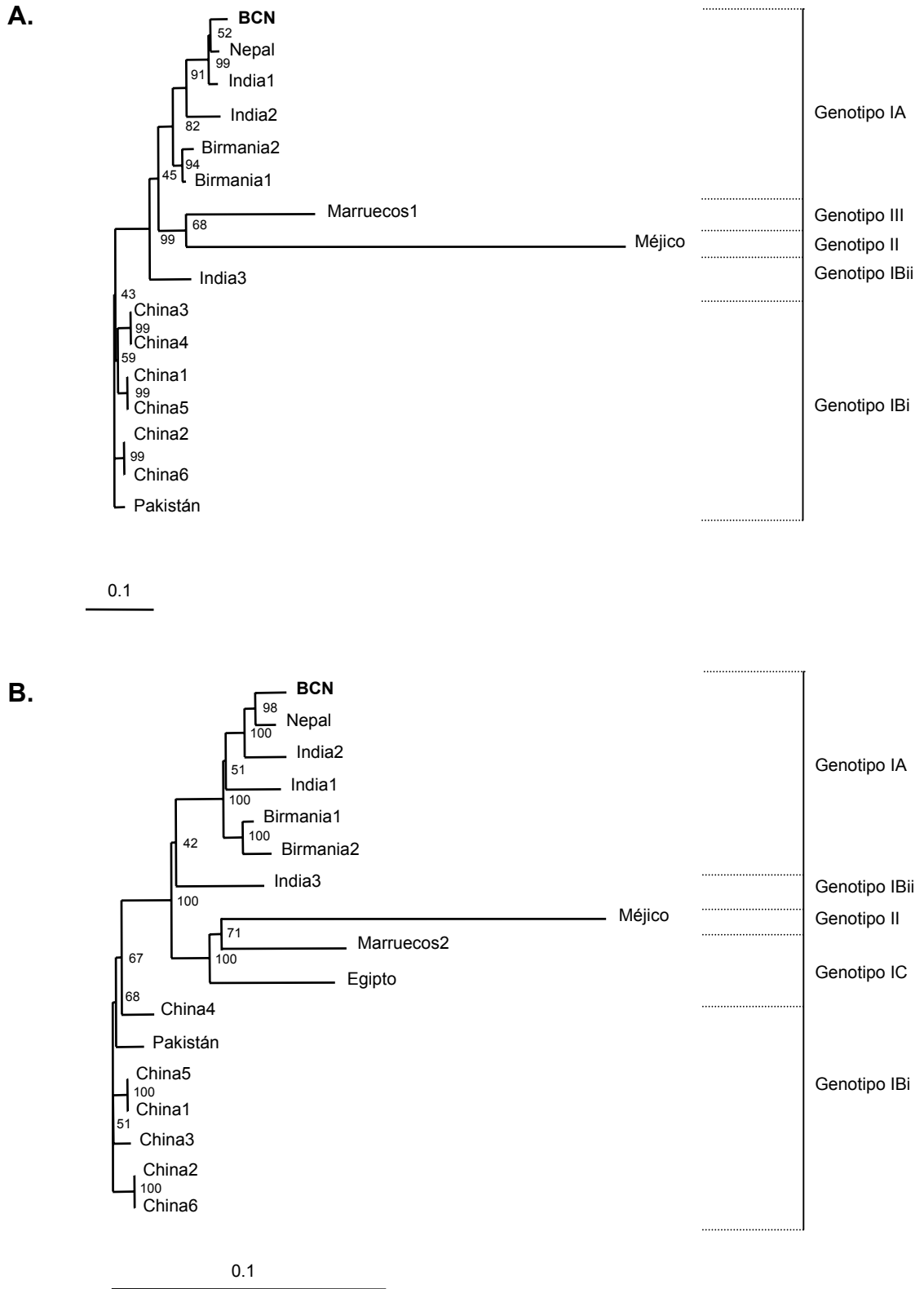
### **5.3.1.5.8. Análisis filogenético**

Los resultados globales obtenidos a partir de la comparación de las secuencias nos indican que la cepa BCN está genéticamente relacionada principalmente con las cepas aisladas en Asia, presentando un mayor grado de identidad con una cepa de Nepal (97,49%), seguido de cepas de India y Birmania, con una similaridad del  $95,91\pm 0,52\%$  y  $95,68\pm 0,79\%$  respectivamente.

Según el criterio aplicado en el análisis filogenético de las secuencias de poliovirus (Rico-Hesse y col., 1987), se han definido como cepas del mismo genotipo las que difieren en menos del 15%, y del mismo subgenotipo si se diferencian en menos del 7,5%. El análisis filogenético de cada uno de los fragmentos obtenidos demostró que la cepa BCN del VHE pertenece al genotipo IA junto con las cepas aisladas en Nepal, India y Birmania (Figura 5.9.).

Para comprobar el nivel de confianza del agrupamiento se utilizó el programa BOOTSTRAP del paquete PHYLIP (Felsenstein, 1985 y 1993) para generar 1000 árboles replicas a partir del alineamiento de las secuencias de las diferentes regiones. Se considera que existe una relación filogenética estadísticamente significativa si dicho valor es superior al 70% (Felsenstein, 1985). En las regiones BCN1–BCN6 este valor era en todos los casos superior al 80%, lo que demuestra la bondad del agrupamiento filogenético con las cepas de Nepal e India (Figura 5.9.)

En cuanto a la secuencia de aminoácidos se ha observado un  $97,42\pm 0,51\%$  de identidad global respecto a las cepas de Asia y del norte de África, lo que confirma nuevamente la estrecha relación entre la cepa BCN respecto a las demás cepas aisladas en países endémicos.



**Figura 5.9.**

Análisis filogenético de la cepa BCN respecto a otras cepas de VHE. A. Árbol filogenético obtenido a partir de la región hipervariable (321 nt). B. Árbol filogenético obtenido a partir de un fragmento de 1814 nt del ORF2. La longitud de las ramas es proporcional a la distancia evolutiva. La escala representa el número de sustituciones por base. Los valores indicados en los nódulos corresponden al porcentaje de los árboles en los que aparece dicho agrupamiento obtenido a partir de 1000 replicas (>70% indica un agrupamiento estadísticamente significativo).

### **5.3.2. MUESTRAS CLÍNICAS HUMANAS**

Se estudió la presencia de ARN de VHE en muestras de suero procedentes de 37 pacientes con hepatitis aguda: 26 hombres y 11 mujeres, con edades comprendidas entre 18 y 65 años (media de 31 años). Tres de ellos declararon haber viajado fuera a áreas endémicas de hepatitis E durante los meses previos a la aparición de los síntomas de la enfermedad. Doce eran consumidores de drogas por vía intravenosa. Los 22 restantes no presentaban factores de riesgo epidemiológico para la existencia de hepatitis transmisible por vía parenteral o enteral. Ninguno de los enfermos había trabajado en granjas o mataderos porcinos, ni había tenido ningún contacto con cerdos.

Las muestras se analizaron por RT-PCR anidada utilizando los iniciadores degenerados de la región del ORF2 (Tabla 5.2.), que reconocen las cepas de origen humano y las de origen porcino del VHE hasta ahora descritas. Se detectó la presencia de viremia en 1 de los 14 pacientes (paciente #7) con hepatitis A (7%) y en 2 de los 8 pacientes (paciente #e6 y #6) que presentaban anticuerpos IgG anti-VHE (25%). Ninguno de los pacientes con hepatitis aguda del tipo no-A/no-E dio resultado positivo. Las características clínicas de cada uno de los pacientes positivos para VHE se resumen en la Tabla 5.11.

En el caso de los pacientes seropositivos para VHE se disponía de muestras de suero de la fase inicial de la enfermedad y de la fase de convalecencia de 3 de ellos. Las dos muestras que presentaron viremia correspondían a la fase inicial de la infección.

Teniendo en cuenta los factores de riesgo se comprobó que uno de los pacientes con ARN de VHE había viajado a América Central 3 meses antes de manifestarse los primeros síntomas de hepatitis y, además, resultó también presentar ARN de VHA en suero. En cuanto a los demás pacientes que mostraron resultado positivo, uno de ellos era drogadicto y el último no pertenecía a ningún grupo de riesgo.

**TABLA 5.11.**  
**Características clínicas de los pacientes en los que se detectó ARN de VHE en suero**

| Paciente | Presencia de anticuerpos IgG |          | Presencia de ARN en suero |         | Factor de riesgo       |
|----------|------------------------------|----------|---------------------------|---------|------------------------|
|          | Anti-VHE                     | Anti-VHA | VHE-ARN                   | VHA-ARN |                        |
| #e6      | +                            | -        | +                         | -       | drogadicto             |
| #6       | +                            | -        | +                         | -       | ninguno                |
| #7       | -                            | +        | +                         | +       | viaje a Centro América |

### 5.3.3. INFECCIÓN NATURAL DE LA POBLACIÓN DE CERDOS POR CEPAS RELACIONADAS CON EL VHE

#### 5.3.3.1. Prevalencia de anticuerpos en suero de cerdo

La presencia de anticuerpos IgG anti-VHE en el suero de cerdos procedentes de diversas granjas de Cataluña, se comprobó mediante ELISA. El análisis de los diferentes sueros dio resultado positivo en el 25% de las muestras analizadas entre las diluciones 1:100 y 1:200: 2/10 cochinitillos de 3 semanas a 2 meses, 8/24 cerdos de engorde de 5 a 6 meses y 5/26 hembras reproductoras de 6 meses a 4 años de edad (Tabla 5.12.). Los valores medios de inmunorreactividad en las muestras consideradas positivas fueron de 1,016 (DS 0,405) *versus* 0,110 (DS 0,097) en las muestras negativas. Estos datos sugieren la existencia de una infección que afecta de forma natural a los cerdos, y provocada por un agente relacionado con el VHE.

**TABLA 5.12.**  
**Prevalencia de anticuerpos IgG anti-VHE en cerdos de granjas comerciales de Cataluña**

| Edad                | Nº cerdos analizados | Nº cerdos con anti-VHE |
|---------------------|----------------------|------------------------|
| 6 meses a 4 años    | 26                   | 5 (19%)                |
| 5-6 meses           | 24                   | 8 (33%)                |
| 3 semanas a 2 meses | 10                   | 2 (20%)                |
| Total               | 60                   | 15 (25%)               |

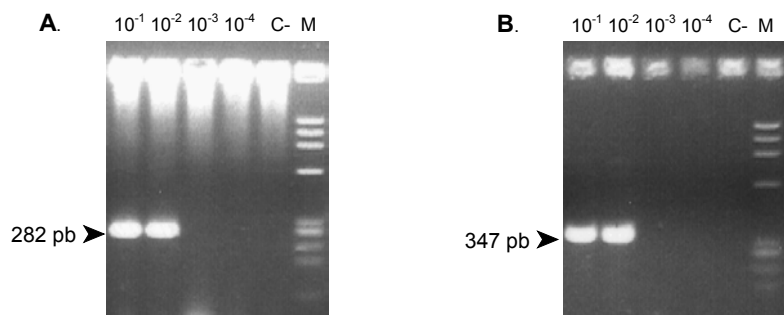


### 5.3.3.2. Detección de cepas del VHE de origen porcino

Para intentar aislar alguna cepa porcina del VHE se analizaron por PCR anidada diversos tipos de muestras: 6 muestras de heces, 48 muestras de sueros porcinos, 12 muestras de agua residual de mataderos de cerdos.

#### 5.3.3.2.1. Sensibilidad en la detección de ARN de VHE en muestras de suero y heces de cerdo

La concentración de equivalentes genómico (EG) en una suspensión fecal de la cepa BCN del se estimó por la técnica de la dilución límite que se detecta por RT-PCR anidada utilizando los iniciadores del extremo 5' del ORF1 y los iniciadores degenerados del ORF2. Se realizaron diluciones decimales seriadas (desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ ) a partir del ARN extraído y se analizaron por RT-PCR anidada. Un equivalente genómico se define en este caso como el número de moléculas de ARN de VHE presentes considerando la muestra más diluida que puede detectarse por PCR anidada (Meng y col., 1998a). Se pudieron detectar bandas visibles por electroforesis en gel de agarosa hasta la dilución  $10^{-2}$  (Figura 5.10.), que correspondería a 1 EG. Según este experimento el título de la suspensión estoc de BCN fue estimado en  $10^2$  EG/ml.



**Figura 5.10.**

Sensibilidad en la detección de VHE BCN por PCR anidada utilizando los iniciadores del extremo 5' del ORF1 (A), o los iniciadores degenerados del ORF2 (B). Se indican las diluciones del ARN. C-, control negativo. M, marcador de peso molecular (ADN de  $\Phi$ X174 digerido con *Hae* III).

Posteriormente se pasó a evaluar la sensibilidad del método de detección en suero porcino y heces de cerdo que se habían suplementado con una cantidad conocida de equivalentes genómicos de la cepa BCN de VHE. Se añadió 10 µl de suspensión de BCN a 90 µl de suero porcino (10 EG/ml) y a 1 g de heces de cerdo (1 EG/g). Tras la recuperación de las partículas víricas a partir de las heces, se analizó el límite de detección del ARN paralelamente en los dos tipos de muestra. En ambos casos se pudo detectar amplificación hasta la dilución  $10^{-1}$  tras realizar PCR anidada, que contenía el ARN equivalente a 1 EG en 5 µl de suero o en 5 mg de heces. Según este experimento no se observa la presencia de sustancias inhibidoras de la reacción de amplificación en las muestras fecales ni en el suero analizado.

#### ***5.3.3.2.2. Análisis de muestras de heces de cerdo***

Se recuperaron las partículas víricas a partir de 6 muestras de heces de cerdo de diferentes granjas. Alícuotas de la suspensión de ARN correspondientes a 5 y 50 mg de heces se sometieron a análisis por PCR anidada. Todas las muestras analizadas fueron negativas.

#### ***5.3.3.2.3. Análisis de muestras de suero porcino***

Se realizó extracción de ácidos nucleicos a partir de 48 muestras de suero de cerdos de diferentes edades y diversas granjas. Se analizaron por PCR anidada alícuotas de la suspensión de ARN correspondientes a 0,5, 1, 5, y 10 µl de suero, dando todos ellos un resultado negativo.

#### ***5.3.3.2.4. Análisis de aguas residuales de mataderos porcinos***

Se disponía de 12 muestras de aguas residuales de mataderos porcinos, que habían sido procesadas por el método descrito en el apartado 2.2.3.1.1. Se realizó extracción de ácidos nucleicos a partir del concentrado vírico, y se analizaron por PCR anidada alícuotas correspondientes a 2 y 0,2 ml de agua. En una de las muestras, #E11, se observó una banda del tamaño esperado, de intensidad débil cuando se analizó el equivalente a 2 ml de muestra.

### **5.3.4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE VHE DE ORIGEN CLÍNICO Y ANIMAL**

#### **5.3.4.1. Fragmento del ORF2**

Para caracterizar las cepas detectadas se procedió a analizar la secuencia de nucleótidos de los amplicones productos de PCR anidada, obtenidos a partir del suero de los pacientes #e6, #6 y #7, y de la muestra de matadero porcino #E11.

Se analizaron 304 nt del fragmento de 347 pb obtenido por PCR anidada con los iniciadores 5972d/6319Rd a partir de los sueros humanos. La comparación con la secuencia de nucleótidos de la región correspondiente de la cepa BCN en un primer momento, descartaba la posibilidad de una contaminación durante el procesamiento de las muestras, y reveló la presencia de dos nuevas cepas del VHE, que se llamaron VH1 (presente en el paciente #e6) y VH2 (presentes en #6 y #7). Estas presentaban un 93,4% de identidad entre ellas, mientras que se observó un 75,9% y un 74,3% de identidad cuando se compararon VH1/BCN y VH2/BCN respectivamente (Tabla 5.13.). Las diferencias observadas entre VH1 y VH2 corresponderían a sustituciones en el tercer nucleótido del codón correspondiente, puesto que no representan ningún cambio al nivel de la secuencia de aminoácidos (100% identidad).

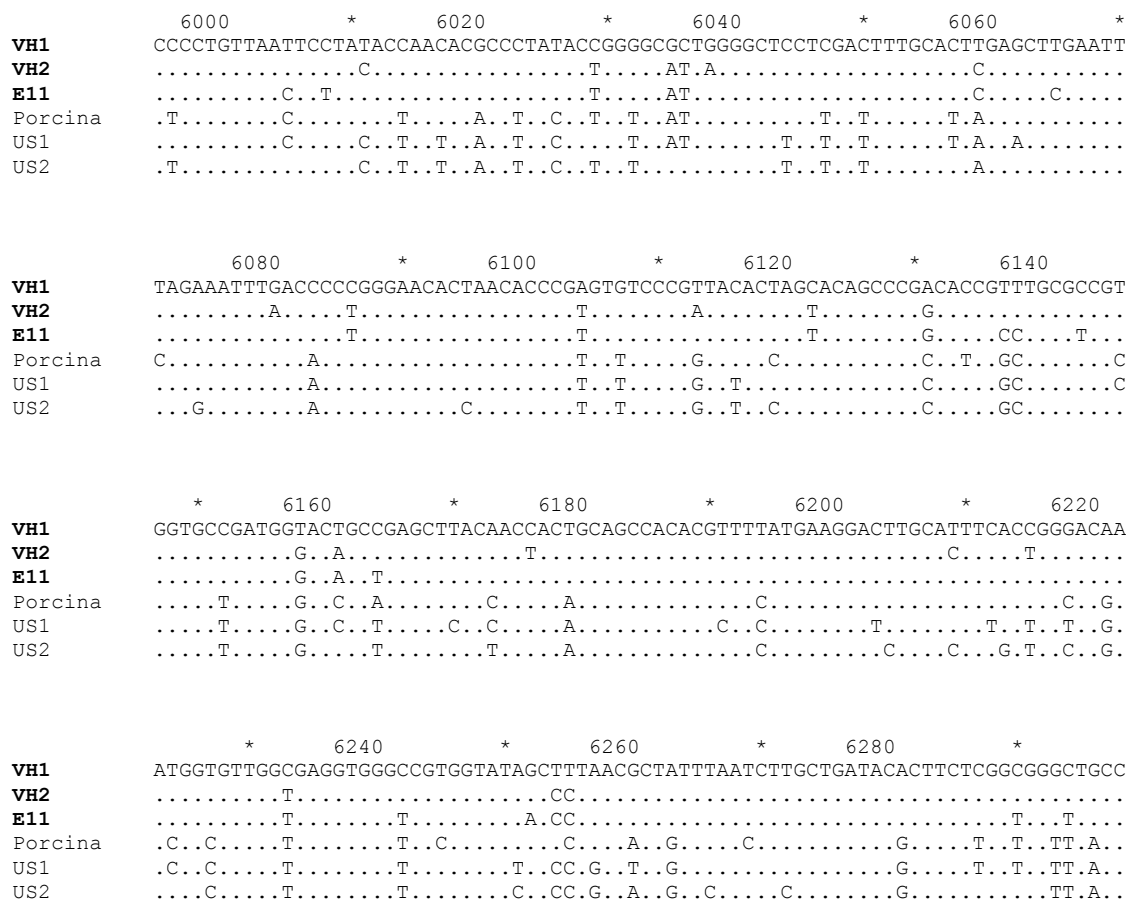
La secuencia del amplicon detectado a partir de la muestra agua residual de matadero porcino #E11, presentaba un 92,1% y 93,4% de identidad en relación con VH1 y VH2 respectivamente, y un 99% de identidad en cuanto a la secuencia de aminoácidos (Tabla 5.13.). Esta cepa fue llamada E11.

La secuencia de nucleótidos de la región estudiada de las cepas VH1, VH2 y E11 se depositó en el banco de datos GenBank con los números de acceso AF195061, AF195062 y AF195063 respectivamente.

**TABLA 5.13.**  
**Comparación entre la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos de VH1, VH2 y E11 respecto a otras cepas de VHE en la región de 304 nt (100 aa) del fragmento del ORF2**

| Cepa      | Nucleótidos idénticos (%) |      |      | Aminoácidos idénticos (%) |     |
|-----------|---------------------------|------|------|---------------------------|-----|
|           | VH1                       | VH2  | E11  | VH1, VH2                  | E11 |
| VH1       | ---                       | 93,4 | 92,1 | ---                       | 99  |
| VH2       | 93,4                      | ---  | 94,0 | ---                       | 99  |
| E11       | 92,1                      | 94,0 | ---  | 99                        | --- |
| Porcina   | 83,8                      | 83,2 | 85,5 | 100                       | 99  |
| US2       | 83,2                      | 83,5 | 82,8 | 99                        | 98  |
| US1       | 81,9                      | 82,5 | 83,8 | 100                       | 99  |
| Nepal     | 77,3                      | 75,6 | 75,0 | 96                        | 95  |
| Birmania2 | 77,3                      | 75,6 | 75,0 | 96                        | 95  |
| India1    | 76,9                      | 76,3 | 75,0 | 96                        | 95  |
| India2    | 76,6                      | 75,0 | 74,3 | 96                        | 95  |
| China3    | 76,3                      | 75,0 | 75,0 | 96                        | 95  |
| Birmania1 | 75,9                      | 74,3 | 73,7 | 95                        | 94  |
| Barcelona | 75,9                      | 74,3 | 73,6 | 93                        | 92  |
| Pakistán  | 75,6                      | 74,3 | 74,3 | 96                        | 95  |
| China5    | 75,6                      | 74,3 | 74,3 | 96                        | 95  |
| China1    | 75,6                      | 74,3 | 74,3 | 96                        | 95  |
| Marruecos | 75,6                      | 75,0 | 74,3 | 95                        | 94  |
| China4    | 75,0                      | 73,7 | 73,7 | 94                        | 93  |
| Méjico    | 75,0                      | 73,7 | 72,2 | 92                        | 91  |
| India3    | 74,6                      | 74,0 | 72,0 | 95                        | 94  |
| China6    | 74,6                      | 73,4 | 74,0 | 95                        | 94  |
| China2    | 74,6                      | 73,4 | 73,3 | 95                        | 94  |
| Egipto    | 74,3                      | 73,4 | 71,4 | 95                        | 94  |

Para poder determinar el grado de similitud entre las nuevas cepas y otros aislados de diferentes zonas geográficas, las secuencias de nucleótidos se alinearon con las regiones homólogas del ORF2 de 20 cepas descritas procedentes de áreas endémicas y no endémicas (Tabla 5.7.). Este análisis indicó que VH1, VH2 y E11 estaban relacionadas con las cepas de origen humano US1 y US2, y con la única cepa aislada a partir de heces de cerdo, presentando VH1 un 81,9-83,8% de identidad, VH2 un 82,5-83,5% y E11 un 83,8%-85,5% de identidad (Tabla 5.13.). En cuanto a la secuencia de aminoácidos la identidad era de un 98-99%. La alineación de la secuencia de nucleótidos de la región estudiada del ORF2 de las cepas aisladas en zonas no endémicas se muestra en la Figura 5.11.



**Figura 5.11.** Alineación de 304 nt del fragmento de ADN de la región amplificada del ORF2 de las cepas VH1, VH2 y E11, y las aisladas de otras zonas no endémicas. Sólo se indican las diferencias. La secuencia del iniciador se ha suprimido. Las posiciones indicadas se refieren a la cepa de Birmania (Tam y col. 1991).

La comparación con las cepas aisladas de países donde la hepatitis E es endémica (Asia, África y Méjico), demuestra un porcentaje de identidad inferior: 74,4%-77,3% en VH1, 73,4-76,3% en VH2 y 71,4-75,% en E11, y un 91-95% en cuanto a la secuencia de aminoácidos codificada (Tabla 5.13.). La alineación de las secuencias de aminoácidos codificada por la región estudiada se muestra en la Figura 5.12. En esta representación se puede apreciar la sustitución del residuo de Ser-325, presente en las cepas de VHE aisladas de zonas endémicas, por un residuo de Thr en las cepas de España y Estados Unidos (humanas y porcina). Esta sustitución está localizada dentro de una región inmunoreactiva (Khudyakov y col., 1993 y 1994).

|            | * | 300   | *     | 320    | *      | 340    |        |         |         |        |     |    |
|------------|---|-------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|-----|----|
| India3     |   | PVNSY | TNTPY | TGALGL | LDFALE | FEFRNL | TPGNTN | TRVSRYS | STARHRL | RRGADG | TAE | LT |
| China4     |   | .     | .     | V.     | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | T. |
| Birmania   |   | L.    | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| China2     |   | L.    | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| China6     |   | L.    | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| China3     |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| Nepal      |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| Pakistán   |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| Birmania2  |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| India1     |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| China5     |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| India2     |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| China1     |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| Egipto     |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| Marruecos  |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | .   | .  |
| Barcelona  |   | .     | S.    | .      | .      | L.     | L.     | .       | .       | .      | .   | .  |
| Porcina    |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | T.  | .  |
| <b>E11</b> |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | T.  | .  |
| US1        |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | T.  | .  |
| <b>VH1</b> |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | T.  | .  |
| <b>VH2</b> |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | T.  | .  |
| US2        |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | .       | .       | .      | T.  | .  |
| Méjico     |   | .     | .     | .      | .      | L.     | .      | TC.     | .       | .      | SA. | .  |

|            | * | 360    | *     | 380    |
|------------|---|--------|-------|--------|
| India3     |   | TAATRF | MKDLY | FTSTNG |
| China4     |   | .      | .     | .      |
| Birmania   |   | .      | .     | .      |
| China2     |   | .      | .     | .      |
| China6     |   | .      | .     | .      |
| China3     |   | .      | .     | .      |
| Nepal      |   | .      | .     | .      |
| Pakistán   |   | .      | .     | .      |
| Birmania2  |   | .      | .     | .      |
| India1     |   | .      | .     | .      |
| China5     |   | .      | .     | .      |
| India2     |   | .      | .     | .      |
| China1     |   | .      | .     | .      |
| Egipto     |   | .      | S.    | .      |
| Marruecos  |   | .      | S.    | .      |
| Barcelona  |   | .      | .     | N.     |
| Porcina    |   | .      | H.    | G.     |
| <b>E11</b> |   | .      | H.    | G.     |
| US1        |   | .      | H.    | G.     |
| <b>VH1</b> |   | .      | H.    | G.     |
| <b>VH2</b> |   | .      | H.    | G.     |
| US2        |   | .      | H.    | AG.    |
| Méjico     |   | .      | H.    | GL.    |

**Figura 5.12.** Alineación de la secuencia de aminoácidos codificada por el fragmento estudiado del ORF2. Se indican sólo las diferencias. Se indica la sustitución característica de las cepas no endémicas en la región inmunoreactiva que aparece subrayada (Khudyakov y col., 1993, 1994).

### 5.3.4.2. Fragmento del ORF1

Para corroborar estos resultados se estudiaron 371 nt de la secuencia del amplicon de 417 pb obtenido por PCR anidada utilizando iniciadores degenerados del extremo 5' del

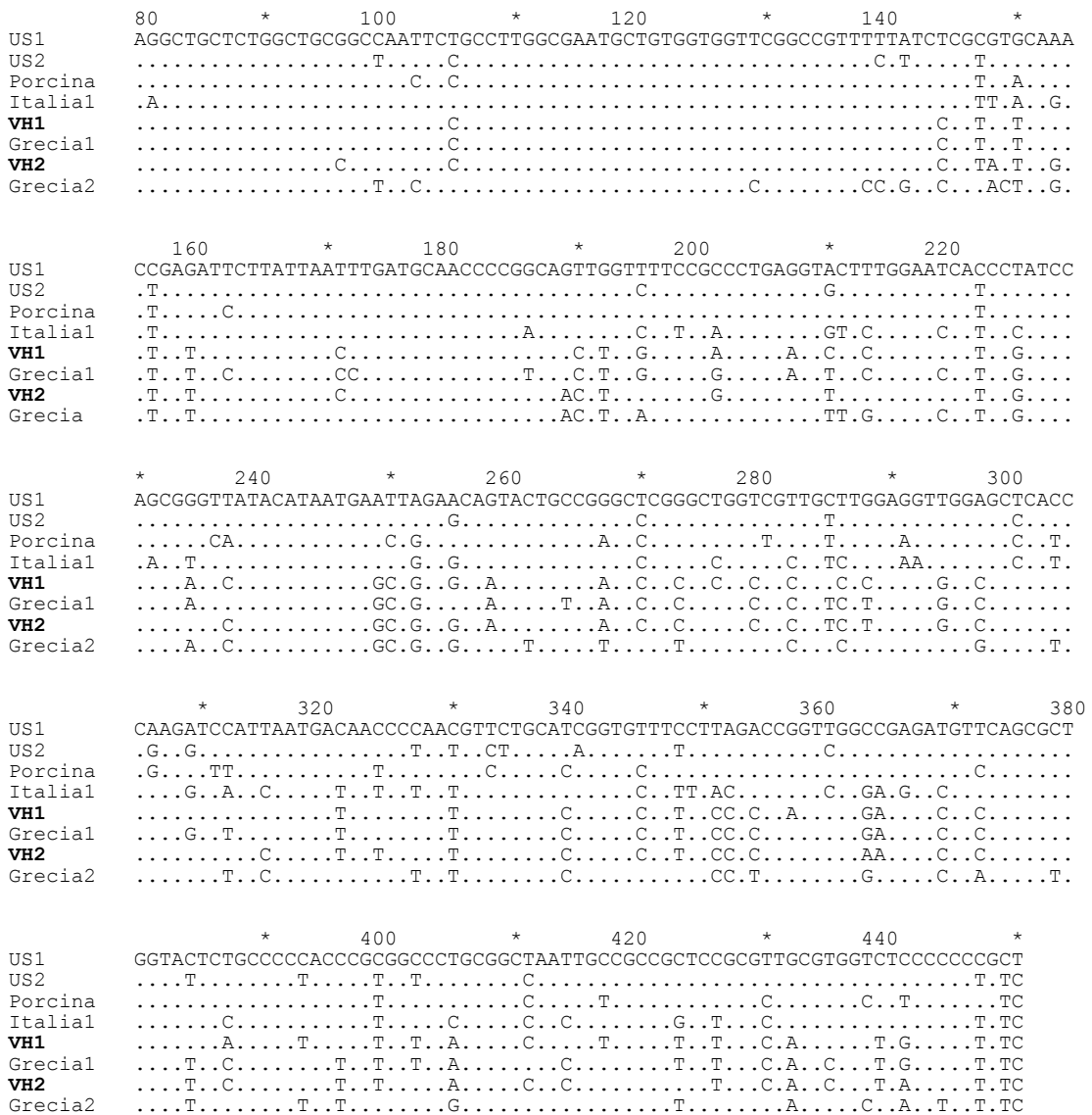
ORF1 (Tabla 5.2.). Utilizando estos iniciadores únicamente se pudo amplificar el fragmento correspondiente de las cepas humanas VH1 y VH2. En esta región VH1 y VH2 mostraron un 92,7% de identidad, que representaba un 99% de la secuencia de aminoácidos conservada (Tabla 5.14.). Estas secuencias se compararon con la región correspondiente de 21 cepas previamente descritas en países endémicos y no endémicos.

En relación con las cepas aisladas de otros países europeos (Italia y Grecia) y en Estados Unidos, se observó un porcentaje de identidad superior al 93% cuando se comparaba VH1 y VH2 con la cepa Grecia1, y un 83,3-84,9% (VH1) o 83,0-86,0% (VH2) en relación con las cepas Grecia2, Italia1, US1, US2 y la cepa porcina. Esto representa entre un 95-96% a un 99% de coincidencia en la secuencia de aminoácidos. La alineación de la secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento estudiado de las cepas procedentes de países no endémicos se muestra en la Figura 5.13.

**TABLA 5.14.**  
**Comparación entre la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos de VH1 y VH2 respecto a otras cepas de VHE en la región de 371 nt (123 aa) del fragmento del ORF1**

| Cepa      | Nucleótidos idénticos (%) |      | Aminoácidos idénticos (%) |     |
|-----------|---------------------------|------|---------------------------|-----|
|           | VH1                       | VH2  | VH1                       | VH2 |
| VH1       | ---                       | 92,7 | ---                       | 99  |
| VH2       | 92,7                      | ---  | 99                        | --- |
| Grecia1   | 93,8                      | 93,5 | 100                       | 99  |
| Grecia2   | 84,9                      | 86,0 | 99                        | 99  |
| Italia1   | 84,4                      | 84,9 | 96                        | 96  |
| Porcina   | 84,1                      | 84,4 | 96                        | 95  |
| US2       | 83,8                      | 83,3 | 99                        | 98  |
| US1       | 83,3                      | 83,0 | 98                        | 98  |
| Nepal     | 77,4                      | 78,2 | 90                        | 90  |
| Méjico    | 77,4                      | 77,1 | 92                        | 92  |
| Birmania1 | 77,1                      | 78,4 | 92                        | 90  |
| China5    | 76,8                      | 76,5 | 89                        | 90  |
| China1    | 76,8                      | 76,5 | 89                        | 90  |
| India2    | 76,8                      | 77,6 | 89                        | 88  |
| India1    | 76,8                      | 78,2 | 88                        | 88  |
| Barcelona | 76,5                      | 77,4 | 89                        | 89  |
| China2    | 76,5                      | 75,7 | 89                        | 89  |
| China6    | 76,5                      | 75,7 | 89                        | 89  |
| Pakistán  | 76,5                      | 75,7 | 89                        | 90  |
| Birmania2 | 76,5                      | 77,9 | 90                        | 90  |
| China3    | 76,3                      | 76,0 | 89                        | 89  |
| China4    | 75,7                      | 75,5 | 89                        | 88  |
| India3    | 75,2                      | 76,5 | 89                        | 89  |

La comparación con las cepas aisladas en Asia y Méjico reveló un 75,2-77,4% y un 75,5-78,2% de identidad en VH1 y VH2 respectivamente en la región estudiada del ORF1, que es ligeramente superior que en el fragmento del ORF2 (Tabla 5.13.). El fragmento peptídico codificado por esta región presenta un 88-90% de identidad respecto al de las cepas de áreas endémicas. Entre estas cepas se incluye también la cepa BCN aislada en la misma región que VH1 y VH2, pero con un grado de identidad de 76,5-77,4% en la secuencia de nucleótidos, y un 89% en la secuencia de aminoácidos (Tabla 5.14.).



**Figura 5.13.** Alineación de 371 nt del fragmento de ADN de la región amplificada del ORF1 de las cepas VH1 y VH2, y las aisladas de otras zonas no endémicas. Sólo se indican las diferencias. La secuencia del iniciador se ha suprimido. Las posiciones indicadas se refieren a la cepa de Birmania (Tam y col. 1991).



La alineación de las secuencias de aminoácidos codificadas por la región estudiada del extremo 5' del ORF1 se muestra en la Figura 5.14. En esta representación se puede apreciar la sustitución de varios residuos en las cepas de España y Estados Unidos (humanas y porcina) respecto a las cepas de VHE aisladas de zonas endémicas: His-39 por Arg, Ile-42 por Thr, Ser-82 por Ala, Thr-119 por Ser.

|            |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 20    | *     | 40    | *     | 60    | *     |
| India3     | AA    | LA    | AN    | SA    | LAN   | AVV   |
| India1     | ..... | V     | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Barcelona  | D     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China1     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China2     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China6     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China5     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Pakistán   | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China4     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China3     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| India2     | ....  | T     | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Nepal      | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Birmania1  | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Birmania2  | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Porcina    | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| US2        | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| <b>VH2</b> | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Grecia2    | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| <b>VH1</b> | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Grecia1    | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| US1        | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Italia1    | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |

|            |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|            | 80    | *     | 100   | *     | 120   | *     | 140   |
| India3     | AR    | SG    | RC    | LE    | I     | GA    | H     |
| India1     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Barcelona  | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China1     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China2     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China6     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China5     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Pakistán   | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China4     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| China3     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| India2     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Nepal      | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Birmania1  | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Birmania2  | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Méjico     | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Porcina    | ..    | A     | ..    | C     | ..    | V     | ..    |
| US2        | ..    | A     | ..    | V     | ..    | ..... | ..... |
| <b>VH2</b> | ..    | A     | ..    | V     | ..    | ..... | ..... |
| Grecia2    | ..    | A     | ..    | V     | ..    | ..... | ..... |
| <b>VH1</b> | ..    | A     | ..    | V     | ..    | ..... | ..... |
| Grecia1    | ..    | A     | ..    | V     | ..    | ..... | ..... |
| US1        | ..    | A     | ..    | V     | ..    | ..... | ..... |
| Italia1    | ..    | A     | ..    | V     | ..    | ..... | ..... |

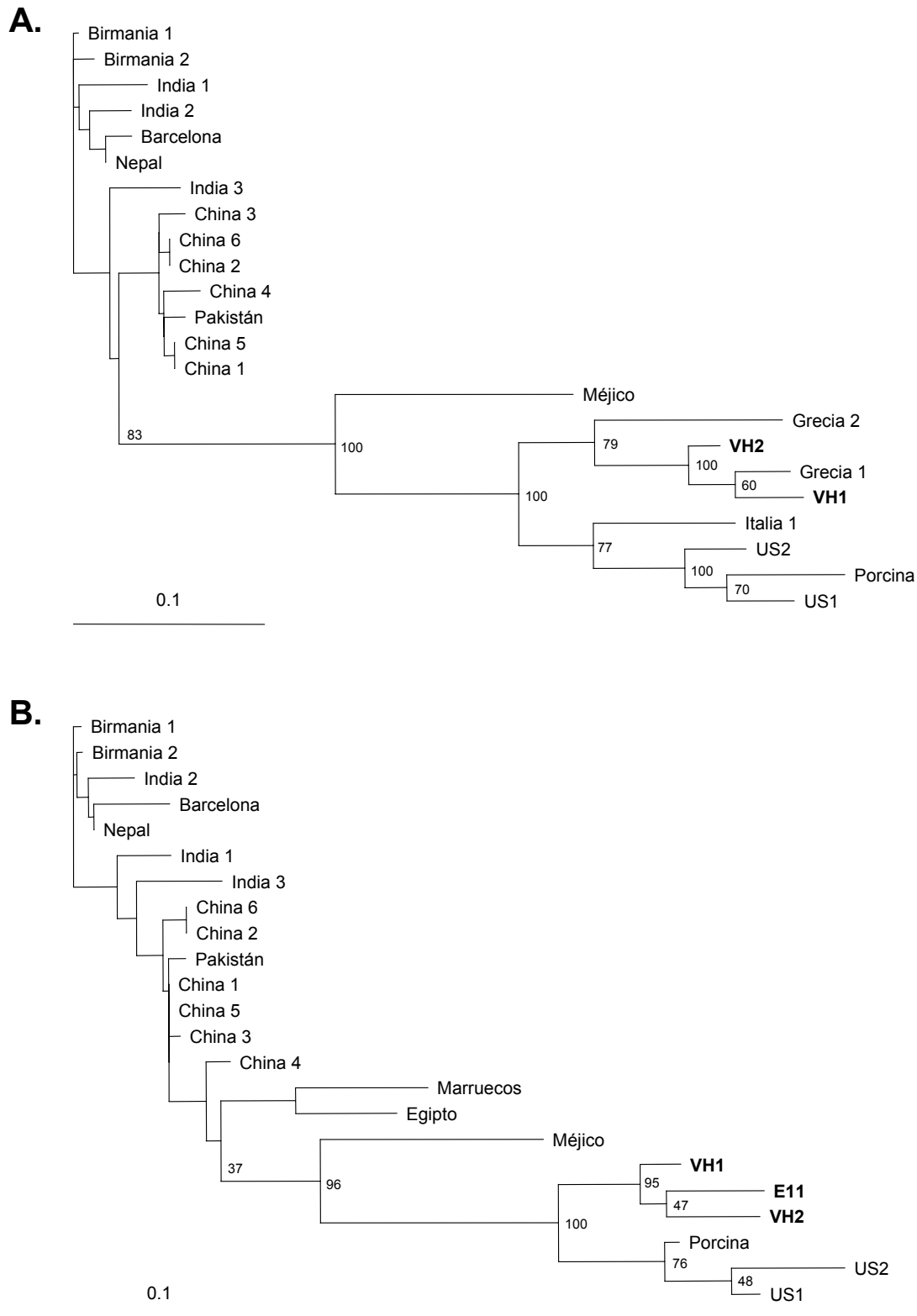
**Figura 5.14.** Alineación de la secuencia de aminoácidos codificada por el fragmento estudiado del ORF1. Se indican sólo las diferencias. Aparecen sombreados los aminoácidos representativos de las cepas de países no endémicos.

La secuencia de nucleótidos de la región estudiada de las cepas VH1 y VH2 se depositó en el banco de datos GenBank con los números de acceso AF195064 y AF195065 respectivamente.

### **5.3.4.3. Análisis filogenético**

La representación del árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias de nucleótidos de las regiones estudiadas del ORF1 y del ORF2 muestra la relación entre las diversas cepas aisladas en varios países europeos (España, Italia y Grecia), que quedan agrupadas con las cepas humanas aisladas en Estados Unidos y con la cepa porcina, y más remotamente las cepas de países endémicos de Asia y Africa (Figura 5.15.).

Para comprobar el nivel de confianza del agrupamiento se utilizó el programa BOOTSTRAP del paquete PHYLIP (Felsenstein, 1985 y 1993) para generar 100 árboles replicas a partir del alineamiento de las secuencias de las dos regiones. Los valores obtenidos indicaron un agrupamiento estadísticamente significativo (*bootstrap* superior al 70%) respecto a las cepas aisladas en Europa y Norte América. Según la distribución en genotipos propuesta por Schlauder y col. en 1999, en base a la región estudiada del ORF1 las cepas VH1 y VH2 quedarían agrupadas en el genotipo VI junto con la cepa Grecia1. Aunque no se tiene información sobre la secuencia de la región del ORF1, la cepa E11 pertenecería al mismo genotipo, por su proximidad en la región del ORF2 con VH2 y VH1 (<15% divergencia) (Rico-Hesse y col., 1987).



**Figura 5.15.**

Análisis filogenético mostrando la relación entre las cepas VH1, VH2 y E11 respecto al resto de las cepas de VHE depositadas en el GenBank, en la región estudiada del ORF1 (A) y ORF2 (B). La longitud de las ramas es proporcional a la distancia evolutiva. La escala representa el número de sustituciones por base. Los valores indicados en los nodulos corresponden al porcentaje de los árboles en los que aparece dicho agrupamiento, obtenido a partir de 100 replicas (>70% indica un agrupamiento estadísticamente significativo).

## **5.4. DISCUSIÓN**

En el presente capítulo se han descrito cepas del VHE que se transmiten en la población de un país previamente considerado no endémico, y se han aportado nuevos datos que refuerzan la hipótesis de que los cerdos actúan como reservorio animal de la infección por el VHE.

El método aplicado para la recuperación de partículas víricas a partir de muestras ambientales y la extracción de ácidos nucleicos ha demostrado una elevada sensibilidad equiparable a la descrita previamente en la detección de otros virus (Puig y col., 1994). Los resultados de las pruebas de estabilidad de la cepa Sar-55 en agua residual a lo largo del tiempo nos indican que aunque parece menos estable que Poliovirus-1, puede detectarse partículas víricas hasta 9 días después de ser añadidas en agua residual sin que se observe reducción en el título vírico respecto al momento inicial, y permanece detectable después de 1 mes a 20°C en este medio. Los resultados obtenidos indican, además, que el método de recuperación basado en la ultracentrifugación y la elución con glicina a pH básico no altera la integridad de la cápside.

La metodología desarrollada para el estudio de la contaminación vírica del medio acuático nos ha permitido documentar la presencia de cepas circulantes del VHE. La amplificación enzimática de secuencias génicas es el único método que permite la detección de bajas concentraciones de virus con la máxima especificidad y sensibilidad. Siguiendo esta estrategia, la mayor parte de las cepas de VHE se han identificado a partir de muestras clínicas en regiones endémicas, y hay pocos datos sobre aislados ambientales en regiones endémicas (Jothikumar y col., 1993; Corwin y col., 1999). En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización de una nueva cepa llamada BCN, a partir de agua residual procedente del núcleo urbano de Barcelona. Las diferencias observadas en la secuencia de nucleótidos respecto a la cepa Sar-55, utilizada como control en los experimentos de detección, y la posibilidad de infectar y multiplicarse en un sistema *in vivo*, descartan totalmente la posibilidad de un falso positivo. Este es el primer aislamiento ambiental de una cepa de VHE en un país no endémico (Pina y col., 1998b).

La enfermedad producida por la cepa BCN del VHE en primates infectados presentó básicamente el patrón típico descrito en animales de experimentación (Tsarev y col., 1993a). El primer síntoma de la infección fue la excreción de partículas víricas en las heces una semana después de la inoculación, que perduró hasta la semana quinta. La seroconversión ocurrió al mismo tiempo que la desaparición del virus de las heces. No se detectó viremia, y sólo apareció un ligero aumento en la actividad de la alanina aminotransferasa en uno de los monos que no sobrepasaba los niveles considerados normales. El hecho de no desarrollar hepatitis puede ser debido probablemente a la baja dosis infecciosa presente en el agua residual, pero se ha demostrado claramente la presencia de una cepa de VHE viable.

El estudio de la secuencia de nucleótidos de las diversas regiones a lo largo del genoma de la cepa BCN, demostró que está filogenéticamente relacionada con las cepas aisladas a partir de brotes epidémicos en Nepal, India y Birmania, correspondientes al genotipo IA. La comparación de secuencias reveló un grado de identidad variable a lo largo del genoma, siendo la cepa de Nepal la más próxima (97,49% de identidad en la secuencia de nucleótidos), seguido de India1 (96,28% de identidad) y Birmania1 (96,25% de identidad). Estas diferencias se traducen en un nivel de conservación del 97,5-98% de la secuencia de aminoácidos. Respecto a la cepa Sar-55 utilizada como control (originaria de Pakistán), englobada en el genotipo IB, presentaba un porcentaje de identidad de 92% en la secuencia de nucleótidos y un 96,94% respecto a la secuencia proteica. La caracterización genómica de múltiples aislados de Birmania y regiones vecinas del norte de Pakistán y sudoeste de China ha demostrado que las cepas originarias de regiones próximas geográficamente presentan un mayor grado de similitud que las aisladas en sitios distantes (Aye y col., 1992; Yin y col., 1994). Contrariamente a esto, el grado de identidad en la secuencia de nucleótidos observado entre BCN y las cepas del norte de África fue de sólo un 89-90%, y un 79% con un aislado divergente de Marruecos. Según estos datos el origen de la cepa BCN sería la región del sureste de Asia, y el hecho excepcional de encontrarse esporádicamente en un lugar tan distante como es España se podría explicar como un caso hipotéticamente importado. Este estudio demuestra que países no endémicos están expuestos a la entrada de virus procedentes de zonas de alta endemicidad.

La segregación geográfica entre las cepas de VHE se ha observado solamente al nivel de la secuencia de nucleótidos. La secuencia de aminoácidos en los tres ORFs está altamente conservada. En la cepa BCN se observaron sustituciones conservativas y no conservativas en los péptidos codificados en las tres pautas de lectura, que no aparecen en las otras cepas

comparadas. El significado de estas sustituciones en BCN se desconoce. No se han descrito diferencias antigénicas entre las diferentes cepas de VHE, aunque se ha sugerido que sustituciones en la secuencia de aminoácidos pueden producir cambios conformacionales que podrían variar la inmunoreactividad del virus (Khudyakov y col., 1993 y 1994).

Estudios seroepidemiológicos realizados en países no endémicos, y entre ellos España habían demostrado que la prevalencia de anticuerpos anti-VHE en la población general era de un 3% (Buti y col., 1995; Mateos y col., 1999). El origen de esta prevalencia relativamente alta ha sido durante mucho tiempo un enigma (Paul y col., 1994; Thomas y col., 1997). Los pocos casos descritos eran a menudo importados de países endémicos (Dupuy y col., 1998). Para documentar la existencia de casos clínicos en España producidos por VHE, se analizaron por PCR muestras de suero de pacientes con hepatitis aguda. Se detectó viremia en dos pacientes con anticuerpos IgG anti-VHE (25%), y en un paciente con hepatitis aguda con anti-VHA (7%). Esto representaba un 5,4% de los pacientes estudiados con hepatitis aguda no-A/no-C. La presencia de niveles de ARN detectables en el suero se observó en la fase inicial de la enfermedad, y no en muestras recogidas durante la fase de convalecencia (3 semanas después de la máxima actividad de ALT) Esto indica que la viremia es transitoria y deja de observarse al aumentar los niveles de IgG anti-VHE (Wu y col., 1998).

Durante el desarrollo de este trabajo se han descrito nuevas cepas del VHE que producen hepatitis agudas en pacientes de países industrializados que no habían viajado a zonas endémicas (Kwo y col., 1997; Schlauder y col., 1998 y 1999; Erker y col., 1999; Zanetti y col., 1999). También recientemente se han identificado varias especies de animales salvajes y domésticos susceptibles a la infección por el VHE (Balayan y col., 1990; Clayson y col., 1995; Meng y col., 1997, 1998a, 1998b; Kabrane-Lazizi y col., 1999; Favorov y col., 2000), y se ha aislado cepas del VHE de origen porcino genéticamente relacionadas con otras cepas del VHE procedentes de pacientes con hepatitis aguda (Meng y col., 1997; Hsieh y col., 1999). En presente trabajo, el estudio de la secuencia de nucleótidos de dos regiones del genoma de las cepas víricas presentes en los pacientes con hepatitis aguda, puso en evidencia la presencia de dos nuevos aislados del VHE. No se ha documentado ningún caso clínico producido por la cepa BCN. Los nuevos aislados VH1 y VH2 se diferenciaban en un 7% de la secuencia de nucleótidos estudiada, y presentaban un 74 y 75% de identidad respecto a la región homóloga del ORF2 de BCN respectivamente, y un 76 y 77% en la región estudiada del ORF1. Las cepas genéticamente más próximas eran una aislada en Grecia con un 93-94% de identidad, un 82-84% con otras cepas de Grecia e Italia (Schlauder y col., 1999), y un 82-

84% con las cepas aisladas recientemente en Estados Unidos de origen humano y porcino. Las demás cepas de Asia, África y Méjico diferían en más de un 22%. VH1 y VH2 pertenecerían al genotipo VI junto con la cepa Grecia1 (Schlauder y col., 1999).

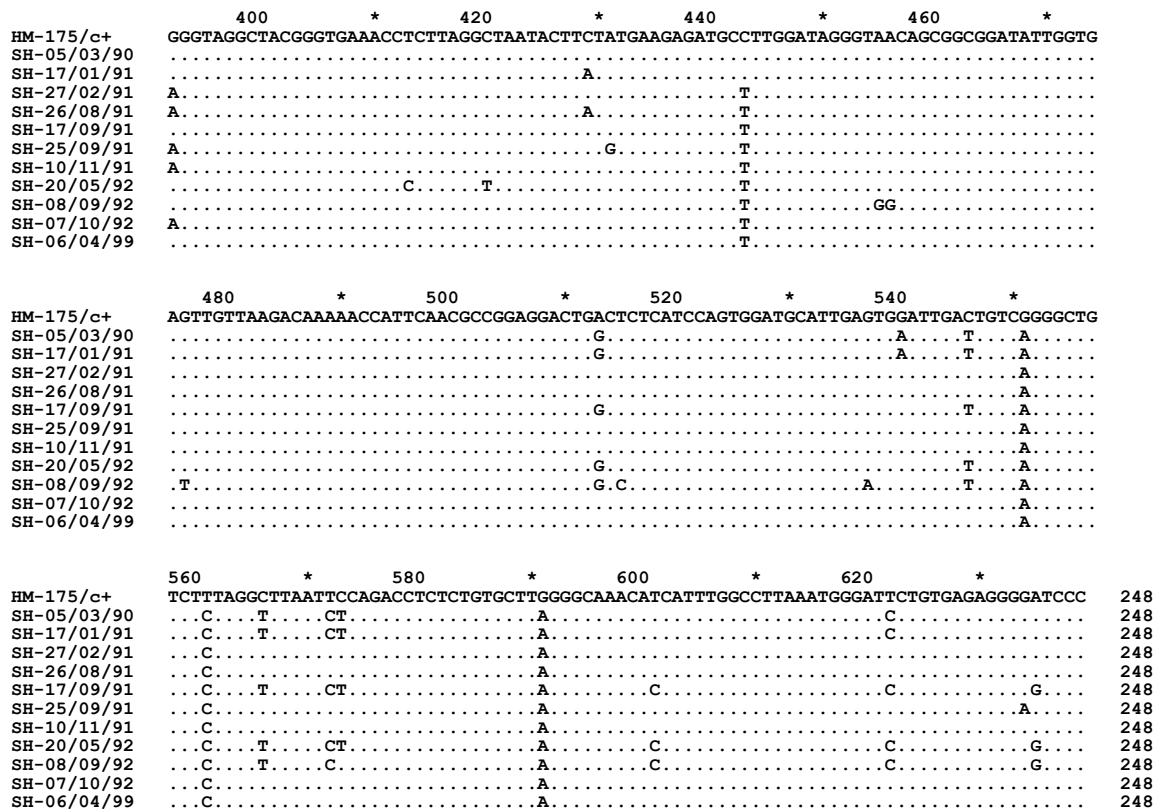
En este trabajo se aportan más datos sobre la posibilidad de que los cerdos actúen como reservorio de la infección por VHE. En un estudio realizado en granjas comerciales de cerdos en Estados Unidos se ha demostrado que la mayoría de cerdos de  $\geq 3$  meses han desarrollado anticuerpos anti-VHE (Meng y col., 1997). En este estudio se ha observado una seroprevalencia en cerdos de un 25%, y se ha identificado una cepa llamada E11 a partir de agua residual de matadero de cerdo donde se sacrificaban alrededor de 5000 animales por semana. El análisis genético de esta cepa en la región amplificada del ORF2 reveló un grado de similitud del 92-94% respecto a VH1 y VH2, y un 83-85% respecto a la cepa de origen porcino y humano de Estados Unidos (Pina y col., 2000). Estos datos apoyan la hipótesis de que en zonas previamente consideradas como no endémicas la infección producida por cepas del VHE que infectan al hombre y a los animales podría ser la explicación de la seropositividad detectada en la población general. En este estudio se demuestra que estas cepas son responsables de casos de hepatitis E esporádicos.

Teniendo en cuenta estos datos habría que cambiar los conceptos hasta ahora aceptados sobre la epidemiología del VHE y dejar de considerar los países desarrollados como “no endémicos”. Tal como sugirió Yin y col. en 1993, la hipótesis más aceptable sería que el VHE se habría diversificado hace mucho tiempo en varios genotipos y estos se habrían mantenido una circulación restringida dentro de cada área geográfica, existiendo genotipos propios de países desarrollados.

La posibilidad de que cepas de origen porcino puedan infectar al hombre ha hecho surgir el interés por evaluar el riesgo epidemiológico que supone la posibilidad de que la infección por VHE sea una zoonosis, y de identificar otros posibles reservorios del virus (Favorov y col., 1998; Meng, 2000; Wu y col., 2000).

### 4.3.2. Caracterización de cepas del VHA en muestras clínicas

Se analizaron por RT-PCR anidada 15 muestras de suero procedente de pacientes con hepatitis aguda que presentaban IgM anti-VHA. Se pudo detectar viremia en 11 casos (73%). El análisis de la secuencia del ADN amplificado de la región 5’NTR nos permitió identificar cepas que presentaban entre 4 y 16 sustituciones de nucleótidos respecto a la cepa control, en un fragmento de 248 nt (Figura 4.4., Tabla 4.5.). En todos los casos se observó la sustitución de los nucleótidos G-551 y G-591 por un nucleótido adenosina característico de las cepas salvajes.



**Figura 4.4.** Alineación de la secuencia de nucleótidos de la región 5’NTR de las cepas del VHA detectadas en muestras de suero humano respecto a la cepa HM-175 utilizada como control. Se indican sólo las diferencias.

Las secuencias obtenidas se compararon con las regiones homólogas de 23 cepas del VHA caracterizadas previamente y depositadas en el banco de datos. La secuencia de nucleótidos difería de la cepa control en 4–16 nt (98,4–93,6% de identidad) (Tabla 4.6.). En 5



de las 11 muestras estudiadas se identificaron cepas variantes de la MBB (<99% de identidad). En 6 pacientes se identificaron cepas genéticamente relacionadas con la GBM (97,5–100% de identidad) (Tabla 4.6).

En la región estudiada del VP1/2A las cepas detectadas en los sueros de pacientes con hepatitis aguda tipo A diferían de la cepa control en 16–43 nt (95,9–89,2% de identidad) (Figura 4.5., Tabla 4.5.). La comparación con las secuencias de VHA depositadas en el banco de datos permitió confirmar la presencia de cepas relacionadas con la GBM (93,7–98,7% identidad) y la con la MBB y L-A-1 (97,4–98,2% identidad) (Tabla 4.6.). Estos indican que los casos de hepatitis aguda entre 1990 y 1999 estuvieron producidos por cepas pertenecientes a los genotipos IA y IB con una prevalencia de aproximadamente un 50% cada uno.

**TABLA 4.6.**  
**Comparación con las cepas clínicas con otras cepas de VHA**

| Muestra     | 5'NTR (248 nt)                |                                   |                  | VP1/2A (398 nt)               |                                   |                  |
|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------------|
|             | Identidad con la cepa control | Identidad con la cepa más próxima |                  | Identidad con la cepa control | Identidad con la cepa más próxima |                  |
|             |                               | Porcentaje de identidad           | Cepa más similar |                               | Porcentaje de identidad           | Cepa más similar |
| SH-05/03/90 | 96,0%                         | 98,4%                             | GBM              | 89,4%                         | 93,7%                             | GBM              |
| SH-10/11/90 | 94,4%                         | 99,5%                             | MBB              | 94,2%                         | 97,9%                             | L-A-1            |
| SH-17/01/91 | 95,6%                         | 97,9%                             | GBM              | 89,4%                         | 95,2%                             | GBM              |
| SH-27/02/91 | 98,0%                         | 99,5%                             | MBB              | 94,0%                         | 97,4%                             | MBB              |
| SH-26/08/91 | 97,6%                         | 99,1%                             | MBB              | 94,5%                         | 98,2%                             | L-A-1            |
| SH-17/09/91 | 95,2%                         | 100%                              | GBM              | 89,2%                         | 98,7%                             | GBM              |
| SH-25/09/91 | 97,2%                         | 99,5%                             | MBB              | 94,5%                         | 97,9%                             | MBB              |
| SH-20/05/92 | 94,4%                         | 99,1%                             | GBM              | 89,7%                         | 98,7%                             | GBM              |
| SH-08/09/92 | 93,6%                         | 97,5%                             | GBM              | 89,7%                         | 98,7%                             | GBM              |
| SH-07/10/92 | 98,0%                         | 99,5%                             | MBB              | 94,2%                         | 97,9%                             | L-A-1            |
| SH-06/04/99 | 98,4%                         | 99,1%                             | GBM              | 95,9%                         | 96,7%                             | HM175/wt         |

|             |  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
|-------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
|             | 2960   | *    | 2980 | *    | 3000 | *    | 3020 | *    | 3040 |   |
| HM-175/c+   | CACAGAACAAATCAGAGTTTTATTTCCAGAGCTCCATTGAAC TCAAATGCCATGTTACCCACTGAATCAATGATGAGCAGAATTGCAG  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-05/03/90 | .....C.....T.....A.T.....T.....GT.T.....G.C.....T.....                                     |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-08/09/90 | .....T.....T.....C.T.....GT.....G.T.....T.....   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-10/11/90 | T.....T.....T.....T.....T.....T.....   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/01/91 | .....C.....T.....A.T.....T.....GT.T.....G.C.....T.....                                     |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-27/02/91 | T.....G.....T.....T.....T.....   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-26/08/91 | T.....T.....T.....T.....T.....   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/09/91 | T.....T.....T.....T.....GT.....G.T.....T.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-25/09/91 | T.....T.....T.....T.....T.....   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-20/05/92 | .....T.....T.....T.....GT.....G.T.....T.....C.....   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-07/10/92 | T.....T.....T.....T.....T.....   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-06/04/99 | .....T.....T.....T.....T.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
|             | *  | 3060 | *    | 3080 | *    | 3100 | *    | 3120 | *    | 3 |
| HM-175/c+   | CTGGAGACTTGGAGTCATCAGTGGATGATCCTAGATCAGAGGAAGATAAAAAGATTTGAGAGTCATATAGAATGCAGGAAGCCATATAAA |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-05/03/90 | .....C.....C.G.....T.A.A.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-08/09/90 | .....G.C.G.....T.A.C.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-10/11/90 | .....G.....A.C.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/01/91 | .....C.....C.G.....T.A.A.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-27/02/91 | .....G.....G.....A.C.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-26/08/91 | .....C.....G.....A.C.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/09/91 | .....G.C.GG.....T.A.A.C.....   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-25/09/91 | .....G.....A.C.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-20/05/92 | .....G.C.G.....T.A.C.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-07/10/92 | .....G.....A.C.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-06/04/99 | .....A.....G.....C.....  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
|             | 140  | *    | 3160 | *    | 3180 | *    | 3200 | *    | 3220 |   |
| HM-175/c+   | GAACTGAGATTAGAAGTTGGGAAACAAAGACTCAAGTATGCTCAGGAAGAATTGTCAAATGAAGTACTTCCACCCCTAGGAAAATGAA   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-05/03/90 | ...T...T.G...A...G...C...G...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-08/09/90 | ...G.G...A...G...G...T...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-10/11/90 | ...T...G...G...C...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/01/91 | ...T...T.G...A...G...C...G...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-27/02/91 | ...T...G...C...A...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-26/08/91 | ...T...G...C...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/09/91 | ...T...G.G...A...G...G...T...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-25/09/91 | ...T...G...C...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-20/05/92 | ...T...G.G...A...A...G...G...T...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-07/10/92 | ...T...C.G...C...T...A...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-06/04/99 | ...T...T...T...T...T...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
|             | *  | 3240 | *    | 3260 | *    | 3280 | *    | 3300 | *    |   |
| HM-175/c+   | GGACTGTTTTTCAAGCCAATAATTTCTCTTTTTTATACTGAGGAGCATGAAATGATGAAGTTTTCTCGGAGAGTGTGACTGCTGATA    |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-05/03/90 | A.GA.A...T.A...C...A...A...T...G...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-08/09/90 | A.GG.T...C.G.T.A...A...A...T...A...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-10/11/90 | ...GT...T.A...C...A...T...A...   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/01/91 | A.GA.A...T.A...C...A...A...T...G...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-27/02/91 | ...GT...T.A...C...A...A...T...A...   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-26/08/91 | ...GT...T.A...C...A...A...T...A...   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/09/91 | A.GG.T...C.G.T.A...A...A...T...A...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-25/09/91 | ...GT...T.A...C...A...A...T...A.A...   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-20/05/92 | ...GG.T...C.G.T.A...A...A...T...A...   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-07/10/92 | ...GT...T.A...C...A...A...T...A...   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-06/04/99 | ...A...C...A...A...T...A.A...  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
|             | 3320   | *    | 3340 | *    | 398  |      |      |      |      |   |
| HM-175/c+   | CTAGAGCTTTAAGGAGGTTTGGATTCTCTTTGGCCGCA   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-05/03/90 | ...G...G.A.A...A...T.T...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-08/09/90 | .C.....G.A.A...A...T.T.T...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-10/11/90 | .....T.....T.T...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/01/91 | ...G...G.A.A...A...T.T...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-27/02/91 | .....T.....T.T...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-26/08/91 | .....T.....T.T...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-17/09/91 | .....G.A.A...CA...T.T...398  |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-25/09/91 | .....T.....T.T...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-20/05/92 | .....G.A.A...A...T.T...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-07/10/92 | .....T.....T.T...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| SH-06/04/99 | .....T.T.G...398   |      |      |      |      |      |      |      |      |   |

Figura 4.5.

Alineación de la secuencia de nucleótidos de la región del VP1/2A (398 nt) de las cepas del VHA detectadas en muestras de suero respecto a la cepa HM-175 utilizada como control. Se indican sólo las diferencias.

### **4.3.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS DEL VHA IDENTIFICADAS EN MUESTRAS DE AGUA AMBIENTALES Y SUEROS HUMANOS**

La secuencia de 248 pb del extremo 5'NTR obtenida a partir de las 29 muestras ambientales y las 11 muestras de suero humano se comparó con 23 secuencias de cepas del VHA depositadas en el GenBank, representativas de los genotipos IA, IB y II (de origen humano), y IIIA y V (aislados de primates) (Robertson y col., 1992) (Tabla 4.2.). La región 5'NTR es la región más conservada entre las diferentes cepas del VHA. En la región estudiada se ha observado un grado de identidad del 81–100%, siendo superior al 93% entre cepas del mismo genotipo, y mayor del 96% entre cepas del mismo subgenotipo.

En la región del VP1/2A se ha descrito un 15–25% de variabilidad entre cepas de origen humano y animal, y por eso ha sido utilizada para los estudios filogenéticos (Robertson y col., 1992). En la región estudiada se ha observado un 72–100% de identidad.

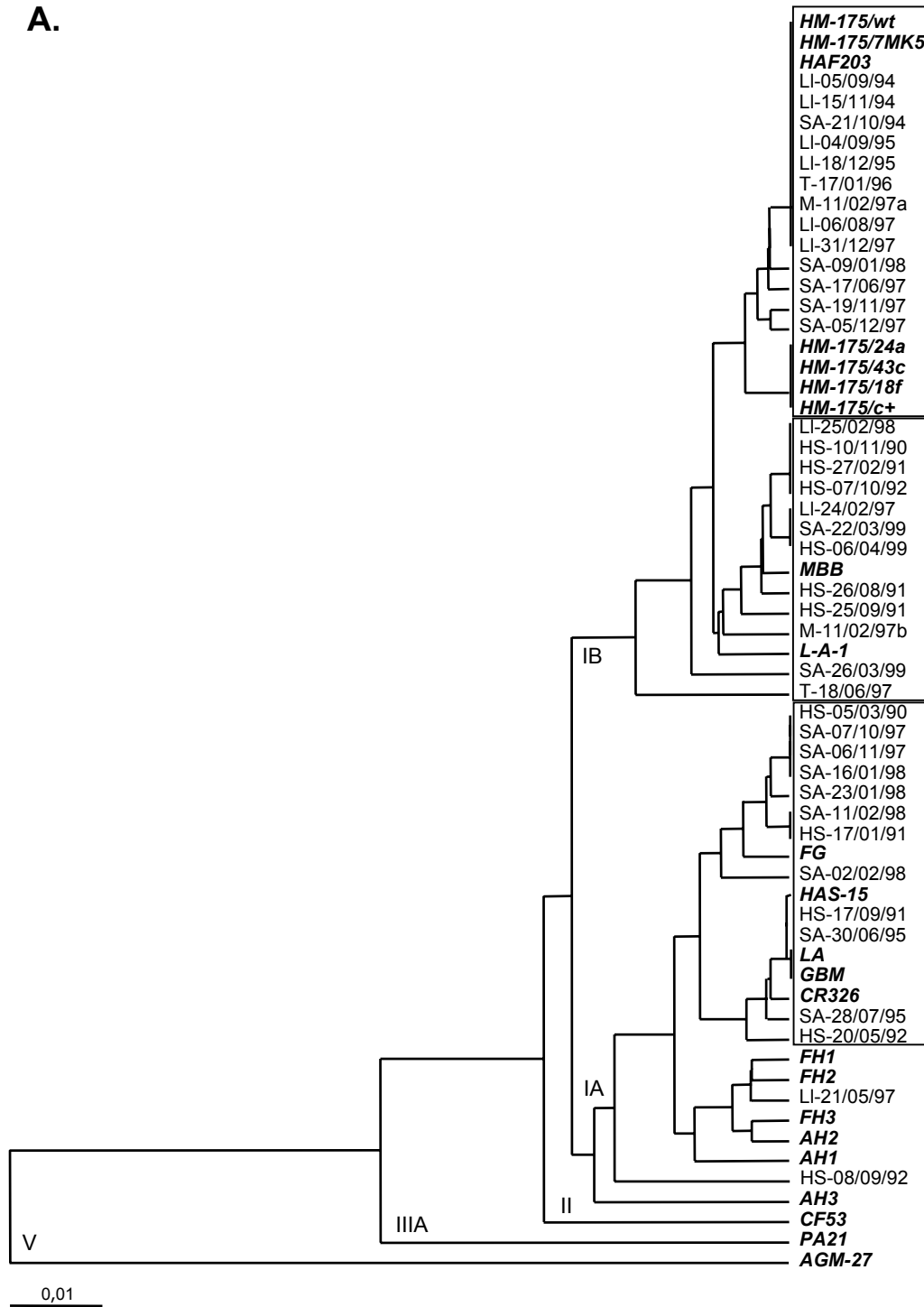
En la representación del árbol filogenético se aprecia que las cepas detectadas en las muestras estudiadas aparecen agrupadas con cepas de los genotipos IA y IB (Figura 4.6.). A partir de esta representación se pueden distinguir tres grupos de secuencias: similares a HM-175, MBB, y LA/GBM/FG, que circulan al mismo tiempo en la misma región.

Las cepas similares a HM-175 se han encontrado en muestras de agua residual, de río y de mar desde 1994 a 1999. El grupo formado por cepas relacionadas con la MBB, engloba varias cepas procedentes de muestras de agua entre 1997 y 1999. Cepas similares se han encontrado en muestras clínicas de 1990–1992 y 1999, lo que sugiere una baja tasa de acumulación de mutaciones lo largo del tiempo como se había descrito previamente (Robertson y col., 1992). Estas presentan un grado de similitud del 96–100% en el fragmento del extremo 5'NTR y un 97–99% de identidad en la región estudiada del VP1/2A.

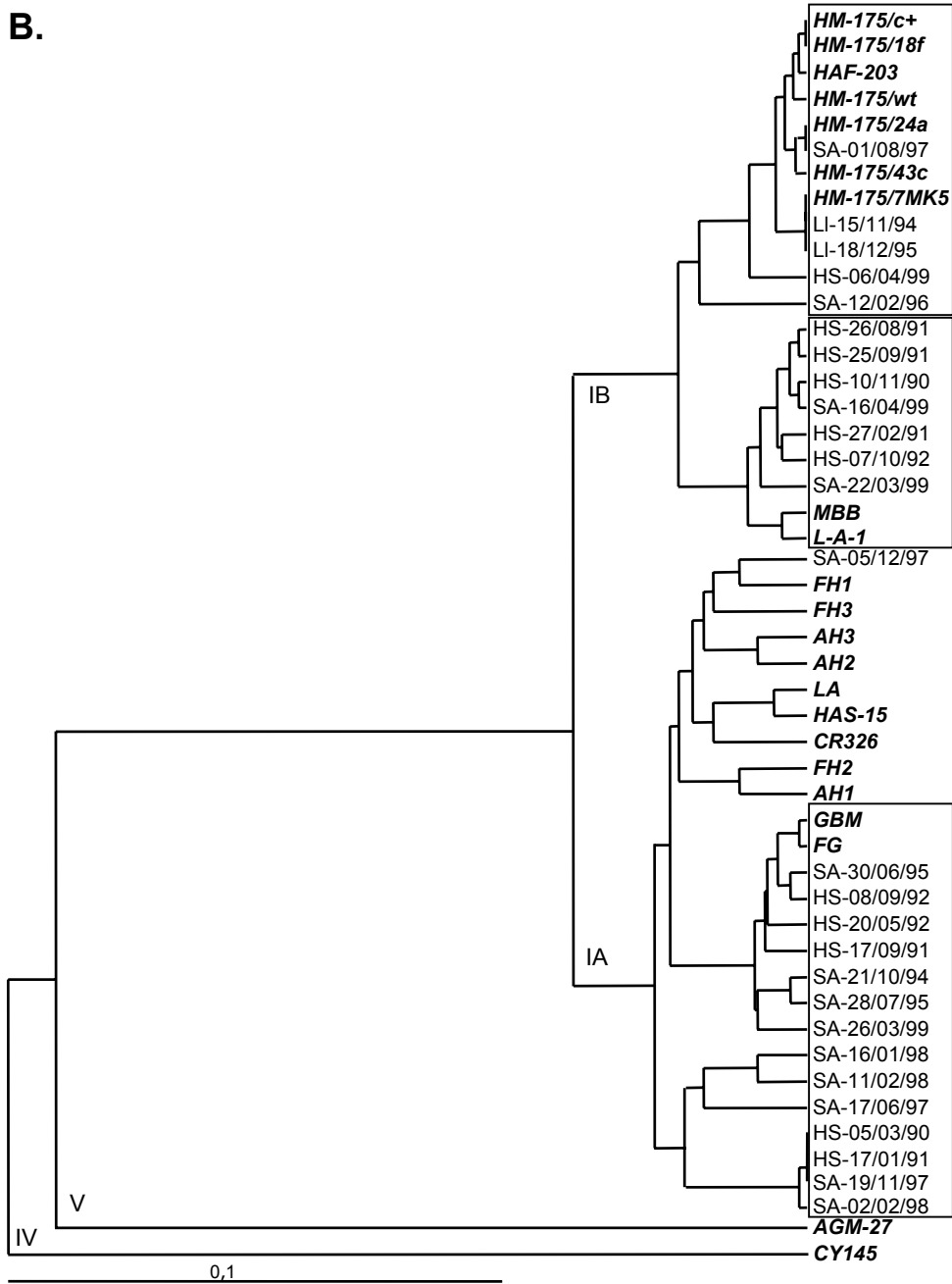
De forma análoga, se han detectado variantes del subgenotipo IA, entre las que se encuentran un grupo de cepas detectadas en agua residual entre 1997–1998, y en muestras clínicas de 1990–1992, con un 98–100% de identidad en la región del 5'NTR y un 92–100% en el VP1/2A. En este caso, además, el hecho de encontrar cepas tan similares en el agua residual durante un periodo de varios meses podría ser indicativo de la existencia de un brote durante los meses más fríos de finales de 1997 y principios de 1998.

Esporádicamente se observa la presencia de cepas genéticamente relacionadas con las cepas FH y AH.

**A.**



(leyenda en la página siguiente)



**Figura 4.6.**

Filograma mostrando el agrupamiento entre las cepas de VHA detectadas en muestras ambientales y en sueros de pacientes con hepatitis aguda, respecto a otras cepas previamente caracterizadas en la región estudiada de A) extremo 5'NTR (248 nt) y B) VP1/2A (296 nt), calculado por el algoritmo UPGMA. La barra indica la distancia genética. Se indica la distribución en genotipos según Robertson y col. (Robertson y col., 1992).

## **4.4. DISCUSIÓN**

En este capítulo se ha descrito la diversidad de cepas del VHA que circulan en la población de una región de endemicidad intermedia.

La metodología aplicada nos ha permitido obtener datos sobre la epidemiología de la infección por el VHA. Los resultados obtenidos a partir del análisis de aguas residuales, aguas de río y aguas de mar nos han indicado la presencia de partículas víricas del VHA en un 34,3% de las muestras, y se ha encontrado distribuido durante todos los meses del año. La excreción de partículas víricas a través de las heces es abundante ( $10^8$ - $10^9$  DI/g) (Purcell, 1994), y puede persistir durante 3 semanas después de la aparición de ictericia (Coulepis y col., 1980). Se han descrito infecciones persistentes subclínicas en neonatos que pueden llegar a excretar partículas víricas durante 6 meses (Rosenblum y col., 1991), infecciones crónicas en adultos con presencia de IgM anti-VHA y niveles anormales de los enzimas hepáticos hasta 31 meses después de la aparición de los síntomas de la enfermedad (Inoue y col., 1996), y casos de excreción prolongada en heces (2-3 meses) con niveles de transaminasas normales (Yotsuyanagi y col., 1996). Según esto, aunque no es el patrón típico, el VHA podría permanecer en el individuo infectado durante un largo periodo de tiempo, pudiendo así contribuir a la transmisión de la enfermedad. Este es un factor importante a tener en cuenta como posible origen de la abundancia del VHA en el ambiente. Además, recientes estudios han sugerido la capacidad de multiplicación del VHA en el epitelio intestinal (Blank y col., 2000), lo que podría constituir una posible fuente de proliferación y excreción de virus.

Numerosos estudios han demostrado la elevada supervivencia del VHA en aguas continentales, marinas, agua de distribución y en superficies (Nasser y col., 1993; Gantzer y col., 1998; Sobsey y col., 1988). Sin embargo, se ha demostrado la excreción de una alta proporción de partículas defectivas en relación a las partículas infecciosas (Nüesch y col., 1989; Polish y col., 1999). Así pues, la detección de ARN viral por PCR podría no estar necesariamente correlacionado con la infectividad real. El aislamiento del VHA en cultivo celular es un proceso lento y caro que no se consigue con todas las cepas. Además, se ha descrito la contaminación de líneas celulares con cepas de laboratorio del VHA que podrían conducir a resultados sin relación epidemiológica (Jansen y col., 1990). La evaluación de la

posible transmisión del VHA mediante aguas o alimentos contaminados requiere la utilización de métodos moleculares que proporcionen la máxima sensibilidad y especificidad.

Este estudio ha permitido identificar cepas del VHA que circulan en la población, que son excretadas al ambiente y que potencialmente podrían producir nuevas infecciones. El estudio de la secuencia de nucleótidos del ADN amplificado nos ha servido como control para poder discernir entre un positivo real y una posible contaminación, procedente de la amplificación paralela del genoma de la cepa utilizada como control positivo en todos los experimentos. En todas las secuencias estudiadas se observó como mínimo la sustitución de los nucleótidos G-551 y G-591, presentes en las variantes de la cepa HM-175 que producen efecto citopático sobre líneas celulares (Lemon y col., 1991), por un nucleótido adenosina. En la región del VP1/2A se observó como mínimo la sustitución del nucleótido C-3018 presente en la cepa control HM-175 y en la variante HM-175/18F por un nucleótido timina. Estas sustituciones permitían descartar posibles contaminaciones.

Se ha demostrado un alto nivel de identidad entre las secuencias de nucleótidos de las cepas del VHA de origen humano. La región 5'NTR es la zona más conservada del genoma, con más de un 92% de identidad entre las diferentes cepas (Beard y Lemon, 1999; Cohen y col., 1987b). En general los diferentes genotipos descritos difieren en un 15-25% en la región hipervariable, situada en la zona de transición entre VP1/2A (Robertson y col., 1992). El estudio de la secuencia del ADN amplificado de fragmentos de estas dos regiones, nos ha permitido identificar varias cepas del VHA que estarían circulando simultáneamente en la población, siendo el genotipo I el más prevalente, con aproximadamente un 50% de cepas de cada subgenotipo IA y IB respectivamente. El genotipo I incluye el 80% de cepas las descritas en todo el mundo (Robertson y col., 1992). En muestras aguas residuales y naturales se han identificado variantes de la cepa HM-175. Se han registrado, además, otros tres grupos de secuencias: *i*) un grupo de secuencias relacionadas con la cepa MBB que aparecen en muestras ambientales de 1997-99, y clínicas de 1990-92 y 1999; *ii*) cepas del subgenotipo IA que aparecen en muestras ambientales de 1997-98 y clínicas de 1990-92; *iii*) esporádicamente cepas similares a FH/AH. El hecho de encontrar secuencias similares o idénticas en muestras ambientales y clínicas, aunque separadas en el tiempo, sugiere una relación epidemiológica. Estos datos están en concordancia con otros estudios realizados por otros autores que han demostrado que cepas pertenecientes al mismo genotipo se han aislado con años de diferencia, presentando una tasa de mutación muy baja (<3% en la región VP1/2A) (Robertson y col., 1992; Beard y Lemon, 1999; Esteban y col., 1999).

Se ha estudiado la secuencia de las cepas del VHA presentes en 31 muestras ambientales y 11 muestras clínicas, que han demostrado ser muy similares o idénticas a otras cepas previamente aisladas en áreas geográficas muy distantes. No se ha documentado la circulación de cepas endémicas como había sido propuesto por Robertson y col., en 1992, que describió la existencia de variantes características de USA entre 1976 y 1990. Esto es probablemente debido a la alta tasa de desplazamientos que se producen en la región mediterránea, con una alta prevalencia de la infección y la gran estabilidad que presenta el VHA en el ambiente.

Los estudios seroepidemiológicos realizados en los últimos 10 años han demostrado una disminución de la prevalencia de la infección por el VHA en la población de los países del sur de Europa, y entre ellos España (Papaevangelou, 1992, Bruguera y col., 1999; Lopalco y col., 2001) especialmente en la población infantil relacionado con la mejora de las condiciones higienico-sanitarias. El consiguiente incremento en la población adulta susceptible a la infección puede comportar consecuencias negativas, ya que en los adultos la infección es habitualmente sintomática y de mayor gravedad que en los niños (Bruguera y col., 1999; Lopalco y col., 2001). Estas infecciones son la mayoría adquiridas por el consumo de alimentos contaminados, especialmente moluscos o a viajes internacionales. Serán necesarios más estudios en los próximos años para poder evaluar una posible reducción de la presencia del VHA en el ambiente, considerando la disponibilidad de una vacuna efectiva aunque su utilización se ha restringido a los denominados grupos de riesgo debido a su alto coste.

La posibilidad de determinar el genotipo de las cepas víricas circulantes proporciona la capacidad para definir varios aspectos de la infección y la transmisión del VHA. Los datos disponibles apoyan el uso de las técnicas moleculares como herramienta de diagnóstico, y su utilidad para estudiar la epidemiología molecular de virus como el VHA.



***Conclusiones***

---



- 1.** Se ha definido un protocolo para la amplificación específica de AdH, EV, VHA y VHE por RT-PCR o PCR seguido de PCR anidada, con un nivel de sensibilidad de 1–10 copias genómicas.
- 2.** Se ha desarrollado un método de recuperación de partículas víricas que permite detectar virus entéricos en muestras de aguas ambientales con elevada sensibilidad y especificidad.
- 3.** El estudio de la contaminación vírica en muestras de aguas residuales, aguas de río y agua de mar, nos ha permitido constatar la mayor prevalencia y concentración de partículas víricas de AdH, seguido de EV y VHA. Todas las muestras positivas para EV y/o VHA presentan también AdH.
- 4.** Se ha observado una constante presencia de AdH, EV y VHA en el medio a lo largo del año, con un nivel de prevalencia ligeramente superior en los meses más fríos.
- 5.** Se han adaptado los protocolos de detección de virus para estudiar la contaminación vírica de los moluscos bivalvos. Se ha detectado AdH y EV en muestras de mejillones y almejas naturales procedentes de áreas contaminadas, con una sensibilidad de 10-100 PV.
- 6.** La presencia de virus de origen humano en muestras de agua residual se ha comparado con otros indicadores propuestos (coliformes fecales, colifagos, fagos de *Bact. fragilis*, enterovirus infecciosos) encontrando una correlación significativa entre EV y VHA detectados por PCR respecto a los colifagos somáticos y fagos de *Bact. fragilis*.
- 7.** Los resultados obtenidos confirman el origen exclusivamente humano de los adenovirus detectados mediante los cebadores específicos descritos. La detección de adenovirus humanos por PCR anidada proporciona información sobre la calidad virológica del agua de forma rápida (aproximadamente 48 h), pudiendo ser aplicado como un índice de contaminación viral de origen humano.

