



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Epidemiologia molecular del virus de l'Hepatitis E (VHE) en zones industrialitzades

Pilar Clemente Casares

Tesi Doctoral



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Epidemiologia molecular del virus de l'Hepatitis E (VHE) en zones industrialitzades

Memòria presentada per Pilar Clemente Casares per optar al Grau de Doctor
per la Universitat de Barcelona

Pilar Clemente Casares

Vist-i-plau de la directora de tesi

Dra. Rosina Girones Llop

Barcelona, Maig del 2005

Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia (1999-2001)

Índex	i-x
Abreviatures	xi-xii
Capítol 1: El virus de l'hepatitis E	1-40
Història	3-4
L'agent causal de l'Hepatitis E	5-12
• Característiques moleculars	5
• Característiques físico-químiques i estabilitat	7
• Diversitat genètica	8
• Diversitat serotípica	11
• Replicació del virus	11
Epidemiologia	13-22
• Zones endèmiques i no endèmiques	13
• Seroprevalença	15
• Vies de transmissió	17
• Factors de risc	19
La malaltia: Hepatitis E	23-25
• Característiques clíniques	23
• Diagnòstic	24
Zoonosi	26-35
• La infecció natural en animals	26
• Soques del VHE d'origen animal	28
• Animals models	30
• La infecció experimental	31
• Creuant barreres interespecífiques	34

Protecció contra el VHE	36-39
• Immunoprofilaxis passiva	36
• Vacunes	36
Capítol 2: El VHE a l'ambient	41-80
Introducció i objectius	43-44
Materials i mètodes	45-68
• Soques del VHE excretades per poblacions considerades no endèmiques	45
▪ Mostres d'aigua residual urbana	45
▪ Mostres de mol·luscs bivalves	46
▪ Recuperació de les partícules víriques	47
▪ Detecció dels àcids nucleics	49
* Extracció dels àcids nucleics dels concentrats vírics	50
* Amplificació enzimàtica	51
▪ Estudi de la seqüència dels fragments amplificats	57
* Purificació dels productes de PCR	57
* PCR de seqüenciació	58
* Precipitació del producte de la PCR de seqüenciació	59
* Anàlisi de les seqüències	59
* Anàlisis filogenètics	59
▪ Suspensions control	60
▪ Detecció del VHA	61
• Diversitat del VHE a mostres d'aigua residual	62
▪ Mostres d'aigua residual seleccionades	62
▪ Clonació del producte de la PCR	62

* Lligació	63
* Transformació	64
* Aïllament dels clons	67
* Comprovació de la presència de l'ínter	67
* Obtenció de les seqüències de l'ínter	67
* Congelació dels clons	67
Resultats	69-77
• Excreció del VHE per poblacions de zones considerades no endèmiques pel virus	69
▪ Selecció dels encebadors	69
▪ Presència del VHE a la població de Barcelona	70
▪ Presència del virus a d'altres regions considerades no endèmiques	71
▪ Caracterització genètica de les soques detectades	71
• Estudi de la diversitat present a mostres d'aigua residual	75
• Estudi de la presència del VHE a mol·luscs bivalves	77
Discussió	78-80
Capítol 3: Estudis de la infecció del VHE	81-120
Introducció i objectius	83-84
Materials i mètodes	85-99
• El VHE com a agent causant d'hepatitis	85
▪ Mostres de pacients amb possibles hepatitis agudes i/o nivells elevats d'ALT	85
▪ Mostres de pacients amb hepatitis agudes i IgG anti-VHE	88

▪ Mostres de sèrum d'individus d'un grup de risc: veterinaris	89
▪ Caracterització serològica de les mostres	89
* Detecció d'IgG anti-VHE	89
* Detecció d'IgM anti-VHE	92
▪ Presència del VHE en mostres de sèrum de pacients	92
* Detecció de l'ARN del VHE	92
* Extracció dels àcids nucleics de les mostres de sèrum	92
* Amplificació enzimàtica	93
* Seqüenciació dels fragments amplificats	94
* Anàlisi de les seqüències	94
• Estabilitat de la resposta humoral (IgG anti-VHE) amb el temps	94
▪ Mostres de sèrum de seguiment	95
▪ Detecció d'IgG anti-VHE	95
▪ Detecció de l'ARN del VHE a les mostres de seguiment	95
▪ Estudi de la infectivitat d'una soca aïllada a Barcelona	95
▪ Animals inoculats i inòcul	96
▪ Seguiment de la infecció: anàlisis bioquímics, serològics i virològics	96
* Anàlisis bioquímics i serològics	97
* Anàlisis virològics	97
Resultats	100-114
• El VHE com a causant d'hepatitis agudes	100
▪ Incidència de la infecció per VHE a una població d'una zona considerada no endèmica	100
▪ Detecció d'IgM anti-VHE en pacients amb hepatitis agudes	101
▪ Caracterització genètica de les soques aïllades	101