- 8.** Se ha demostrado que en una región de endemicidad intermedia, como es el caso de Barcelona, coexisten en proporciones equivalentes cepas del VHA de los genotipos IA y IB, que se han identificado en muestras ambientales y en sueros de pacientes con hepatitis aguda tipo A.
- 9.** Se ha aislado y caracterizado una cepa infecciosa del VHE a partir de agua residual en Barcelona, que presenta un 98% de identidad en la secuencia de nucleótidos respecto a cepas aisladas en Asia (Nepal, Birmania), clasificadas en el genotipo IA.
- 10.** La infección producida por la cepa BCN del VHE en monos rhesus presenta el patrón típico, con excreción durante las semanas 1 y 5 post-infección, y seroconversión a partir de la semana 5.
- 11.** La estabilidad de la partícula vírica del VHE en agua residual se ha estimado en una  $T_{90} = 20$  días y  $T_{99} = 39$  días. Poliovirus tipo 1 presentó una estabilidad superior con una  $T_{90} = 38$  días y  $T_{99} = 79$  días.
- 12.** Se han identificado dos cepas del VHE, llamadas VH1 y VH2, responsables hepatitis aguda esporádicas en Barcelona. Estas se diferencian en un 7% de la secuencia de nucleótidos estudiada, y pertenecerían al genotipo VI. Las cepas genéticamente más próximas se han descrito en países también considerados no endémicos (Grecia, Italia, USA).
- 13.** Se ha observado una seroprevalencia de anticuerpos Ig G anti-VHE en cerdos de un 25%, y se ha identificado una cepa llamada E11 a partir de agua residual de matadero. El análisis genético en un fragmento del ORF2 reveló un grado de similaridad del 92–94% respecto a VH1 y VH2, y un 83–85% respecto a la cepa de origen porcino caracterizada en USA.
- 14.** Los datos obtenidos apoyan la hipótesis de la existencia de cepas endémicas del VHE que circulan entre la población humana y porcina en países anteriormente considerados como no endémicos, que pueden ser responsables de casos de hepatitis E esporádicos.

*Soluciones, tampones y medios de cultivo*

---

---



**SOLUCIONES, TAMPONES Y MEDIOS DE CULTIVO**

A continuación se detalla la composición y modo preparación de las soluciones, tampones y medios de cultivo que se utilizaron en este trabajo, así como el método de esterilización y condiciones de conservación.

**Recuperación de partículas víricas****Tampón glicina 0,25 M pH 9,5 o pH 10**

|   |         |
|---|---------|
| Glicina   | 18,76 g |
| Agua bidestilada                                | 1000 ml |
| Disolver por agitación                          |         |
| Ajustar el pH con NaOH 10 M                     |         |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |         |
| Guardar a 4°C                                   |         |

**Tampón fosfato salino pH 7,4 (PBS)**

|   |         |
|---|---------|
| NaCl  | 8 g     |
| KCl   | 0,2 g   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 1,15 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0,2 g   |
| Agua bidestilada                                | 1000 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |         |
| Guardar a 4°C                                   |         |

**Tampón fosfato salino doble concentrado pH 7,4 (PBS 2×)**

|   |         |
|---|---------|
| NaCl  | 16 g    |
| KCl   | 0,4 g   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 2,3 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0,4 g   |
| Agua bidestilada                                | 1000 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |         |
| Guardar a 4°C                                   |         |

### **Extracción de ácidos nucleicos**

#### **Suspensión de partículas de sílice**

Resuspender 3,6 g de partículas de sílice en 30 ml de agua bidestilada estéril, en un tubo estéril  
Dejar que precipiten las partículas por gravedad durante 24 h  
Extraer 25,8 ml de sobrenadante  
Añadir agua bidestilada estéril hasta 30 ml  
Dejar precipitar las partículas por gravedad durante 5 h  
Extraer 26,4 ml de sobrenadante  
Recuperar 4 ml de suspensión de partículas de sílice en un tubo de vidrio  
Añadir 33 µl de HCl 35%  
Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min  
Alicuotar y guardar a 4°C

#### **Tris-HCl 0,1 M pH 6,4**

|   |        |
|---|--------|
| Tris base                                       | 1,21 g |
| Agua bidestilada                                | 100 ml |
| Ajustar el pH con HCl 35%                       |        |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Guardar a temperatura ambiente                  |        |

#### **EDTA 0,2 M pH 8**

|   |        |
|---|--------|
| EDTA  | 7,44 g |
| Agua bidestilada                                | 100 ml |
| Ajustar el pH con NaOH 10 M                     |        |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Guardar a 4°C                                   |        |

#### **Tampón de lisis (\*)**

Disolver 12 g de guanidinium isotiocianato (GuSCN) en 10 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 6,4 en un baño de agua a 56-60°C, en una botella de vidrio estéril  
Añadir 2,2 ml de EDTA 0,2 M pH 8 y 0,246 ml de Triton X-100  
Homogeneizar  
Guardar a temperatura ambiente, protegido de la luz como máximo 3 semanas

#### **Tampón de lavado (\*)**

Disolver 12 g de guanidinium isotiocianato (GuSCN) en 10 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 6,4 en un baño de agua a 56-60°C, en una botella de vidrio estéril  
Homogeneizar  
Guardar a temperatura ambiente, protegido de la luz como máximo 3 semanas

(\*) NOTA: El GuSCN es un producto tóxico por inhalación y por contacto con piel y mucosas. Se recomienda manipularlo con precaución.

#### **Etanol 70%**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Etanol absoluto          | 70 ml |
| Agua bidestilada estéril | 30 ml |
| Guardar a -20 °C         |       |



**Acetato sódico 0,01 M pH 5,2**

|   |           |
|---|-----------|
| Acetato sódico                                  | 136,08 mg |
| Agua bidestilada                                | 100 ml    |
| Ajustar el pH con ácido acético glacial         |           |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |           |
| Guardar a 4°C                                   |           |

**Tris 1M-EDTA 10 mM pH 8**

|   |           |
|---|-----------|
| Tris base                                       | 12,114 g  |
| EDTA  | 372,24 mg |
| Agua bidestilada                                | 100 ml    |
| Ajustar el pH con HCl 35%                       |           |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |           |
| Guardar a temperatura ambiente                  |           |

**Tris 10 mM-EDTA 0,1 mM pH 8 (TE)**

|   |       |
|---|-------|
| Tris 1M – EDTA 10 mM pH 8                       | 1 ml  |
| Agua bidestilada                                | 99 ml |
| Comprobar el pH                                 |       |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |       |
| Guardar a temperatura ambiente                  |       |

**Dithiotreitol (DTT) 1M**

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| DTT                          | 154,4 mg |
| Acetato sódico 0,01 M pH 5,2 | 1 ml     |
| Esterilizar por filtración   |          |
| Alicuotar y guardar a -20°C  |          |

**DTT 0,02 M**

|                 |        |
|-----------------|--------|
| DTT 1M          | 10 µl  |
| TE pH 8         | 490 µl |
| Guardar a -20°C |        |

**DTT 1 mM**

|                 |        |
|-----------------|--------|
| DTT 1M          | 1 µl   |
| TE pH 8         | 999 µl |
| Guardar a -20°C |        |

**Tampón de elución de ácidos nucleicos**

|  |               |
|--|---------------|
| DTT 1 mM                                   | 49,4 µl       |
| Inhibidor de RNasas 20 U/µl (Perkin Elmer) | 0,6 µl (12 U) |
| Preparar inmediatamente antes de utilizar  |               |

**Condiciones para la reacción de transcripción inversa (síntesis de ADNc)**

**Solución de trabajo de dNTPs 25 mM**

Mezclar en un tubo *Eppendorf* un volumen igual de cada uno de los nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) partiendo de una solución comercial 100 mM pH 7,5 de cada uno (Farmacia).

**Tampón II 10× (Perkin Elmer)**

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Tris-HCl pH 8,3 | 100 mM |
| KCl             | 500 mM |

**Mezcla de reacción de la transcripción inversa**

|   | <u>Cantidad</u> | <u>Concentración</u> |
|---|-----------------|----------------------|
| Solución de ARN                                   | 5 µl            | no determinada       |
| Iniciador reverso                                 | 8 pmol          | 0,8 µM               |
| Tampón II 10× (Perkin Elmer)                      | 1 µl            | Tampón II 1x         |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Perkin Elmer)            | 0,6 µl          | 1,5 mM               |
| dNTPs 25 mM                                       | 0,4 µl          | 1 mM                 |
| DTT 0,02 M  | 0,5 µl          | 1 mM                 |
| Inhibidor de RNAsas 20 U/µl (Perkin Elmer)        | 10 U            | 1 U/l                |
| Transcriptasa inversa MMLV 50 U/µl (Perkin Elmer) | 50 U            | 5 U/l                |

**PCR a partir de ADNc**

**Mezcla de reacción de la PCR a partir de ADNc**

|   | <u>Cantidad</u> | <u>Concentración</u> |
|---|-----------------|----------------------|
| Solución de ADNc                              | 10 µl           | no determinada       |
| Iniciador directo                             | 8 pmol          | 0,8 µM               |
| Tampón II 10× (Perkin Elmer)                  | 4 µl            | Tampón II 1×         |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Perkin Elmer)        | 2,4 µl          | 1,5 mM               |
| AmpliTaQ DNA polimerasa 5 U/µl (Perkin Elmer) | 2 U             | 0,04 U/µl            |
| Agua Bidestilada estéril                      | hasta 50 µl     |                      |

**PCR a partir de ADN**

**Mezcla de reacción de la PCR a partir de ADN**

|   | <u>Cantidad</u> | <u>Concentración</u> |
|---|-----------------|----------------------|
| Solución de ADN                               | 1-10 µl         | no determinada       |
| Tampón II 10× (Perkin Elmer)                  | 5 µl            | Tampón II 1×         |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Perkin Elmer)        | 3 µl            | 1,5 mM               |
| dNTPs 25 mM                                   | 0,5 µl          | 200 µM               |
| Iniciador directo                             | 1-2 µl          |                      |
| Iniciador reverso                             | 1-2 µl          |                      |
| AmpliTaQ DNA polimerasa 5 U/µl (Perkin Elmer) | 2 U             | 0,04 U/µl            |
| Agua bidestilada estéril                      | hasta 50 µl     |                      |

**Electroforesis de ADN****TBE 10×**

|   |               |
|---|---------------|
| Tris base                                       | 108 g         |
| Ácido bórico                                    | 55 g          |
| EDTA  | 9,3 g         |
| Agua destilada                                  | hasta 1000 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |               |
| Guardar a temperatura ambiente                  |               |

**TBE 1×**

|                |        |
|----------------|--------|
| TBE 10×        | 100 ml |
| Agua destilada | 900 ml |

**Agarosa en TBE 1×**

La concentración de las soluciones de agarosa dependen del tamaño del ADN que interesa estudiar:

| Tamaño del ADN | Concentración de agarosa |
|----------------|--------------------------|
| >1 Kb          | 1%                       |
| 1 Kb-500 pb    | 1,5%                     |
| <500 pb        | 3%                       |

Disolver la cantidad de agarosa necesaria en 100 ml de TBE 1× (p/v) en una botella de vidrio. Agitar manualmente y disolver la agarosa por calor utilizando un horno microondas sin que llegue a hervir. La agarosa disuelta presenta un aspecto transparente y homogéneo.

Dejar enfriar hasta aproximadamente 50°C y verterla en la cubeta con el peine apropiado.

Dejar polimerizar a temperatura ambiente durante 30 min, después extraer el peine y proceder a cargar las muestras de ADN en la cubeta apropiada.

**Tampón de carga**

|   |       |
|---|-------|
| Azul de bromofenol                              | 25 mg |
| Xilen cianol                                    | 25 mg |
| Ficoll-400                                      | 2,5 g |
| Agua destilada                                  | 10 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |       |
| Guardar a temperatura ambiente                  |       |

**Solución concentrada de bromuro de etidio 2 mg/ml (\*)**

|   |       |
|---|-------|
| Bromuro de etidio                           | 20 mg |
| Dimetilsulfóxido (DMSO)                     | 1 ml  |
| Etanol absoluto                             | 9 ml  |
| Disolver por agitación en un tubo de vidrio |       |
| Guardar a 4°C protegido de la luz           |       |

**Solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml para tinción de geles de agarosa (\*)**

|  |        |
|--|--------|
| Bromuro de etidio 2 mg/ml  | 50 µl  |
| Agua destilada   | 200 ml |
| Preparar en una cubeta lo suficientemente amplia y protegida de la luz |        |
| Guardar a temperatura ambiente   |        |

(\*) NOTA: El bromuro de etidio es un potente mutágeno. Se recomienda manipularlo con precaución, evitando cualquier contacto con la piel.

### **Purificación de ADN**

#### **Acetato sódico 3 M pH 5,5**

|   |        |
|---|--------|
| Acetato sódico                                  | 41 g   |
| Agua bidestilada                                | 100 ml |
| Ajustar el pH con ácido acético glacial         |        |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Guardar a 4°C                                   |        |

#### **Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)**

|  |       |
|--|-------|
| Cloroformo                                 | 48 ml |
| Alcohol isoamílico                         | 2 ml  |
| Mezclar y conservar a temperatura ambiente |       |

#### **Fenol (\*)**

La solución de fenol utilizada viene equilibrada comercialmente con Tris a pH 8. Este tampón es inmisible en el fenol, apareciendo dos fases claramente visibles. La adición de hidroxiquinolina hace que la fase fenólica tenga color amarillo. Antes de usarlo se recomienda mezclar las dos fases agitando por inversión y dejar reposar hasta que se vuelvan a separar. Guardar a 4 °C protegido de la luz.

#### **Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (\*)**

|   |           |
|---|-----------|
| Fenol   | 1 volumen |
| Cloroformo:alcohol isoamílico                       | 1 volumen |
| Preparar la mezcla inmediatamente antes de utilizar |           |

(\*) NOTA: El fenol es un producto altamente tóxico por inhalación y contacto. Se recomienda manipularlo con precaución en una campana extractora de gases.

**Medios utilizados en cultivo celular****Tripsina**

|   |        |
|---|--------|
| Tripsina 1:250                                  | 0,5 g  |
| EDTA  | 0,04 g |
| PBS   | 200 ml |
| Penicilina:estreptomina (10000 U/ml:10000 µg/l) | 2 ml   |
| Esterilizar por filtración                      |        |
| Guardar a 4°C, y la solución estoc a -20°C      |        |

**Medio Eagle modificado (MEM)**

|   |               |
|---|---------------|
| MEM   | 9,4 g         |
| Bicarbonato sódico 7,5%                         | 20 ml         |
| Tampón HEPES                                    | 15 ml         |
| L-Glutamina 200 mM                              | 10 ml         |
| Aminoácidos no esenciales (NEAA)                | 10 ml         |
| Penicilina:estreptomina (10000 U/ml:10000 µg/l) | 10 ml         |
| Suero fetal bovino (FBS)                        | v(*)          |
| Agua bidestilada                                | hasta 1000 ml |

(\*) NOTA: v, variable (15%, 5%, 1% o 0%). El porcentaje de suero fetal en el medio depende de la línea celular utilizada, o de si se está preparando medio para recuperación de células congeladas (15%), medio de crecimiento (5%), medio de mantenimiento (1%) o medio post-infección (0%).

Preparar el medio base MEM en agua bidestilada, disolver por agitación y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Posteriormente añadir los otros componentes en condiciones asépticas.

**Medio sólido (MEM–agar 0,7%) para cultivo celular (*overlay*)**

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| Agar   | 3,5 g/250 ml agua bidestilada |
| MEM  | 4,8 g/250 ml agua bidestilada |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min por separado |                               |
| Atemperar a 55 °C  |                               |
| Mezclar en condiciones asépticas y añadir:                   |                               |
| Penicilina:estreptomina (10000 U/ml:10000 µg/l)              | 10 ml                         |
| Bicarbonato sódico 7,5%                                      | 15 ml                         |
| L-Glutamina 200 mM   | 5 ml                          |
| Mezclar por inversión  |                               |
| Dispensar sobre las placas con las células en monocapa       |                               |

**Solución fijadora de cristal violeta y formol**

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Cristal violeta                | 1,3 g  |
| Alcohol isopropílico           | 50 ml  |
| Formaldehído 35-40%            | 300 ml |
| Agua                           | 650 ml |
| Disolver por agitación         |        |
| Guardar a temperatura ambiente |        |

### **Medios de cultivo para bacterias**

#### **Medio Luria-Bertani (LB)**

|   |         |
|---|---------|
| Bacto-triptona                                  | 10 g    |
| Extracto de lavadura                            | 5 g     |
| NaCl  | 10 g    |
| Agua destilada                                  | 1000 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |         |
| Guardar a temperatura ambiente o a 4°C          |         |

#### **LB agar**

|  |  |
|--|--|
| Preparar medio LB como se indicó anteriormente y añadir agar a una concentración final de 15 g/l |  |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min  |  |
| Atemperar a 55°C y dispensar en placas de Petri  |  |
| Guardar a 4°C  |  |

#### **Ampicilina 50 mg/ml**

|   |       |
|---|-------|
| Ampicilina  | 0,5 g |
| Agua bidestilada  | 10 ml |
| Esterilizar por filtración. Alicuotar y guardar a -20°C |       |

#### **Tetraciclina 12,5 mg/ml**

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Tetraciclina                | 125 mg |
| Etanol 50%                  | 10 ml  |
| Alicuotar y guardar a -20°C |        |

#### **X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosido) 8 mg/ml**

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| X-gal                               | 80 mg |
| Dimetilformamida                    | 10 ml |
| Preparar en un tubo de vidrio       |       |
| Guardar a -20°C protegido de la luz |       |

#### **IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido) 100 mM**

|   |        |
|---|--------|
| IPTG  | 238 mg |
| Agua destilada  | 10 ml  |
| Esterilizar por filtración. Alicuotar y guardar a -20°C |        |

#### **Medio LB/tetraciclina (12,5 $\mu$ g/ml)**

|  |             |
|--|-------------|
| LB estéril   | 100 ml      |
| Tetraciclina 12,5 mg/ml                            | 100 $\mu$ l |
| Mezclar en condiciones asépticas y conservar a 4°C |             |

#### **Medio LB/ampicilina 100 $\mu$ g/ml**

|  |             |
|--|-------------|
| LB estéril   | 100 ml      |
| Ampicilina 50 mg/ml                                | 200 $\mu$ l |
| Mezclar en condiciones asépticas y conservar a 4°C |             |

**Medio LB/tetraciclina (12,5 µg/ml)/ampicilina (100 µg/ml)**

|  |        |
|--|--------|
| LB estéril   | 100 ml |
| Tetraciclina 12,5 mg/ml                            | 100 µl |
| Ampicilina 50 mg/ml                                | 200 µl |
| Mezclar en condiciones asépticas y conservar a 4°C |        |

**Placas de LB agar/ampicilina (100 µg/ml)/X-gal (80 µg/ml)/IPTG (0,5 mM)**

|   |        |
|---|--------|
| Preparar el medio LB agar como se indicó anteriormente                        |        |
| Una vez estéril y atemperado a 55°C añadir en condiciones asépticas a 100 ml: |        |
| Ampicilina 50 mg/ml   | 200 µl |
| X-gal 8 mg/ml   | 1 ml   |
| IPTG 100 mM   | 0,5 ml |
| Mezclar y dispensar en placas de Petri  |        |
| Guardar a 4°C   |        |

**Placas de LB agar/ampicilina (100 µg/ml)/tetraciclina (12,5 µg/ml)/X-gal (80 µg/ml)/IPTG (0,5 mM)**

|   |        |
|---|--------|
| Preparar el medio LB agar como se indicó anteriormente                        |        |
| Una vez estéril y atemperado a 55°C añadir en condiciones asépticas a 100 ml: |        |
| Ampicilina 50 mg/ml   | 200 µl |
| Tetraciclina 12,5 mg/ml   | 100 µl |
| X-gal 8 mg/ml   | 1 ml   |
| IPTG 100 mM   | 0,5 ml |
| Mezclar y dispensar en placas de Petri  |        |
| Guardar a 4°  |        |

**KCl 250 mM**

|   |              |
|---|--------------|
| KCl   | 1,86 g       |
| Agua destilada                                  | hasta 100 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |              |
| Guardar a temperatura ambiente                  |              |

**MgCl<sub>2</sub> 1 M**

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| MgCl <sub>2</sub> •6 H <sub>2</sub> O | 20,33 g      |
| Agua destilada                        | hasta 100 ml |
| Esterilizar por filtración            |              |
| Guardar a temperatura ambiente        |              |

**Glucosa 2 M**

|                            |              |
|----------------------------|--------------|
| D-Glucosa                  | 36 g         |
| Agua destilada             | hasta 100 ml |
| Esterilizar por filtración |              |
| Guardar a 4°C              |              |

**Medio SOC**

|   |        |
|---|--------|
| Bacto-triptona                                  | 2 g    |
| Extracto de lavadura                            | 0,5 g  |
| NaCl  | 0,05 g |
| Agua destilada                                  | 95 ml  |
| KCl 250 mM                                      | 1 ml   |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Añadir en condiciones asépticas:                |        |
| MgCl <sub>2</sub> 1 M                           | 1 ml   |
| Glucosa 2 M                                     | 1 ml   |
| Guardar a temperatura ambiente o a 4°C          |        |

**Tiamina-HCl 1 M**

|  |        |
|--|--------|
| Tiamina-HCl  | 1,68 g |
| Agua destilada                                     | 5 ml   |
| Esterilizar por filtración                         |        |
| Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz |        |

**CaCl<sub>2</sub> 0,1 M**

|   |        |
|---|--------|
| CaCl <sub>2</sub>                               | 1,10 g |
| Agua bidestilada                                | 100 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Guardar a 4°C                                   |        |

**Solución de sales minerales 5×**

|   |        |
|---|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 3,4 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 1,5 g  |
| NaCl  | 0,25 g |
| NH <sub>4</sub> Cl                              | 0,5 g  |
| Agua destilada                                  | 100 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Guardar a temperatura ambiente                  |        |

**MgSO<sub>4</sub> 1M**

|   |              |
|---|--------------|
| MgSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O           | 24,64 g      |
| Agua bidestilada                                | hasta 100 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |              |
| Guardar a temperatura ambiente                  |              |

**Medio M9 agar**

|   |         |
|---|---------|
| Solución de sales minerales 5×                      | 20 ml   |
| Agar  | 1,5 g   |
| Agua destilada                                      | 78,5 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min     |         |
| Atemperar a 55°C y añadir en condiciones asépticas: |         |
| Glucosa 2M  | 1,1 ml  |
| CaCl <sub>2</sub> 0,1 M                             | 0,1 ml  |
| MgSO <sub>4</sub> 1 M                               | 0,2 ml  |
| Tiamina-HCl 1 M                                     | 0,1 ml  |
| Mezclar y dispensar en placas. Guardar a 4°C        |         |



**Medio crioprotector (LB/glicerol 15% v/v)**

|                  |        |
|------------------|--------|
| LB estéril       | 8,5 ml |
| Glicerol estéril | 1,5 ml |

**Penicilina:estreptomicina 0,1 g/l**

|   |       |
|---|-------|
| Penicilina                                    | 5 g   |
| Estreptomicina                                | 5 g   |
| Agua destilada                                | 50 ml |
| Disolver por agitación                        |       |
| Esterilizar por filtración                    |       |
| Alicuotar en tubos de 10 ml y guardar a -20°C |       |

**Hemina 1% en NaOH 0,02%**

|   |        |
|---|--------|
| Agua destilada  | 100 ml |
| NaOH  | 0,02 g |
| Hemina  | 0,1 g  |
| Disolver por agitación durante 2 h. Esterilizar por filtración. Conservar a temperatura ambiente. |        |

**NaCO<sub>3</sub> 1M**

|   |        |
|---|--------|
| NaCO <sub>3</sub>   | 10,6 g |
| Agua destilada  | 100 ml |
| Disolver por agitación. Esterilizar por filtración. Conservar a temperatura ambiente. |        |

**Medio BPRM**

|  |        |
|--|--------|
| BPRM   | 29,4 g |
| Agua destilada   | 1000ml |
| Cl <sub>2</sub> Ca 5%                                  | 1 ml   |
| Mezclar y esterilizar autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Atemperar a 40°C y añadir en condiciones asépticas:    |        |
| Hemina   | 1 ml   |
| NaCO <sub>3</sub> 1 M                                  | 25 ml  |
| Ajustar el pH a 7                                      |        |

**Tampón para fagos**

|   |         |
|---|---------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>              | 7 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>               | 3 g     |
| NaCl  | 5 g     |
| Agua destilada                                | 1000 ml |
| Esterilizar autoclave a 121°C durante 15 min. |         |
| Añadir en condiciones asépticas:              |         |
| MgSO <sub>4</sub> 0,1 M                       | 10 ml   |
| CaCl <sub>2</sub> 0,01 M                      | 10 ml   |

**Reactivos para la extracción de ADN plasmídico**

**Tris-HCl 1M pH 8**

|   |              |
|---|--------------|
| Tris base                                       | 12,12 g      |
| Agua Bidestilada                                | hasta 100 ml |
| Ajustar el pH con HCl 35%                       |              |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |              |
| Guardar a temperatura ambiente                  |              |

**Tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM-EDTA 10 mM (pH 8)-ARNasa A 0,1 mg/ml)**

|  |        |
|--|--------|
| Tris-HCl 1M pH 8                                     | 0,5 ml |
| EDTA 0,2 M pH 8                                      | 0,5 ml |
| ARNasa A   | 1 mg   |
| Agua bidestilada                                     | 9 ml   |
| Incubar en un baño de agua a 100°C durante 10-15 min |        |
| Alicuotar y guardar a -20°C                          |        |

**Dodecil sulfato sódico (SDS) 10% (p/v) (\*)**

|                |       |
|----------------|-------|
| SDS            | 10 g  |
| Agua destilada | 80 ml |

(\*) NOTA: El SDS es un producto irritante de las vías respiratorias. Se recomienda manipularlo con precaución.

**NaOH 0,2 M**

|   |        |
|---|--------|
| NaOH  | 20 mg  |
| Agua destilada                                  | 100 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Guardar a temperatura ambiente                  |        |

**Acetato potásico 3 M pH 4,7**

|   |              |
|---|--------------|
| Acetato potásico                                | 29,44 g      |
| Acido acético glacial                           | 11,5 ml      |
| Agua bidestilada                                | hasta 100 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |              |
| Guardar a temperatura ambiente                  |              |

**Reactivos y tampones para las pruebas ELISA****Tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6**

|   |         |
|---|---------|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                 | 1,59 g  |
| NaHCO <sub>3</sub>                              | 2,93 g  |
| Agua bidestilada                                | 1000 ml |
| Ajustar el pH con NaOH                          |         |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |         |
| Guardar a temperatura ambiente                  |         |

**Tampón de lavado (PBS – 0,05% Tween 20)**

|   |         |
|---|---------|
| PBS pH 7,4                                      | 1000 ml |
| Tween 20  | 0,5 g   |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |         |
| Guardar a temperatura ambiente                  |         |

**Solución de bloqueo (10% FBS – 0,5% gelatina en tampón de lavado)**

|  |       |
|--|-------|
| PBS–0.05% Tween 20                               | 90 ml |
| Gelatina   | 0,5 g |
| Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min |       |
| Añadir en condiciones asépticas:                 |       |
| FBS  | 10 ml |
| Preparar inmediatamente antes de utilizar        |       |

**Acido cítrico 0,1 M**

|   |        |
|---|--------|
| Acido cítrico                                   | 1,92 g |
| Agua destilada                                  | 100 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Guardar a temperatura ambiente                  |        |

**Citrato sódico 0,1 M**

|   |        |
|---|--------|
| Citrato sódico                                  | 2,14 g |
| Agua destilada                                  | 100 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min |        |
| Guardar a temperatura ambiente                  |        |

**ABTS 40 mM (\*)**

|  |         |
|--|---------|
| ABTS   | 21,9 mg |
| Agua destilada                                     | 1 ml    |
| Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz |         |

**Solución reveladora (\*)**

|   |        |
|---|--------|
| Acido cítrico 0,1 M                       | 3,3 ml |
| Citrato sódico 0,1 M                      | 1,7 ml |
| Peróxido de hidrógeno 3%                  | 40 µl  |
| ABTS 40 mM                                | 50 µl  |
| Agua destilada                            | 5 ml   |
| Preparar inmediatamente antes de utilizar |        |

(\*) NOTA: El ABTS es un producto mutagénico. Se recomienda manipularlo con precaución.



## ***Bibliografía***

---



- Abad F.X., Pintó R.M., Diez J.M., Bosch A.** (1994). Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Appl Environ Microbiol*, 60(7):2377-2383.
- Abbaszadegan M., Stewart P., LeChevallier M.** (1999). A strategy for the detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 65(2):444-449.
- Adams M.H.** (1959). Bacteriophages. Interscience, New York.
- Agnès F., Crance J.M., Lévêque F.** (1994). Separate detection of the two complementary RNA strands of hepatitis A virus. *J Virol Meth*, 49:323-330.
- Allard A.** (1992). Enteric adenovirus type 41. Genome organization and especific detection procedures. Tesis Doctoral.
- Allard A., Albinsson B., Wadell G.** (1992). Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 37:149-157.
- Allard A., Girones R., Juto P., Wadell G.** (1990). Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol*, 28(12):2659-2667.
- Allsop K., Stickler D.J.** (1985). An assessment of *Bacteroides fragilis* group of organisms as indicators of human faecal pollution. *J Appl Bacteriol*, 58:95-99.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25:3389-3402.
- Ampurdanès S., Fornés X.** (1995). Tratamiento de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 13(Supl. 1):84-94.
- Anderson D.A., Ross B.C., Locarnini S.A.** (1988). Restricted replication of hepatitis A virus in cell culture: encapsidation of viral RNA depletes the pool of RNA available for replication. *J Virol*, 62:4201-4206.
- Anónimo.** (1996). ISO 10705-1: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages – Part 1: Enumeration of F-specific bacteriophages. International Organization for Standarisation. Geneva, Switzerland.
- Anónimo.** (1997). ISO/CD 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages – Part 2: Enumeration of somatic coliphages. International Organization for Standarisation. Geneva, Switzerland.
- Anónimo.** ISO/WD 10705-4: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages – Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. International Organization for Standarisation. Geneva, Switzerland.
- APHA.** (1995). Standard *methods* for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

- Arankalle V.A., Tsarev S.A., Chadha M.S., Alling D.W., Emerson S.U., Banerjee K., Purcell R.H.** (1995). Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J Infect Dis*, 171:447-450.
- Araújo F., Koch M.C., Monteiro F., Araújo A.R., Cunha-Ribeiro L.M.** (1997). Hepatitis E in Portuguese haemophiliacs and blood donors. *Haemophilia*, 3: 219-220.
- Armon R., Kott Y.** (1993). A simple, rapid and sensitive presence/absence test for bacteriophage detection of aerobic/anaerobic bacteria in drinking water samples. *J Appl Bacteriol*, 74:490-496.
- Atmar R.L., Metcalf T.G., Neill F.H., Estes M.K.** (1993). Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 59(2):631-635.
- Atmar R.L., Neill F.H., Romalde J.L., Le Guyader F., Woodley C.M., Metcalf T.G., Estes M.K.** (1995). Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol*, 61(8):3014-3018.
- Auvinen P., Stanway G., Hyypiä T.** (1989). Genetic diversity of enterovirus group. *Arch Virol*, 104:175-186.
- Aye T., Uchida T., Ma X.Z., Iida F., Shikata T., Zhuang H., Win K.M.** (1992). Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res*, 20:3512.
- Aye T.T., Uchida T., Ma X.Z., Iida F., Shikata T., Ichikawa M., Rikihisa T., Win K.M.** (1993). Sequence and gene structure of the hepatitis E virus isolated from Myanmar. *Virus Genes*, 7:95-109.
- Balayan M.S.** (1997). Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat*, 4:155-165.
- Balayan M.S., Usmanov R.K., Zamyatina N.A., Djumalieva D.I., Karas F.R.** (1990). Brief report: Experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol*, 32:58-59.
- Baroudy B.M., Ticehurst J.R., Miele T.A., Maizel J.V., Purcell R.H., Feinstone S.M.** (1985). Sequence analysis of hepatitis A virus cDNA coding for capsid proteins and RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:2143-2147.
- Beard M.R., Lemon S.M.** (1999). Hepatitis A virus (Picornaviridae) In: Encyclopedia of Virology. Second Edition. Ed. A. Granoff, R.G. Webster. Academic Press. London, UK. PP.631-639.
- Beneduce F., Pisani G., Divizia M., Panà A., Morace G.** (1995). Complete nucleotide sequence of a cytopathic hepatitis A virus strain isolated in Italy. *Virus Res*, 36:299-309.
- Berg G.** (1978). Indicators of viruses in water and food. Ed. G. Berg. Ann Arbor Science. Ann Arbor, MI.
- Berg O., Børsheim K.Y., Bratbak G., Hending M.** (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340:467-468.
- Berke T., Matson D.O.** (2000). Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol*, 145:1421-1436.



- Bi S., Purdy M.A., McCaustland K.A., Margolis H.S., Bradley D.W.** (1993). The sequence of hepatitis E virus isolated directly from a single source during an outbreak in China. *Virus Res*, 28:233-247.
- Bishop N.E., Anderson D.A.** (1997a). Hepatitis A virus subviral particles: purification, accumulation, and relative infectivity of virions, provirions and procapsids. *Arch Virol*, 142:2147-2160.
- Bishop N.E., Anderson D.A.** (1997b). Early interactions of hepatitis A virus with cultured cells: viral elution and the effect of pH and calcium ions. *Arch Virol*, 142:2161-2178.
- Blank C.A., Anderson D.A., Beard M., Lemon S.M.** (2000). Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J Virol*, 74(14), 6476-6484
- Bofill-Mas S., Pina S., Girones R.** (2000). Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol*, 66(1):238-245.
- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.J., Wertheim-van Dillen P.M.E., van der Noordaa J.** (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28:495-503.
- Børsheim K.Y.** (1993). Native marine bacteriophages. *FEMS Microbiol Ecol*, 102:141-159.
- Bosch A., Lucena F., Girones R., Jofre J.** (1986). Survey of viral pollution in Besós River (Barcelona). *J Water Pollution Control*, 58(1):87-91.
- Brown E.A., Day S.P., Jansen R.W., Lemon S.M.** (1991). The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *J Virol*, 65(11):5828-5838.
- Bruguera M., Salleras L., Plans P., Vidal J., Navas E., Domínguez A., Batalla J., Taberner J.L., Espuñes J.** (1999). Cambios en la seroepidemiología de la infección por el virus de la hepatitis A en Cataluña en el período 1989-1996. Implicaciones para una nueva estrategia vacunal. *Med Clín (Barc)*, 112:406-408.
- Buti M., Jardí R., Cotrina M., Rodríguez-Frías F., Troonen H., Viladomiu L., Esteban J.I., Esteban R., Guardia J.** (1995). Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. *J Virol Meth*, 55:49-54.
- Cacopardo B., Russo R., Preiser W., Benanti F., Bracati G., Nunnari A.** (1997). Acute hepatitis E in Catania (Eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection*, 25(5):313-316.
- Carducci A., Arrighi S., Ruschi A.** (1995). Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant. *Lett Appl Microbiol*, 21(1):207-209.
- Center for Disease Control and Prevention.** (1993). Hepatitis E among US travelers, 1989-1992. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 42(1):1-4.
- Chalmers J.W.T., McMillan J.H.** (1995). An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. *Epidemiol Infect*, 115:163-167.
- Chapman N.M., Tracy S., Gauntt C.J., Fortmuller U.** (1990). Molecular detection and identification of enterovirus using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J Clin Microbiol*, 28(1):843-850.

- Chapron C.D., Ballester N.A., Fontine J.H., Frades C.N., Margolin A.B.** (2000). Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol*, 66(6):2520-2525.
- Chatterjee R., Tsarev S., Pillot J., Coursaget P., Emerson S.U., Purcell R.H.** (1997). African strains of hepatitis E virus that are distinct from Asian strains. *J Med Virol*, 53:139-144.
- Chomczynski P., Sacchi N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem*, 162(1):156-159.
- Clark J.M.** (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic polymerases. *Nucleic Acids Res*, 16:9677-9686.
- Clayson E.T., Innis B.L., Myint K.S.A., Narupiti S., Faughn D.W., Giri S., Ranabhat P., Shrestha M.P.** (1995). Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg*, 53(3):228-232.
- Cliver D.O.** (1984). Significance of water and the environment in the transmission of virus disease. *Monogr Virol*, 15:30-42.
- Cohen J.I.** (1989). Hepatitis A virus: insights from molecular biology. *Hepatology*, 9:889-895.
- Cohen J.I., Rosenblum B., Ticehurst J.R., Daemer R.J., Feinstone S.M., Purcell R.H.** (1987a). Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:2497-2501.
- Cohen J.I., Ticehurst J.R., Purcell R.H., Bucker-White A., Baroudy B.M.** (1987b). Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol*, 61(1):50-59.
- Committee on ECHO Viruses.** (1955). Enteric cytopathogenic human orphan (ECHO) viruses. *Science*, 122:1187-1188.
- Committee on the Enteroviruses.** (1957). National Foundation for Infantile Paralysis: The Enteroviruses. *Am J Publ Health*, 47:1556-1566.
- Corwin A.L., Tien N.T.K., Bounlu K., Winarno J., Putri M.P., Laras K., Larasati R.P., Sukri N., Endy T., Sulaiman H.A., Hyams K.C.** (1999). The unique riverine ecology of hepatitis E virus transmission in South-East Asia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93:255-260.
- Coulepis A.G., Locarnini S.A., Lehmann N.I., Gust I.D.** (1980). Detection of hepatitis A virus in the feces of patients with naturally acquired infections. *J Clin Microbiol*, 141(2):151-156.
- Coursaget P., Depril N., Buisson Y., Molinié C., Roué R.** (1994). Hepatitis type E in a French population: detection of anti-HEV by a synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Virol*, 145:51-57.
- Croci L., de Medici D., Scalfaro C., Fiore A., Divizia M., Donia D., Cosentino A.M., Moretti P., Costantini G.** (2000). Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. *J Appl Microbiol*, 88:293-298.

- Cromeans T., Sobsey M.D., Fields H.A.** (1987). Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J Med Virol*, 22:45-56.
- Dalldorf G., Sickles G.M.** 1948. An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science*, 108:61-62.
- Debartolomeis J., Cabelli V.J.** (1991). Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of male-specific bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*, 57(5):1301-1305.
- Debray D., Cullufi P., Devictor D., Fabre M., Bernard O.** (1997). Liver failure in children with hepatitis A. *Hepatology*, 26(4):1018-1022.
- Deinhardt F., Holmes A.W., Capps R.B., Popper H.** (1967). Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmosets monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesion. *Exp Med*, 125(4):673-688.
- Denoya C.D., Scodeller E.A., Vasquez C., La Torre J.L.** (1978a). Ribonuclease activities associated with purified foot and mouth disease virus. *Arch Virol*, 57:153-159.
- Denoya C.D., Scodeller E.A., Vasquez C., La Torre J.L.** (1978b). Foot and mouth disease virus. II. Endoribonuclease activity within purified virions. *Virology*, 89:67-74.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (1991). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1990. Notificacions numèriques. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, XII, N° 9: 32.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (1992). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1991. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, XIII, N° Ext. 55-58.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (1993). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1992. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, XIV, N° Ext. 131-134.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (1994). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1993. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, XV, N° Ext. 107-110.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (1995). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1994. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, XVI, N° Ext. 109-112.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (1996). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1995. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, XVII, N° Ext. 116-123.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (1997). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1996. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, XVIII, N° Ext. 143-150.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (1998). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1997. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, XIX, N° Ext. 175-182.
- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (1999). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1998. *Bulletí Epidemiològic de Catalunya*, XX, N° Ext. 126-134.

- Departament de Sanitat i Seguretat Social.** (2000). Resum de les malalties de declaració obligatòria a Catalunya durant l'any 1999. *Butlletí Epidemiològic de Catalunya*, XXI, N° 9, 125-133.
- DeSerres G., Lalibert Z.D.** (1997). Hepatitis A among workers from a waste water treatment plant during a small community outbreak. *Occup Environ Med*, 54:60-62.
- Di Girolamo R., Liston J., Matches J.** (1977). Ion bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. *Appl Environ Microbiol*, 33(1):19-25.
- Domínguez A., Vidal J., Bruguera M., Salleras LI.** (1995). Epidemiología de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 13(Supl. 1):50-61.
- Donati M.C., Fagan E.A., Harrison T.J.** (1997). Sequence analysis of full-length HEV clones derived directly from human liver in fulminant hepatitis E. In: M. Rizetto, R.H. Purcell, J.L. Gerin, G. Verme, editors. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Torino: Edizioni Minerva Medica. Pg.: 313-316.
- Doré W.J., Henshilwood K., Lees D.N.** (2000). Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 66(4):1280-1285.
- Dowdle W.R., Birmingham M.E.** (1997). The biologic principles of poliovirus eradication. *J Infect Dis*, 175(Supl. 1):S286-S292.
- Dupuy O., Mayaudon H., Bauduceau B., Perrier E., Nizou C., Pottier V., Buisson Y.** (1998). Nouveau cas d'hépatite aigüe de type E en France. *Rev Med Interne*, 19:448-449.
- Emerson S.U., Huang Y.K., Purcell R.H.** (1993). 2B and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaptation to cell culture. *Virology*, 184:475-480.
- Enders J.E., Bell J.A., Dingle J.H., Francia T., Hillemann R.J., Huebner R.J., Payne A.M.M.** (1956). "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, 124:119-120.
- Enriquez C.E., Hurst C.J., Gerba C.P.** (1995). Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Wat Res*, 29(11):2548-2553.
- Erker J.C., Desai S.M., Schlauder G.G., Dawson G.J., Mushahwar I.K.** (1999). A hepatitis E virus variant from United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol*, 80:681-690.
- Esteban J.I., Martell M., Carman W.F., Gómez J.** (1999). The impact of rapid evolution of the hepatitis viruses. In: *Origin and evolution of viruses*. Ed. E. Domingo, R. Webster, J. Holland. Academic Press, London, UK. Pg 345-376.
- Favorov M.O., Kosoy M.Y., Tsarev S.A., Childs J.E., Margolis H.S.** (2000). Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Infect Dis*, 181:449-455.
- Favorov M.O., Nazarova O., Margolis H.S.** (1998). Is hepatitis E an emerging zoonotic disease?. *Am J Trop Med Hyg*, 59:242.
- Feinstone S.M., Kapikian A.Z., Purcell R.H.** (1973). Detection by immune electron microscopy of virus-like antigen associated with acute illness. *Science*, 182:1026-1028.

- Felsenstein J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4):783-791.
- Felsenstein J.** (1993). PHYLIP inference package, version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Fengmin L., Hui Z., Yonghong Z., Xiaojie Z.** (1996). A preliminary study on immune response to hepatitis E virus DNA vaccine in mice. *Chinese Med J*, 109(12):919-921.
- Freshney R.I.** (1987). Culture of animal cells. A manual of basic technique. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Fujiwara K., Yokosuka O., Eheta T., Imazeki F., Sashio H., Miki M., Omata M.** (1997). Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *Hepatology*, 26(6):1634-1639.
- Funkhouser A.W., Purcell R.H., D'Hondt E., Emerson S.U.** (1994). Attenuated hepatitis A virus: genetic determinants of adaptation to growth in MRC-5 cells. *J Virol*, 68(1):148-157.
- Funkhouser A.W., Raychaudhuri G., Purcell R.H., Govindarajan S., Elkins R., Emerson S.U.** (1996). Progress toward the development of a genetically engineered attenuated Hepatitis A virus vaccine. *J Virol*, 70(11):7948-7957.
- Gantzer C., Dubois E., Crance J.-M., Billaudel S., Kopecka H., Schwartzbrod L., Pommepuy M., LeGuyader F.** (1998). Devenir des virus entériques en mer et influence des facteurs environnementaux. *Oceanologica Acta*, 21(6):983-992.
- Gantzer C., Maul A., Audic J.M., Schwartzbrod L.** (1998). Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Appl Environ Microbiol*, 64(11):4307-4312.
- Geldenhuis J.C., Pretorius P.D.** (1989). The occurrence of enteric viruses in polluted water, correlation to indicator organisms and factors influencing their numbers. *Wat Sci Tech*, 21(3):105-109.
- Gerba C.P., Haas C.N.** (1988). Assessment of risk associated with enteric viruses in contaminated drinking water. Chemical and biological characterization of sludges, sediments, dredge spoils and drilling muds, ASTM STP 976. Eds.: J.J. Lichtenberg, J.A. Winter, C.I. Weber, L. Fradkin. American Society for testing and materials, Philadelphia. Pg.: 489-494.
- Gerba C.P., Keswick B.H., DuPont H.L., Fields H.A.** (1984). Isolation of rotavirus and hepatitis A virus from drinking water. *Monogr Virol*, 15:119-125.
- Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P.** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51(5):1417-1423.
- Gilgen M., Germann D., Lüthy J., Hübner Ph.** (1997). Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int J Food Microbiol*, 37:189-199.
- Girones R., Allard A., Wadell G., Jofre J.** (1993). Application of the PCR to the detection of adenoviruses in polluted waters. *Wat Sci Tech*, 27:235-241.

- Girones R., Jofre J., Bosch A.** (1989a). Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *J Environ Qual*, 18(1):34-39.
- Girones R., Jofre J., Bosch A.** (1989b). Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can J Microbiol*, 35:1015-1021.
- Girones R., Puig M., Allard A., Lucena F., Wadell G., Jofre J.** (1995). Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters. *Wat Sci Tech*, 31:351-357.
- Gouvea V., Snellings N., Popek M.J., Longer C.F., Innis B.L.** (1998). Hepatitis E virus: complete genome sequence and phylogenetic analysis of a Nepali isolate. *Virus Res*, 57:21-26.
- Gow J.W., Behan W.M.H., Clements G.B., Woodall C., Riding M., Behan P.O.** (1991). Enteroviral RNA sequences detected by polymerase chain reaction in muscle of patients with postviral fatigue syndrome. *Br Med J*, 302:692-696.
- Grabow W.O.K.** (1996). Waterborne diseases: update on water quality assessment and control. *Water SA*, 22(2):193-202.
- Grabow W.O.K., Botma K.L., de Villiers J.C., Clay C.G., Erasmus B.** (1999). Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bull WHO*, 77(12):973-980.
- Grabow W.O.K., Coubrough P.** (1986). Practical direct plaque assay for colophages in 100-ml samples of drinking water. *Appl Environ Microbiol*, 52(3):430-433.
- Graff J., Normann A., Feinstone S.M., Flehmig B.** (1994). Nucleotide sequence of wild-type Hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *J Virol*, 68(1):548-554.
- Green M., Pina M.** (1963). Biochemical studies on adenovirus multiplication, IV. Isolation, purification and chemical analysis of adenovirus. *Virology*, 20:199-207.
- Häfliger D., Gilgen M., Lüthy J., Hübner Ph.** (1997). Seminested RT-PCR system for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int J Food Microbiol*, 37:27-36.
- Halim S., Ramsingh A.I.** (2000). A point mutation in VP1 of Coxsackievirus B4 alters antigenicity. *Virology*, 269:86-94.
- Halliday M.L., Kang L.-Y., Zhou T.-K., Hu M.-D., Pan Q.-C., Fu T.-S., Hu S.-L.** (1991). An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J Infect Dis*, 164:527-532.
- Havelaar A.H.** (1993). Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. *ASM News*, 59(12):614-619.
- Havelaar A.H., Van Olphen M., Drost Y.C.** (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organism for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol*, 59(9):2956-2962.
- Hejkal T.W., Keswick B., LaBelle R., Gerba C.P., Sanchez Y., Dreesman G., Hafkin B., Melnick J.L.** (1982). Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. *J Am Water Works Assoc*, 74:318-321.

- Hilleman M.R., Werner J.H.** (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med*, 85:183-188.
- Hollinger F.B., Ticehurst J.** (1990). Hepatitis A virus. In: Virology, Chapter 23. Second Edition. Ed: B.N. Fields, D.M. Knipe et al. Raven Press, Ltd., New York. Pg.: 631-65.
- Hopkins R.S., Gaspard G.B., Williams F.P., Karlin R.J., Cukor G., Blacklow N.R.** (1984). A community waterborne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. *Am J Publ Health*, 74:263-265.
- Hovi T., Stenvik M., Rosenlew M.** (1996). Relative abundance of enteroviruses serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. *Epidemiol Infect*, 116:91-97.
- Hsieh S., Meng X., Wu Y., Liu S., Tam A.W., Lin D., Liaw Y.** (1999). Identity of a novel swine hepatitis E virus in taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*, 37(12):3828-3834.
- Huang C., Nguyen D., Fernandez J., Yun K.Y., Fry K.E., Bradley D.W., Tam A.W., Reyes G.R.** (1992). Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology*, 191:550-558.
- Huang R., Nakazono N., Ishii K., Li D., Kawamata O., Kawaguchi R., Tsukada Y.** (1995). I.Hepatitis E virus (87A strain) propagated in A549 cells. *J Med Virol*, 47:299-302.
- Hunter P.R.** (1997). Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology. Ed.: J. Wiley & Sons.
- Hurst C.J.** (1991). Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking water treatment process. *Bull WHO*, 69(1):113-119.
- Hyypiä T., Auvinen P., Maaronen M.** (1989). Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J Gen Virol*, 70:3261-3268.
- Hyypiä T., Horsnell C., Maaronen M., Khan M., Kalkkinen N., Auvinen P., Kinnunen L., Stanway G.** (1992) A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:8847-8851.
- IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology.** (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Wat Res*, 25(5):529-545.
- Inoue K., Yoshida M., Yotsuyanagi H., Otsuka T., Sekiyama K., Fujita R.** (1996). Chronic hepatitis A with persistent viral replication. *J Med Virol*, 50:322-324.
- Irving L.G., Smith F.A.** (1981). One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl Environ Microbiol*, 41(1):51-59.
- Jänisch T., Preiser W., Berger A., Mikulicz U., Thoma B., Hampl H., Doerr H.W.** (1997). Emerging viral pathogens in long-term expatriates (I): Hepatitis E virus. *Trop Med Int Health*, 2(9):885-891.
- Jansen R.W., Siegl G., Lemon S.M.** (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:2867-2871.

- Jardí R., Buti M., Rodríguez-Frías F., Esteban R.** (1993). Hepatitis E infection in acute sporadic hepatitis in Spain. *The Lancet*, 341(8856):1355-1356.
- Jaykus L., DeLeon R., Sobsey M.D.** (1996). A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 62(6):2074-2080.
- Jenkins O., Booth J.D., Minor P.D., Almond J.W.** (1987). The complete nucleotide sequence of coxsackievirus B4 and its comparison to other members of the Picornaviridae. *J Gen Virol*, 68:1835-1848.
- Jiang S.C., Paul J.H.** (1995). Viral contribution to dissolved DNA in the marine environment as determined by the differential centrifugation and kingdom probing. *Appl Environ Microbiol*, 61(1):317-325.
- Jofre J., Bosch A., Lucena F., Girones R., Tartera C.** (1986). Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. *Wat Sci Tech*, 18(10):167-173.
- Jofre J., Ollé E., Ribas F., Vidal A., Lucena F.** (1995). Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Appl Environ Microbiol*, 61(9):3227-3231.
- Jothikumar N., Aparna K., Kamatchiammal S., Paulmurugan R., Saravanadevi S., Khanna P.** (1993). Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 59(8):2558-2562.
- Kabrane-Lazizi Y., Fine J.B., Elm J., Glass G.E., Higa H., Diwan A., Gibbs C.J., Meng X., Emerson S.U., Purcell R.H.** (1999). Evidence for a widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg*, 61(2):331-335.
- Kaplan G., Totsuka A., Thompson P., Akatsuka T., Moritsugu Y., Feinstone S.M.** (1996). Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO Journal*, 15(16):4282-4296.
- Kaplan J.E., Goodman R.A., Schonberger L.B., Lippy E.C., Gary W.** (1982). Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis*, 146(2):190-197.
- Katzenelson E., Mills D.** (1984). Contamination of vegetables with animal viruses via the roots. *Monogr Virol*, 15:216-220.
- Kazachkov Y.A., Balayan M.S., Ivannikova T.A., Panina L.I., Orlova T.M., Zamyatina N.A., Kusov Y.Y.** (1992). Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol*, 127:399-402.
- Khudyakov Y.E., Khudyakova N.S., Fields H.A., Jue D., Starling C., Favorov M.O., Krawczynski K., Polish L., Mast E., Margolis H.** (1993). Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology*, 194:89-96.
- Khudyakov Y.E., Khudyakova N.S., Jue D.L., Wells T.W., Padhya N., Fields H.A.** (1994). Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in Burmese and Mexican strains of hepatitis E virus. *J Gen Virol*, 75:641-646.
- Kitchin P.A., Bootman J.S.** (1993). Quality control of the polymerase chain reaction. *Rev Med Virol*, 3:107-114.



- Koff R.S.** (1998). Hepatitis A. *The Lancet*, 341:1643-1649.
- Koksal I., Aydin K., Kardes B., Turgut H., Murt F.** (1994). The role of hepatitis E virus in acute sporadic non-A, non-B hepatitis. *Infection*, 22(6):407-410.
- Kolakofsky D., Altman S.** (1978). Endoribonuclease activity associated with animal RNA viruses. *J Virol*, 25(1):274-284.
- Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A., Rozanov N.N., Reyes G.R., Bradley D.W.** (1992). Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:8259-8263.
- Kopecka H.** (1999). Echoviruses (*Picornaviridae*). In: Encyclopedia of Virology. Second Edition. Ed. A. Granoff, R.G. Webster. Academic Press. London, UK. Pg.: 411-417.
- Kopecka H., Dubrou S., Prevot J., Marechal J., López-Pila J.M.** (1993). Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 59(4):1213-1219.
- Krawczynski K.** (1993). Hepatitis E. *Hepatology*, 17:932-941.
- Krikelis V., Spyrou N., Marloulatos P., Serie C.** (1985). Seasonal distribution of enteroviruses and adenoviruses in domestic sewage. *Can J Microbiol*, 31:24-25.
- Kwo P.Y., Schlauder G.G., Carpenter H.A., Murphy P.J., Rosenblatt J.E., Dawson G.J., Mast E.E., Krawczynski K., Balan V.** (1997). Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc*, 72:1133-1136.
- Landry E.F., Vaughn J.M., Vicale T.J., Mann R.** (1982). Inefficient accumulation of low levels of monodispersed and feces-associated poliovirus in oysters. *Appl Environ Microbiol*, 44(6):1362-1369.
- Lasobras J.** (1997). Detección de bacteriofagos de bacterias entéricas asociados a sólidos en ambiente. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.
- Lees D.** (2000). Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol*, 59:81-116.
- Lees D.N., Henshilwood K., Doré W.J.** (1994). Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl Environ Microbiol*, 60(8):2999-3005.
- LeGuyader F., Neill F.H., Estes M.K., Monroe S.S., Ando T., Atmar R.L.** (1996). Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl Environ Microbiol*, 62(11):4268-4272.
- Lemon S.M., Chao S., Jansen R.W., Binn L.N., LeDuc J.W.** (1987). Genomic heterogeneity among human and nonhuman strains of hepatitis A virus. *J Virol*, 61(3):735-742.
- Lemon S.M., Jansen R.W., Brown E.A.** (1992). Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine*, 10(Supl. 1):S40-S44.

- Lemon S.M., Murphy P.C., Shields P.A., Ping L., Feinstone S.M., Cromeans T., Jansen R.W.** (1991). Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol*, 65(4):2056-2065.
- Li Q.-G.** (1988). Molecular epidemiology and genetic variability of certain human adenoviruses. Tesis Doctoral.
- Limsawat S., Ohgaki S.** (1997). Fate of liberated viral RNA in wastewater determined by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 63(7):2932-2933.
- Linemeyer D.L., Menke J.G., Martin-Gallardo A., Hughes J.V., Young A., Mitra S.W.** (1985). Molecular cloning and partial sequencing of hepatitis A viral cDNA. *J Virol*, 54(2):247-255.
- Lipp E.K., Rose J.B.** (1997). The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 16(2):620-640.
- Lopalco P.L., Salleras L., Barbuti S., Germinario C., Bruguera M., Buti M., Domínguez A.** (2001). Hepatitis A and B in children and adolescents - what can we learn from Puglia (Italy) and Catalonia (Spain)?. *Vaccine*, 19:470-474.
- López L.** (1987). Problemática sanitaria del mejillón. *Alimentaria*, Oct.:29-34.
- Lucena F., Araujo R., Jofre J.** (1996). Usefulness of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* as index microorganisms of remote faecal pollution. *Wat Res*, 30(11):2812-2816.
- Lucena F., Bosch A., Ripoll J., Jofre J.** (1988). Fecal pollution in Llobregat River: interrelationships of viral, bacterial, and physico-chemical parameters. *Water, Air and Soil Pollution*, 39:15-25.
- Lucena F., Divizia M., Biziagos E., Crance J.M., Deloince R.** (1991). Extraction et concentration des virus des milieux hydriques. In: *Virologie des milieux hydriques*. Ed.: Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- Lucena F., Lasobras J., McIntosh D., Forcadell M., Jofre J.** (1994). Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Appl Environ Microbiol*, 60:2272-2277.
- Lucena F., Schwartzbrod L., Bosch A.** (1986). The effect of a mass poliomyelitis vaccination program on the occurrence of enteovirus in seawater. *Zbl Bact Hyg B*, 183:67-69.
- Lukasik J., Scott T.M., Andryshak D., Farrah S.R.** (2000). Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Appl Environ Microbiol*, 66(7):2914-2920.
- Ma J., Naranjo J., Gerba C.P.** (1994). Evaluation of MK filters for recovery of enteoviruses from tap water. *Appl Environ Microbiol*, 60(6):1974-1977.
- Mandel B.** (1971). Characterization of type 1 poliovirus by electrophoretic analysis. *Virology*, 4:554-568.
- Maneerat Y., Clayson E.T., Myint K.S.A., Young G.D., Innis B.L.** (1996). Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol*, 48:121-128.
- Maranger R., Bird D.** (1995). Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Mar Ecol Prog Ser*, 121:217-226.

- Maroto M.C., Bernal M.C.** (1995). Hepatitis por virus A. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 13(Supl. 1):16-21.
- Martín J., Ferguson G.L., Wood D.J., Minor P.D.** (2000). The vaccine origin of the 1968 epidemic of type 3 poliomyelitis in Poland. *Virology*, 278:42-49.
- Mast E.E., Krawczynski K.** (1996). Hepatitis E: an overview. *Annu Rev Med*, 47:257-266.
- Mateos M.L., Camarero C., Lasa E., Teruel J.L., Mir N., Baquero F.** (1999). Hepatitis E virus: relevance in blood donors and risk groups. *Vox Sang*, 76:78-80.
- McCrudden R., O'Connell S., Farrant T., Beaton S., Iredale J.P. Fine D.** (2000). Sporadic acute hepatitis E in the United Kingdom: an underdiagnosed phenomenon?. *Gut*, 46:732-733.
- Melnick J.L.** (1984). Viruses in the water environment: a review. *Monogr Virol*, 15:1-16.
- Melnick J.L.** (1995). History and epidemiology of Hepatitis A virus. *J Infect Dis*, 171(Supl. 1):S2-8.
- Melnick J.L.** (1997). Poliovirus and other enterovirus. In: *Viral infections of humans. Epidemiology and control*, 4<sup>th</sup> Ed.: A.S. Evans, R.A. Kaslow. Plenum Publishing Corporation, New York, NY.
- Melnick J.L., Gerba C.P., Wallis C.** (1978). Viruses in water. *Bull WHO*, 56:499-508.
- Meng J., Cong M., Dai X., Pillot J., Purdy M.A., Fields H.A., Khudyakov Y.** (1999). Primary structure of open reading frame 2 and 3 of the hepatitis E virus isolated from Morocco. *J Med Virol*, 57:126-133.
- Meng X.J.** (2000). Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis?. *J Hepatol*, 33(5):842-845.
- Meng X.J., Halbur P.G., Haynes J.S., Tsareva T.S., Bruna J.D., Royer R.L., Purcell R.H.** (1998a). Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol*, 143:1405-1415.
- Meng X.J., Halbur P.G., Shapiro M.S., Govindarajan S., Bruna J.D., Mushahwar I.K.** (1998b). Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virology*, 72(12):9714-9721.
- Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S., Thacker B.J., Emerson S.U.** (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:9860-9865.
- Mesquita M.M.F.** (1988). Effect of seawater contamination level and exposure period on the bacterial and viral accumulation and elimination processes by *Mytilus edulis*. *Wat Sci Tech*, 20(11-12):265-270.
- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K.** (1995). Environmental Virology: from detection of virus in sewage and water isolation to identification by Molecular Biology - A trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol*, 49:461-487.
- Metcalf T.G., Moulton E., Eckerson D.** (1980). Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 39(1):141-152.

- Metcalf T.G., Mullin B., Eckerson D., Moulton E., Larkin E.P.** (1979). Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft shelled clam, *Mya arenaria*. *Appl Environ Microbiol*, 38:275-282.
- Minor P.D.** (2000). Eradication of polio by vaccination. *Virology*, 268:231-232.
- Mitchell J.R., Presnell M.W., Akin E., Cummins J.M., Liu O.C.** (1966). Accumulation and elimination of poliovirus by eastern oyster. *Am J Epidemiol*, 84:40-50.
- Moore A.E., Sabachewsky L., Toolan H.W.** (1955). Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res*, 15:598-602.
- Moore M., Katona P., Kaplan J.E., Schonberger L.B., Hatch M.H.** (1982). Poliomyelitis in the United States, 1969-1981. *J Infect Dis*, 146(4):558-563.
- Mullis K.B., Faloona F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155:335-350.
- Muniain-Mujika I., Girones R., Lucena F.** (2000). Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. *J Virol Meth*, 89:109-118.
- Muscillo M., Aulicino F.A., Patti A.M., Orsini P., Volterra L., Fara G.M.** (1994). Molecular techniques for the identification of enteric viruses in marine waters. *Wat Res*, 28(1):1-7.
- Nainan O.V., Margolis H.S., Robertson B.H., Balayan M., Brinton, M.A.** (1991). Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J Gen Virol*, 72:1685-1689.
- Najarian R., Caput D., Gee W., Potter S.J., Renard A., Merryweather J., Van Nest G., Dina D.** (1985). Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:2627-2631.
- Nasser A.M., Tchorch Y., Fattal B.** (1993). Comparative survival of *E. coli*, F+ bacteriophages, HAV and poliovirus 1 in wastewater and groundwater. *Wat Sci Technol*, 27(3-4):401-407.
- Niemczynowicz J.** (1997). The water profession and Agenda 21. *WQI*, March/April 9-11.
- Nüesch J.P.F., Chastonay D., Siegl G.** (1989). Detection of defective genomes in hepatitis A virus particles present in clinical specimens. *J Gen Virol*, 70:3475-3480.
- Organización Panamericana de la Salud.** (1987). Guías para la Calidad del Agua Potable. Volumen 2. Criterios relativos a la salud y otra información de base. Organización Mundial de la Salud. Publicación Científica n°506. Washington D.C.
- Oshima K.H., Evans-Strickfaden T.T., Highsmith A.K., Ades E.W.** (1995). The removal of phages T1 and PP7, and poliovirus from fluids with hollow-fiber ultrafilters with molecular weight cut-offs of 50000, 13000 and 6000. *Can J Microbiol*, 41:316-322.
- Page R.D.M.** (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*, 12:357-358.

- Papaevangelou G.** (1992). Epidemiology of hepatitis A in Mediterranean countries. *Vaccine*, 10(Supl. 1):63-66.
- Papageorgiou G.T., Mocé-Llivina L., Christodoulou C.G., Lucena F., Akkelidou D., Ioannou E., Jofre J.** (2000). A simple methodological approach for counting and identifying culturable viruses adsorbed to cellulose nitrate membrane filters. *Appl Environ Microbiol*, 66(1):194-198.
- Patti A.M., Aulicino F.A., Santi A.L., Muscillo M., Orsini P., Bellucci C., La Rosa G., Mastroeni I., Volterra L.** (1996). Enteric virus pollution of Tyrrhenian areas. *Water, Air and Soil Pollution*, 88:261-267.
- Paul A.V., Tada H., Von der Helm K., Wissel T., Kiehn R., Wimmer E., Deinhardt F.** (1987). The entire nucleotide sequence of the genome of human hepatitis A virus (isolate MBB). *Virus Res*, 8:153-171.
- Paul D.A., Knigge M.F., Ritter A., Gutiérrez R., Pilot-Matias T., Chau K.H., Dawson G.J.** (1994). Determination of Hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion proteins and synthetic peptides. *J Infect Dis*, 169:801-806.
- Peterson D.A., Hurley T.R., Hoff J.C., Wolfe L.G.** (1983). Effect of chlorine treatment on infectivity of hepatitis A virus. *Appl Environ Microbiol*, 45(1):223-227.
- Petterson U.** (1984). Structural and nonstructural adenovirus proteins. In: *The Adenovirus*. Ed.: H.S. Ginsberg. Plenum Press, New York and London.
- Pina S., Buti M., Cotrina M., Piella J., Girones R.** (2000). HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol*, 33(5):826-833.
- Pina S., Creus A., González N., Girones R., Felip M., Sommaruga R.** (1998a). Abundance, morphology and distribution of planktonic virus-like particles in two high-mountain lakes. *J Plank Res*, 20(12):2413-2421.
- Pina S., Jofre J., Emerson S.U., Purcell R.H., Girones R.** (1998b). Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol*, 64(11):4485-4488.
- Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre J., Girones R.** (1998c). Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol*, 64(9):3376-3382.
- Pirtle E.C., Beran G.W.** (1991). Virus survival in the environment. *Rev Sci Tech Off Int Ep*, 10(3):733-748.
- Polish L.B., Robertson B.H., Khanna B., Krawczynski K., Spelbring J., Olson F., Shapiro C.N.** (1999). Excretion of hepatitis A virus (HAV) in adults: comparison of immunologic and molecular detection method and relationship between HAV positivity and infectivity in tamarins. *J Clin Microbiol*, 37(11):3615-3617.
- Power U.F., Collins J.K.** (1989). Differential depuration of poliovirus, *Escherichia coli* and a coliphage by the common mussel *Mytilus edulis*. *Appl Environ Microbiol*, 55:1386-1390.
- Power U.F., Collins J.K.** (1990). Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. *Appl Environ Microbiol*, 56:803-807.

- Pringle C.R.** (1999). Virus Taxonomy-1999. The Universal System of Virus Taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of viruses during 1998. *Arch Virol*, 144(2):421-429.
- Provost P.J., Hilleman M.R.** (1979). Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*, 160(2):213-221.
- Psichogiou M., Tassopoulos N., Papatheodoridis G., Tzala L., Klarmann R., Witteler H., Troonen H., Hatzakis A.** (1994). The role of hepatitis E virus (HEV) infection in acute non-A, non-B hepatitis in Greece. *Hepatology*.
- Puig A.** (1998). Influència de l'hoste en la recuperació de bacteriòfags de *Bacteroides fragilis* en el medi ambient. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.
- Puig A., Jofre J., Araujo R.** (1997). Bacteriophages infecting various *Bacteroides fragilis* strains differ in their capacity to distinguish human from animal faecal pollution. *Wat Sci Tech*, 35:11-12.
- Puig M.** (1998). Caracterització molecular dels bacteriòfags de *Bacteroides fragilis*, proposats com a possibles indicadors de contaminació fecal vírica d'origen humà. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.
- Puig M., Jofre J., Lucena F., Allard A., Wadell G., Girones R.** (1994). Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol*, 60(8):2963-2970.
- Puig M., Pina S., Lucena F., Jofre J., Girones R.** (2000). Description of a DNA amplification procedure for the detection of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* HSP40 in environmental samples. *J Virol Meth*, 89:159-166.
- Purcell R.H.** (1994). Hepatitis viruses: changing patterns of human disease *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:2401-2406.
- Purcell R.H.** (1996). Hepatitis E virus. In: *Virology*, 3rd Ed. Fields B.N., Knipe D.M. Howley P.M., et al. Ed. Lippincott. Raven Publishers, Philadelphia. Pg.: 2831-2843.
- Rab M.A., Bile M.K., Mubarik M.M., Asghar H., Sami Z., Siddiqi S., Dil A.S., Barzgar M.A., Chaudhry M.A., Burney M.I.** (1997). Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan: a common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. *Am J Trop Med Hyg*, 57(2):151-157.
- Raimondo G., Longo G., Caredda F., Saracco F., Rizzetto M.** (1986). Prolonged, polyphasic infection with hepatitis A. *J Infect Dis*, 153(1):172-173.
- Rekosh D.M.K., Rusell W.C., Bellet A.J.D., Robinson A.J.** (1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell*, 11:283-295.
- Rico-Hesse R., Pallansch M.A., Nottay B.K., Kew O.M.** (1987). Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology*, 160:311-322.
- Robbins F.C., de Quadros C.A.** (1997). Certification of the eradication of indigenous transmission of wild poliovirus in the Americas. *J Infect Dis*, 175(Supl. 1):S281-S285.

- Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B., Totsuka A., Nainan O.V., Siegl G., Widell A., Margolis H.S., Isomura S., Ito K., Ishizu T., Moritsugu Y., Lemon S.M.** (1992). Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol*, 73:1365-1377.
- Robertson B.H., Khanna B., Nainan O.V., Margolis H.S.** (1991). Epidemiologic patterns of wild-type hepatitis A virus determined by genetic variation. *J Infect Dis*, 163:286-292.
- Romero-Gómez M., Suárez-García E., Vargas J., Castro-Fernández M.** (1997). Un caso de hepatitis E aguda en Sevilla. *Gastroenterol Hepatol*, 20(4):217-218.
- Roseblum L.S., Villarino M.E., Nainan O.V., Melish M.E., Hadler S.C., Pinsky P.P., Jarvis W.R., Ott C.E., Margolis H.S.** (1991). Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants. *J Infect Dis*, 164:476-482.
- Rosenthal P.** (1998). Hepatitis A vaccine: current indications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 27(1):111-113.
- Rotbart H.A.** (1990). Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J Clin Microbiol*, 28(3):438-442.
- Rowe W.P., Huebner R.J., Gillmore L.K., Parrot R.H., Ward T.G.** (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 84:570.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Tápias J.M.** (1995). Virus de la hepatitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 13(Supl. 1):3-15.
- Santti J., Hyypiä T., Kinnunen L., Salminen M.** (1999). Evidence of recombination among Enteroviruses. *J Virol*, 73(10):8741-8749.
- Schaper M., Jofre J.** (2000). Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *J Virol Meth*, 89:1-10.
- Schiff G.M., Stefanovic G.M., Young B., Pennekamp J.K.** (1984). Minimum human infectious dose of enteric virus (Echovirus-12) in drinking water. *Monogr Virol*, 15:222-228.
- Schlauder G.G., Dawson G.J., Erker J.C., Kwo P.Y., Knigge M.K., Smalley D.L., Rosenblatt J.E., Desai S.M., Mushahwar I.K.** (1998). The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol*, 79:447-456.
- Schlauder G.G., Desai S.M., Zanetti A.R., Tassopoulos N.C., Mushahwar I.K.** (1999). Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol*, 57:243-251.
- Schlauder G.G., Frider B., Sookoian S., Castaño G.C., Mushahwar I.K.** (2000). Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J Infect Dis*, 182:294-297.
- Schmitz H., Wigand R., Heinrich W.** (1983). Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol*, 117(4):455-466.

- Schulman A.N., Dienstang J.L., Jackson D.R.** (1976). Hepatitis A antigen particles in liver, bile, and stool of chimpanzees. *J Infect Dis*, 134:80-84.
- Schwab K.J., De Leon R., Sobsey M.D.** (1995). Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, 61(2):531-537.
- Schwab K.J., Neill F.H., Estes M.K., Metcalf T.G., Atmar R.L.** (1998). Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J Food Prot*, 61(12):1674-1680.
- Schwartzbrod L.** (1991). *Virologie des milieux hydriques*. Tec & Doc - Lavoisier, Paris.
- Schwartzbrod L.** (1995). Level of viral contamination in aquatic environments. In: Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture and aquaculture. World Health Organization. Geneva.
- Scodeller E.A., Lebendiker M.A., Dubra M.S., Crespo O.A., Basarab O., La Torre J.L., Vasquez.** (1984). Inactivation of foot-and-mouth disease virus vaccine strains by activation of virus-associated endonuclease. *J Gen Virol*, 65:1567-1573.
- Seidel K.M., Goyal S.M., Rao V.C., Melnick J.L.** (1983). Concentration of rotavirus and enterovirus from blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Appl Environ Microbiol*, 46(6):1293-1296.
- Sellwood J., Dadswell J.V., Slade J.S.** (1981). Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community. *J Hyg*, 86:217-225.
- Sellwood J., Litton P.A., McDermott J., Clewley J.P.** (1995). Studies on wild and vaccine strains of poliovirus isolated from water and sewage. *Wat Sci Tech*, 31(5-6):317-321.
- Severini G.M., Mestroni L., Falaschi A., Camerini F., Giacca M.** (1993). Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J Clin Microbiol*, 31(5):1345-1349.
- Sharp I.R., Wadell G.** (1995). Adenoviruses. In: Principles and Practice of Clinical Virology. Ed.: A.J. Zuckerman, J.E. Banatvala, J.R. Pattison. J. Wiley & Sons. Cap. 7. Pg.: 287-308.
- Shields P.A., Farrah S.R.** (1983). Influence of salts on electrostatic interactions between poliovirus and membrane filters. *Appl Environ Microbiol*, 45:526-531.
- Shinagawa M., Iida Y., Matsuda A., Tsukiyama T., Sato G.** (1987). Phylogenetic relationships between adenoviruses as inferred from nucleotide sequences of inverted terminal repeats. *Gene*, 55:85-93.
- Siegl G., Weitz M.** (1993). Pathogenesis of hepatitis A: persistent viral infection as basis of an acute disease?. *Microbial Path*, 14:1-8.
- Sinton L.W., Finlay R.K., Hannah D.J.** (1998). Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32:323-348.
- Sinton L.W., Finlay R.K., Reid A.J.** (1996). A simple membrane filtration-elution method for the enumeration of F-RNA, F-DNA and somatic coliphages in 100-ml water samples. *J Microbiol Meth*, 25:257-269.



- Sobsey M.D., Battigelli D.A., Shin G.A., Newland S.** (1998). RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Wat Sci Tech*, 38(12):91-94.
- Sobsey M.D., Carrick R.J., Jensen H.R.** (1978). Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. *Appl Environ Microbiol*, 36(1):121-128
- Sobsey M.D., Glass J.S.** (1980). Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl Environ Microbiol*, 40(2):201-210.
- Sobsey M.D., Jones B.L.** (1979). Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl Environ Microbiol*, 37(3):588-595.
- Sobsey M.D., Shields P.A., Hauchman F.S., Davis A.L., Rullman V.A., Bosch A.** (1988). Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples. In: *Viral hepatitis and liver disease*. Ed.: A.J. Zuckerman, New York. Alan R. Liss. Pg. 121-124.
- Soule H., Genoulaz O., Gratacap-Cavallier B., Chevallier P., Liu J.X., Seigneurin J.M.** (2000). Ultrafiltration and reverse-transcription polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Wat Res*, 34(3):1063-1067.
- Stanway G., Hyypiä T.** (1999). Parechoviruses. *J Virol*, 73(7):5249-5254.
- Stanway G., Kalkkinen N., Roivainen M., Ghazi F., Khan M., Smyth M., Meurman O., Hyypiä T.** (1994). Molecular and biological characteristics of Echovirus 22 a representative of a new Picornavirus group. *J Virol*, 68(12):8232-8238. .
- Starnbach M.N., Falkow S., Tomkins L.S.** (1989). Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol*. 27. 1257-1261.
- Sverdlov S.D., Tsarev S.A., Markova S.V., Vasilenko S.K., Chizhikov V.E., Petrov N.A., Kusov Y.Y., Natashenko T.A., Balayan, M.S.** (1987). Cloning and expression of hepatitis A virus genome in *E. coli* cells. *Mol Gen Microbiol Virol*, 6:129-133.
- Tam A.W., Smith M.M., Guerra M.M., Huang C.C., Bradley D.W., Fry K.E., Reyes G.R.** (1991). Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 185:120-131.
- Tam A.W., White R., Reed E., Short M., Zhang Y., Fuerst T.R., Landford R.E.** (1996). In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology*, 215:1-9.
- Tani N., Dohi Y., Kurumatani N., Yonemasu K.** (1995). Seasonal distribution of adenoviruses, enteroviruses and reoviruses in urban river water. *Microbiol Immunol*, 39(8):577-580.
- Tani N., Shimamoto K., Ichimura K., Nishii Y., Tomita S., Oda Y.** (1992). Enteric virus levels in river water. *Wat Res*, 26(1):45-48.
- Tartera C., Araujo R., Michel T., Jofre J.** (1992). Culture and decontamination methods affecting enumeration of phages infecting *Bacteroides fragilis* in sewage. *Appl Environ Microbiol*, 58(8):2670-2673.
- Tartera C., Jofre J.** (1987). Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Appl Environ Microbiol*, 53(7):1632-1637.

- Thomas D.L., Yarbough P.O., Vlahov D., Tsarev S.A., Nelson K.E., Saah A.J., Purcell R.H.** (1997). Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J Clin Microbiol*, 35(5):1244-1247.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrixchoice. *Nucleic Acids Res*, 22:4673-4680.
- Ticehurst J.R., Racaniello V.R., Baroudy B.M., Baltimore D., Purcell R.H., Feinstone S.M.** (1983). Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:5885-5889.
- Tien N.T., Clayson H.T., Khiem H.B., Sac P.K., Corwin A.L., Myint K.S. et al.** (1997). Detection of immunoglobulin G to the hepatitis E virus among several animal species in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*, 57:211.
- Tierney J.T., Sullivan R., Larkin E.** (1977). Persistence of poliovirus in soil and vegetables grown in soil previously flooded with inoculated sewage sludge or effluents. *Appl Environ Microbiol*, 33:104-109.
- Tierney J.T., Sullivan R., Peeler J.T., Larkin E.P.** (1982). Persistence of poliovirus in shellstock and shucked oysters stored at refrigeration temperature. *J Food Prot*, 45:1135-1137.
- Torné J., Miralles R., Tomás S., Saballs P.** (1988). Typhoid fever and acute non-A non-B hepatitis after shellfish consumption. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 7(4):581-582.
- Tsarev S.A., Binn L.N., Gomatos P.J., Arthur R.R., Monier M.K., Van Cuyck-Gandre H.** (1999). Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J Med Virol*, 57:68-74.
- Tsarev S.A., Emerson S.U., Balayan M.S., Ticehurst J., Purcell R.H.** (1991). Simian hepatitis A virus (HAV) strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *J Gen Virol*, 72:1677-1683.
- Tsarev S.A., Emerson S.U., Reyes G.R., Tsareva T.S., Legters L.J., Malik I.A., Iqbal M., Purcell R.H.** (1992). Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:559-563.
- Tsarev S.A., Tsareva T.S., Emerson S.U., Yarbough P.O., Legters L.J., Moskal T., Purcell R.H.** (1994). Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys. *J Med Virol*, 43:135-142.
- Tsarev S.A., Emerson S.U., Tsareva T.S., Yarbough P.O., Lewis M., Govindajaran S., Reyes G.R., Shapiro M., Purcell.** (1993a). Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J Infect Dis*, 167:1302-1306.
- Tsarev S.A., Tsareva T.S., Emerson S.U., Kapikian A.Z., Ticehurst J., London W.** (1993b). ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading frame-2 protein expressed in insect cells: identificatio. *J Infect Dis*, 168:369-378.
- Van Loon A.M., Cleator G.C., Ras A.** (1999). External quality assesment of enterovirus detection and typing. *Bull WHO*, 77(3):217-223.

- Vantarakis A., Papapetropoulou M.** (1998). Detection of adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. *Wat Res*, 32(8):2365-2372.
- Vantarakis A., Papapetropoulou M.** (1999). Detection of enteroviruses, adenoviruses and hepatitis A viruses in raw sewage and treated effluents by nested-PCR. *Water, Air and Soil Pollution*, 114:85-93.
- Vidal A., Lucena F., Arza I., Valero F., Jofre J.** (1997). Análisis de enterovirus en aguas superficiales. Control durante el proceso de potabilización. *Tecnología del Agua*, 170:38-48.
- Vogelstein B., Gillespie D.** (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:615-619.
- Wadell, G.** (1984). Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 110:191-220.
- Wallace B.J., Guzewich J.J., Cambridge M., Altekruze S., Morse D.L.** (1999). Seafood-associated disease outbreaks in New York, 1980-1994. *Am J Prev Med*, 17(1):48-51.
- Walter R., Dobberkau H.J., Bartelt W., Diener W., Härtel I., Heinrich U., Müller U., Rüdiger S., Stettinisch B.** (1982). Long-term study of virus contamination of surface water in the German Democratic Republic. *Bull WHO*, 60(5):789-795.
- Wang C.H., Flehmig B., Moeckli R.** (1993). Transmission of hepatitis E virus by transfusion?. *The Lancet*, 341(8848):825-826.
- Wang Y., Ling R., Erker J.C., Zhang H., Li H., Desai S., Mushahwar I.K., Harrison T.J.** (1999). A diverge genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol*, 80:169-177.
- Wildy P.** (1971). Classification and nomenclature of viruses. First report of International Committee on Nomenclature of Viruses. *Monogr Virol*, 5.
- Wilson I.G.** (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, 63(10):3741-3751.
- World Health Organization.** (1979). Report of WHO Scientific Group. Human viruses in water, wastewater and soil. Technical Report series n° 639. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization.** (2000). Hepatitis A vaccines *Weekly Epidemiological Record*, 75(5):38-44.
- Worm H.C., Wurzer H., Frösner G.** (1998). Sporadic hepatitis E in Austria. *New Engl J Med*, 339(21):1554-1555.
- Wu J.-C., Chen C.-M., Chiang T.-Y., Sheen I.-J., Chen J.-Y., Tsai W.-H., Huang Y.-H., Lee S.-D.** (2000). Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J Med Virol*, 60:166-171.
- Wu J.-C., Sheen I.-J., Chiang T.-Y., Sheng W.-Y., Wang Y.-J., Chan C.-Y., Lee S.-D.** (1998). The impact of travelling to endemic areas on the spread of hepatitis E virus infection: epidemiological and molecular analyses. *Hepatology*, 27(5):1415-1420.

- Wyer M.D., Fleisher J.M., Gough J., Kay D., Merret H.** (1995). An investigation into parametric relationships between enterovirus and faecal indicator organisms in the coastal waters of England and Wales. *Wat Res*, 29(8):1863-1868.
- Yamada O., Matsumoto T., Nakashima M., Hagari S., Kamahora T., Ueyama H., Kishi Y., Uemura H., Kurimura T.** (1990). A new method for extracting DNA and RNA for polymerase chain reaction. *J Virol Meth*, 27:203-210.
- Yarborough P.O.** (1997). Advances in hepatitis E. *Curr Opinion Infect Dis*, 10:398-401.
- Yin S., Purcell R.H., Emerson S.U.** (1994). A new chinese isolate of hepatitis E virus: comparison with strains recovered from different geographical regions. *Virus Genes*, 9:23-32.
- Yin S., Tsarev S.A., Purcell R.H., Emerson S.U.** (1993). Partial sequence comparison of eight new Chinese strains of hepatitis E virus suggests the genome sequence is relatively stable. *J Med Virol*, 41:230-241.
- Yotsuyanagi H., Koike K., Yasuda K., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Kurokawa K., Iino S.** (1996). Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. *Hepatology*, 24(1):10-13.
- Zaaijer H.L., Kok M., Lelie P.N., Timmerman R.J., Chau K., Van der Pal H.J.H.** (1993). Hepatitis E in the Netherlands: imported and endemic. *The Lancet*, 341:826.
- Zafrullah M., Ozdener M.H., Kumar R., Panda S.K., Jameel S.** (1999). Mutational analysis of glycosilation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol*, 73(5):4074-4082.
- Zafrullah M., Ozdener M.H., Panda S.K., Jameel S.** (1997). The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol*, 71(12):9045-9053.
- Zanetti A.R., Dawson G.J., and the study group of Hepatitis E.** (1994). Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. *J Med Virol*, 42:318-320.
- Zanetti A.R., Schlauder G.G., Romanò L., Tanzi E., Fabris P., Dawson G.J., Mushahwar I.K.** (1999). Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol*, 57:356-360.
- Zhang H., Chao S.-F., Ping L.-H., Grace K., Clarke B., Lemon S.M.** (1995). An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect. *Virology*, 212:686-697.