▪ El col·lectiu de veterinaris com a possible grup de risc	109
• Durada de la resposta humoral contra el VHE	110
• Estudi de la infectivitat d'una soca del VHE aïllada a Barcelona	112
▪ Anàlisis bioquímics, serològics i virològics	112
▪ Seqüenciació del VHE aïllat dels animals	114
Discussió	115-120
Capítol 4: Reservoiris animals del VHE	121-146
Introducció i objectius	123-124
Materials i mètodes	125-132
• Estudi de la presència del VHE en poblacions animals de granges	125
▪ Mostres d'origen porcí	125
* Mostres de sèrum	125
* Mostres de femta	126
▪ Mostres d'origen boví: mostres de femta	127
▪ Determinació de la presència d'IgG anti-VHE en mostres de sèrum de porc	128
▪ Concentració de les partícules víriques presents a les mostres de femta	128
▪ Extracció i amplificació dels àcids nucleics dels concentrats vírics	128
▪ Seqüenciació dels fragments amplificats	129
▪ Anàlisi de les seqüències	129
• Presència del VHE en mostres de llots d'escorxador i estudi de la seva variabilitat	130

▪ Mostres d'escorxador	131
▪ Concentració de les partícules víriques presents a les mostres d'aigua escorxador	131
▪ Extracció i amplificació dels àcids nucleics presents a les mostres	131
▪ Clonació dels amplificats obtinguts	132
▪ Anàlisi de la seqüència dels clons	132
Resultats	133-142
• Presència del VHE en poblacions animals de granges	133
▪ Poblacions porcines	133
* Detecció d'IgG anti-VHE	133
* Detecció de l'ARN del VHE	133
* Estudi filogenètic del VHE d'origen porcí	134
▪ Poblacions bovines	140
• Presència del VHE en mostres de llots d'escorxador i la seva variabilitat	140
Discussió	143-146
Capítol 5: Estudis de l'antigenicitat de l'epítol neutralitzant del VHE	147-184
Introducció i objectius	149-150
Materials i mètodes	151-173
• Disseny d'encebadors	151
• Soques de referència: Sar55 i Mex14	153
• Mutagènesi dirigida	154

▪ Mutació 1, mutació 2 i mutació 3	155
* PCR mutagèniques (PCR1 i PCR2)	155
* Purificació dels productes de les PCR mutagèniques	156
* PCR recombinant o de fusió	157
▪ Mutació 4	157
▪ Mutació dels controls: soques sar55 i mex14	158
• Clonació dels fragments mutats	160
▪ <i>A-tailing</i>	161
▪ Lligació	162
▪ Transformació	162
▪ Purificació dels plàsmids: miniprep	163
▪ Identificació de la presència de l'insert i la mutació	163
* Reacció de restricció amb NotI i NcoI	164
* Reacció de restricció amb Not1 i KpnI	165
* Reacció de restricció amb HindII	166
* Seqüenciació	166
• Obtenció dels pèptids mutats	167
▪ Purificació de grans quantitats de plàsmid: midiprep	167
▪ Traducció <i>in vitro</i>	168
▪ Electroforesi en gel d'acrilamida (PAGE)	170
• Reconeixement antigènic	170
▪ Anticossos anti-Sar55	170
▪ Radioimmunoprecipitació (RIPA)	171
Resultats	175-179
• Mutagènesi dirigida	175
• Obtenció dels pèptids mutats	178

Índex

• Radioimmunoprecipitació (RIPA)	178
Discussió	180-183
Conclusions generals	185-189
Bibliografia	191-212
Annex. Solucions i tampons	213-224

Abreviatures

°C	Graus Celsius
aa	aminoàcids
Ac	anticòs
AdH	adenovirus humans
ADN	Àcid desoxirribonucleic
ADNc	ADN complementari
Ag	antigen
ALT	alanina aminotransferasa
amp	ampicil·lina
ARN	Àcid ribonucleic
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
col.	col·laboradors
dNTP	<i>desoxiribonucleotide triphosphate</i> (desoxirribonucleòtid trifosfat)
DTT	Ditiotreitol
EDAR	Estació depuradora d'aigua residual
EDTA	<i>Ethilen-diamine-tetraetic acid</i> (àcid etilen-diamina-tetraacètic)
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (assaig immunoenzimàtic)
EV	Enterovirus
Fab	<i>fragment antigen binding</i> (fragment d'unió a l'antigen)
HCl	Àcid clorhídric
GGTP	γ -glutamil transferasa
ICD	isocitrat deshidrogenasa
ICTV	<i>International Comitee for Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Immunoglobulina tipus G
IgM	Immunoglobulina tipus M
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranòsid
Kb	<i>kilobases</i> (quilobases)
LB	Medi Luria-Bertani
LID	<i>Laboratory of Infectious Diseases</i>
MID	<i>Monkey infectious doses</i> (dosis infeccioses a mico)
MID ₅₀	<i>Monkey infectious doses 50</i> (dosis infeccioses 50 a mico)
M-MLV	<i>Moloney murine leukaemia virus</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NMP	nombre més probable

Abreviatures

NoV	Norovirus
ON	<i>overnight</i> (durant tota la nit)
ORF	<i>Open reading frame</i> (Pauta oberta de lectura)
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesi en gel de poliacrilamida)
pb	parell de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampó fosfat salí)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacció en cadena de la polimerasa)
pH	-log ₁₀ de la concentració d'hidrogenions
pmols	picomols
Pol	polimerasa
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> (assaig de radioimmunoprecipitació)
RNasa	Ribonucleasa
rpm	revolucions per minut
RT	retrotranscripció
SDS	Sodi dodecil sulfat
Sw	<i>Swine</i> (porc)
TA	temperatura ambient
U	unitats
UFC	Unitats formadores de colònies
UTR	<i>Untranslated region</i> (regió no traduïda)
UV	llum ultraviolada
VHA	Virus de l'hepatitis A
VHE	Virus de l'hepatitis E
<i>xg</i>	força centrífuga relativa
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid