



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

TESIS DOCTORAL

Estudio de caracterización y diagnóstico de la infección aguda y crónica por el virus de la hepatitis E

Tesis para optar al grado de doctora de

Sofía Romina Píriz Ruzo

Directores de tesis:

Dr. Josep Quer Sivila Dr. Francisco Rodríguez-Frías Dra. María Buti Ferret

Laboratorio de Enfermedades Hepáticas - Hepatitis Víricas

Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)

Barcelona 2021

Agradecimientos

Parecía que no iba a ocurrir, pero después de mucho esfuerzo ha llegado el día. Me gustaría primero dar las gracias a mis directores de tesis. Al Dr. Josep Quer, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su paciencia y su buena voluntad. Al Dr. Francisco Rodríguez Frías, por su dedicación a su trabajo y sus lluvias de ideas. A la Dra. Maria Buti, por su profesionalidad y aporte del punto de vista clínico. También agradecer a la Dra. Mar Riveiro, quien pese a no ser directora de este trabajo ha formado parte de la investigación desde sus inicios, aportando información, dedicación y siendo un gran apoyo: sin ti esta tesis no habría tenido lugar. Gracias a la Dra. Mari Costafreda y al Dr. Josep Gregori, por divulgar su conocimiento y por sus aportaciones a este trabajo.

Me gustaría agradecer a todas las personas que han estado presentes en mi día a día, que me han enseñado ciencia, pero también cosas de la vida. Gracias Imma, Mar, Aurora, Fede, Teresa, Manu, Qian, Mariu, Celia, Irati, Georg, Maria y Diana. No habría podido tener mejores compañeras de equipo y os merecéis el cielo por aguantarme tanto tiempo. Dar las gracias también a Sara, Marçal, Cristina, Irene, Chari, Francesca, Selene, Bea, Marta y David, compañeros de equipo y de desgracias en la distancia, y también a Gerard, Adrià y en especial a Unai, por hacer de mi trabajo el suyo, por su apoyo y por las risas compartidas. Quiero agradecer a Adriana, Nieves y Susana, ¡recoger muestras sin vosotras no habría sido tan divertido! y también a Ariadna Rando y Alba, de quienes su aportación al trabajo con sus bases de datos y conocimientos fueron

Agradecimientos

una ayuda incondicional. Me gustaría agradecer también a las personas que han supuesto un apoyo sin el cual no habría podido seguir adelante. Gracias Miren por ayudarme tanto, por estar presente en la distancia y por preocuparte tanto por mí. Gracias Moni por todo lo aprendido y desaprendido contigo, por hacerme tía de Polsito, y por acompañarme en mi crecimiento como científica, pero también y más importante, como persona. Y muchísimas gracias a mis queridísimas compis de lab, Mer, Meri y Elena, ¡Gracias por existir! Por quererme, por aceptarme, por el apoyo y por todo lo que me enseñaron en este tiempo. Siempre compartiremos el apellido López.

Me gustaría también expresar mi más sincera gratitud a los empleados del VHIR, en especial a Pablo, Tao y Rai, quienes me sacaban sonrisas incluso cuando ya no me quedaban energías y me ofrecieron un lugar seguro donde refugiarme. Y también a Montse, por ofrecerme su confianza y su amabilidad.

Gracias a todos y todas las que habéis formado mi familia en Barcelona, mis *nenes* Pauli, Ania y Fio, ¡me dan vida marica! Gracias a mis *uruguayas* Maugi, Valen y Fati, la vida unió nuestros caminos una vez más. Gracias a mi queridísimo amigo David, un hermano mayor para mí. Y también gracias a mi queridísima prima Alejandra y a su marido Rubén, la familia que unió Barcelona, y a mi *chiquibeibi* Pe, un ser de luz, paz y calma, algo muy valioso hoy día.

Agradecer también a mis más preciados tesoros, mis amigas y amigos Roser, Nayade, Carlos, Alexis, Ana, Alba y compañía, y en especial a Lorena, mi hermana nacida en el mediterráneo, y a Sandra, mi *italiani favoriti*. También quiero dar un especial agradecimiento a la familia que escogí, a los Abbatangelo, a los Carozzi, a Graciela y Darío, a la familia Dávila y Artús y a Jordi.

Quiero agradecerle todo el amor y apoyo que he recibido a mi abuelo Roberto, por estar presente pese a estar a 10000km de distancia, por querer tanto a mi mamá y por ser como un papá para mí. Gracias también a mis *chiquis*, Mushu y mi hermana Pufi. Y por último, dar las gracias a mi mamá, el amor de mi vida. La mujer más fuerte, valiente y luchadora que ha existido nunca, mi ejemplo a seguir, y mi única razón para llegar hasta aquí.

Como Walt Disney dijo una vez, son muchas las manos y corazones que contribuyen al éxito de una persona. Queridos, queridas, aquí nuestro éxito. Gracias.

Sofía

Índice

Índice	
<i>Abreviaciones</i>	15
<i>Introducción</i>	23
1.1 Virus de la hepatitis E	25
1.2 Genoma viral.....	26
1.2.1 Estructura del virus	26
1.2.2 Epidemiología molecular del VHE: genotipos y subtipos	29
1.3 Transmisión.....	33
1.4 Respuesta inmune e infección	35
1.4.1 Respuesta inmune innata	36
1.4.2 Respuesta inmune humoral.....	39
1.4.3 Infección aguda y crónica	41
1.5 Diagnóstico de la infección por VHE.....	43
1.6 Tratamiento de la infección crónica	46
1.7 Variabilidad intragenómica y mutaciones	49
1.8 Aplicaciones de la secuenciación masiva en virología....	51
<i>Hipótesis y objetivos</i>	53
2.1 Hipótesis	55
2.2 Objetivos.....	56
<i>Materiales y métodos</i>	57
3.1 Pacientes.....	59

3.2	Determinación de la isoforma de la IgM en infección aguda e infección crónica por VHE	60
3.3	Determinación de ARN viral en muestras de plasma y heces de pacientes con infección aguda y crónica	61
3.4	Identificación de partículas virales y vesículas extracelulares (EVs) en muestras de plasma y heces de pacientes con infección aguda y crónica.....	62
3.5	Estudio de diversidad y complejidad de quasiespecies por NGS (Next-generation sequencing)	66
3.5.1	Extracción del ARN viral	66
3.5.2	Retrotranscripción y amplificación del genoma viral	67
	<i>RT-PCR</i>	67
	<i>Nested-PCR</i>	70
	<i>Análisis y purificación de los fragmentos amplificados por Nested-PCR</i>	74
	<i>Preparación de la librería</i>	75
	<i>Secuenciación de la librería</i>	76
	<i>Algoritmo para el análisis de datos</i>	77
	<i>Estudio de la complejidad de las quasiespecies</i>	78
	<i>Resultados</i>	81
4.1	Determinación de la isoforma de la IgM en infección aguda e infección crónica por el VHE.....	83
4.2	Determinaciones de ARN viral en muestras de plasma y heces de pacientes con infección aguda y crónica	85

4.3	Identificación de partículas virales en muestras de plasma y heces de pacientes con infección aguda y crónica.	108
4.3.1	Descripción general de patrones ARN-VHE y VHE-Ag en gradientes de iodixanol.	108
4.3.2	Exploración de posibles EVs conteniendo partículas virales	123
4.4	Estudio de diversidad y complejidad de quasiespecies por NGS	143
	<i>Discusión</i>	181
	<i>Conclusiones</i>	215
	<i>Limitaciones del estudio</i>	221
	<i>Líneas de futuro</i>	225
	<i>Bibliografía</i>	229

Abreviaciones

Abreviaciones

Las abreviaciones aparecen ordenadas alfabéticamente.

aa	Amino ácidos
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AK	Adenosina quinasa
ALT	Alanina aminotransferasa
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato aminotransferasa
CD4+	Células CD4+
CRE	<i>Cis-Regulatory Element</i> o elementos esenciales cis
EVs	<i>Extracellular vesicles</i> o esículas extracelulares
FA	Fosfatasa alcalina
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> Agencia de Medicamentos y Alimentación
GGT	<i>Gamma-glutamyl transpeptidasa</i>
Hb	<i>Hemoglobina</i>
Hel	RNA helicasa
HVR	<i>Hypervariable región</i> o región hipervariable
IFN	Interferón

Abreviaciones

IFN- α	Interferón α
IFN- β	Interferón β
IFN-I	Interferón- I
IFN-III	Interferón- III
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G anti-VHE
IgM	Inmunoglobulina M anti-VHE
IRF3	Factor 3 regulador de IFN
IRF7	Factor 7 regulador de IFN
IRF9	Factor 9 regulador de IFN
JAK1	Janus Quinasa 1
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LVPs	Lipoviropartículas
Met	Metiltransferasa
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NIU	Fibrosis pulmonar idiopática
NK	Células <i>Natural Killer</i>
<i>Natural Killer T</i>	Células <i>Natural Killer T</i>
OD	<i>Optical Density</i>
O/N	<i>Overnight</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud

ORF	<i>Open Reading Frame</i> o pauta de lectura
ORF1	<i>Open Reading Frame 1</i>
ORF2	<i>Open Reading Frame 2</i>
ORF3	<i>Open Reading Frame 3</i>
ORF4	<i>Open Reading Frame 4</i>
PBMC	Célula mononucleada de sangre periférica
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCP	Cistein-proteasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PKR	Proteína kinasa activada por ARN
PPR	Región poliprolina
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
Px	Paciente
qRT-PCR	<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> o ARN polimerasa ARN dependiente
RBV	Ribavirina
BDP	Ribavirina-5'-difosfato
RIG-I	<i>Retinoic-acid inducible gene 1</i> o gen I inducible por el ácido retinoico
RMP	Ribavirina-5'-monofosfato

Abreviaciones

RTP	Ribavirina-5'-trifosfato
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
SN	Sobrenadante
TBK1	Quinasa de unión
Tregs	Células T reguladoras
UTR	<i>Untranslated region</i> o regiones no traducidas
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHD	Virus de la hepatitis D o Delta
VHE	Virus de la hepatitis E
VHE1	Virus de la hepatitis E genotipo 1
VHE2	Virus de la hepatitis E genotipo 2
VHE3	Virus de la hepatitis E genotipo 3
VHE4	Virus de la hepatitis E genotipo 4
VHE5	Virus de la hepatitis E genotipo 5
VHE6	Virus de la hepatitis E genotipo 6
VHE7	Virus de la hepatitis E genotipo 7

VHE8	Virus de la hepatitis E genotipo 8
VHE-Ag	Antígeno del virus de la hepatitis E
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
2'5'-OAS	2'5'-oligodenilatosintetasa

Introducción

1 Introducción

1.1 Virus de la hepatitis E

La infección por el virus de la hepatitis E (VHE) es una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Fue descrita por primera vez en 1955 en Nueva Delhi a raíz de una epidemia transmitida por la contaminación fecal de agua potable¹. A pesar de que inicialmente se catalogó como una epidemia causada por picornavirus, y posteriormente por calicivirus, no fue hasta la secuenciación del genoma completo del virus²⁻⁴ que fue asignado a su propio género “Virus similares a la Hepatitis E”, nombrando su propia familia en 2009 como *Hepeviridae*⁵.

La infección por el VHE es la causa más común de hepatitis aguda en todo el mundo^{6,7} y, de acuerdo con el Centro de Control y Prevención de enfermedades (CDC, *Center of Disease Control and Prevention*) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estiman unos 20 millones de casos de infección aguda por el VHE, de los cuales 3,3 millones presentan los síntomas de la enfermedad⁸ y 57.000 de ellos fallecen^{9,10}.

Generalmente los brotes por infección de VHE se reportan en regiones donde la higiene sanitaria es baja, fundamentalmente países en vías de desarrollo, donde también son frecuentes las

infecciones por hepatitis A ¹¹. Sin embargo, recientemente se han documentado brotes de hepatitis E en países industrializados en Europa y otras partes del mundo como Japón ¹², Estados Unidos ^{13,14} y Reino Unido ^{15,16}.

1.2 Genoma viral

1.2.1 Estructura del virus

El VHE pertenece a la familia *Hepeviridae*, la cual consta de 2 géneros diferentes: *Piscihepevirus* (virus de la trucha asesina) y *Orthohepevirus* (cepas de mamíferos y aves), dividido en 4 grupos (A-D) según las especies que infectan ¹⁷.

El VHE es un virus pequeño de cadena simple en sentido positivo con un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de un tamaño aproximado a 7,2 kilobases. El genoma está dividido en tres pautas de lectura (*ORF, Open Reading Frame*) nombradas como ORF1, ORF2 y ORF3, dos regiones no traducidas 5' y 3' (UTRs, *untranslated region*) y dos elementos esenciales cis (*CRE, Cis-Regulatory Element*) (Figura 1).

El ORF1 es el fragmento más extenso y el más heterogéneo ¹⁸. Codifica para una poliproteína no estructural de 1693 amino ácidos (aa) que contiene la maquinaria de replicación del virus,

incluyendo una actividad metiltransferasa (Met), una cistein-proteasa (PCP); una ARN helicasa (Hel) una ARN polimerasa ARN dependiente (*RdRp*, *RNA-dependent RNA polymerase*), además de varios dominios no-enzimáticos pero esenciales para la replicación, como un dominio Y, X y una región poliprolina (PPR) o región hipervariable (HVR, *hypervariable region*). Nuevas evidencias han demostrado que existe un ORF adicional, ORF4, el cual estaría solapado con el ORF1 (solapando con la región Hel). La proteína de ORF4 estimularía la actividad de la RdRp interactuando con los dominios X, RdRp y helicasa para formar un complejo de replicación^{19,20}. El complejo de replicación, una vez constituido a partir de la cadena positiva (+), copia el ARN genómico a ARN cadena negativa (-) completa. Esta cadena negativa va a servir de molde para generar cadenas positivas completas (que serán empaquetadas en el virión), además de generar ARNs subgenómicos que contienen el ORF2 y el ORF3²¹.

El ORF2 está localizado a 38 nucleótidos “*downstream*” del extremo 3’ del ORF1 y codifica para la proteína de la cápside. Es una proteína de 660 amino ácidos, que en su forma glicosilada se auto ensambla para convertirse en la subunidad de la cápside viral. Se trata de la región más conservada del genoma, estando dividida en tres dominios funcionales, el dominio S forma la

estructura base de la cápside y los dominios M y P están involucrados en la interacción virus-célula huésped²². Asimismo, estudios recientes afirman que el ORF2 también codifica para una proteína no infectiva que difiere de la actual proteína ORF2 por no estar asociada a partículas virales y la cual no es esencial para el ciclo vital del VHE, pero es posible que cumpla una función reguladora en la respuesta inmune. Sin embargo, el origen y las funciones biológicas de esta forma secretada de ORF2 continúa siendo una incógnita²³.

Por último el ORF3 está situado solapándose con el ORF2 excepto por una base situada en 5' y codifica para una fosfoproteína de 113-114 aminoácidos (dependiendo del genotipo), la cual tiene función de canal iónico involucrado en la liberación del virus de las células infectadas²⁴.

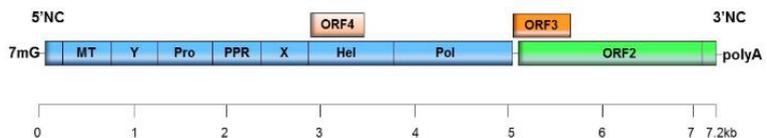


Figura 1: Genoma viral del Virus de la hepatitis E (VHE). Puta de lectura (ORF, Open Reading Frame) ORF1 en azul, codifica para proteínas no estructurales. 7mG: 7-metilguanosa; MT: metil transferasa; Y: dominio Y; Pro: cisteina-proteasa; PPR: región poliprolina; X: Dominio X o región hipervariable; Hel: helicasa; Pol: ARN polimerasa ARN dependiente de ARN, RdRp. En rosa, el ORF4 recientemente descrito en el VHE1, solapado

al ORF1. En Verde, el ORF2. En naranja, ORF3. PolyA: cola poliA. Imagen adaptada de Lhomme et al ¹⁷.

1.2.2 Epidemiología molecular del VHE: genotipos y subtipos

La clasificación del VHE se ha basado principalmente en la región ORF2. Se distinguen diversos genotipos con diferencias a nivel nucleotídico que oscilande 22,1% al 26,7% ²⁵. Pese a haber controversia sobre si secuencias aisladas de conejos o jabalíes deberían ser, o no, consideradas nuevos genotipos, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, *International Commitee on Taxonomy of Viruses*) considera que la familia *Hepeviridae* está formada por cuatro genotipos (VHE1-VHE4) bien establecidos y cuatro genotipos recientemente descritos (VHE5-VHE8).

Los genotipos VHE1-VHE4 se encuentran globalmente distribuidos según diferentes patrones epidemiológicos basados principalmente en factores ecológicos y socioeconómicos (Figura 2) ²⁶.

- Los genotipos VHE1 y VHE2 infectan únicamente a humanos y son endémicos en áreas donde ocurre de forma frecuente la transmisión fecal-oral por medio de consumo de aguas contaminadas debido a la escasez de recursos y falta de higienización, principalmente en contexto de

grandes catástrofes naturales ²⁷⁻³⁰ provocando brotes epidémicos, aunque también casos esporádicos.

- Los genotipos VHE3 y VHE4 se transmiten principalmente por vía zoonótica en países industrializados como Europa y Estados Unidos ¹³. Se han documentado casos esporádicos en España, Holanda, Francia, Italia, Inglaterra, etc. ³¹⁻³⁵. Estos genotipos infectan, además de a humanos, a cerdos, jabalíes, conejos, ciervos, moluscos, etc. ³⁶⁻⁴¹. Ambos genotipos son transmitidos por contacto directo con animales infectados, por consumo de carne cruda o poco cocinada, o consumo de moluscos ^{15,42,43}. Asimismo, estudios recientes indican que los animales de compañía (perros, gatos, conejos...) podrían ser hospedadores accidentales del VHE y constituir un potencial reservorio para la transmisión de la enfermedad ^{44,45}. Geográficamente, el VHE4 se encuentra prevalentemente en Asia, mientras que el VHE3 está distribuido a lo largo de todo el planeta ⁶.

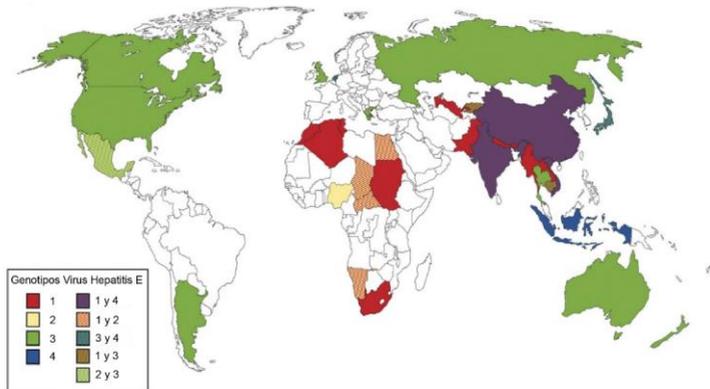


Figura 2: Distribución geográfica de los genotipos VHE1, VHE2, VHE3 y VHE4. Modificada de Wedemeyer et al ⁶.

En los últimos años se han descrito 4 nuevos genotipos. Los genotipos VHE5 y VHE6 únicamente se han aislado a partir de animales como cerdos, conejos y jabalíes ⁴⁶⁻⁴⁸. El VHE7 se aisló en dromedarios en Arabia Saudí ⁴⁹ –aunque hay un caso reportado en humanos- ⁵⁰ y el VHE8 ha sido reportado en camellos ⁵¹⁻⁵³.

Aunque está aceptado que el VHE está dividido en 4 genotipos bien caracterizados y 4 recientes, no hay un consenso sobre el número de subtipos en cada genotipo. El grado de diferencias nucleotídicas que son necesarias para clasificar genotipos y subtipos varía según el tipo de virus. Por ejemplo, el virus de la hepatitis C (VHC), basado en secuencias virales completas, requiere una diferencia nucleotídica de 31%-33% para ser dividido

entre genotipos, y un 20%-25% entre subtipos ⁵⁴. En el caso del virus de la hepatitis A (VHA) este requiere una menor diferencia nucleotídica de 7% – 7,5% para subtipos ⁵⁵. Sin embargo, la distancia nucleotídica necesaria para la clasificación del VHE no está bien definida. Un estudio de Lu et al ⁵⁶ sugiere que ésta es de 22,1% – 26,7% para dividir entre genotipos, de 6,2% – 13,45% para dividir los subtipos de los genotipos VHE1 y VHE2; y de 12,1% – 19,8% los subtipos de los genotipos VHE3 y VHE4. Estos autores concluyen que el genotipo VHE1 está dividido en 5 subtipos y el genotipo VHE2 en 2 subtipos, mientras que los genotipos VHE3 y VHE4 son más diversos, con 10 y 7 subtipos respectivamente. Sin embargo, estudios recientes afirman que el genotipo VHE1 contiene 6 subtipos divididos en dos clados: VHE1abcf (comprendiendo los subtipos 1a, 1b, 1c y 1f) y VHE de (comprendiendo lo subtipos 1d y 1e); y el genotipo VHE2 estaría dividido en los subtipos 2a y 2b. En cuanto a las distancias nucleotídicas entre los subtipos del genotipo VHE3, éstas muestran un patrón complejo con múltiples jerarquías de relación. Los subtipos de este genotipo están divididos en dos clados, un clado mayor VHE3abchij que comprende los subtipos 3a, 3b, 3c, 3h, 3i y 3j; y otro clado VHE3efg que comprende los subtipos 3e, 3f y 3g ⁵⁷⁻⁶¹. El subtipo 3f es uno de los subtipos más

predominantes en Europa y también en España, causante de la mayoría de casos esporádicos e infección crónica en pacientes inmunocomprometidos ⁵⁶. Por último, se distinguen 7 subtipos dentro del genotipo VHE4 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f y 4g ⁵⁶. Un estudio en 2012 propuso dos subtipos más para el genotipo VHE4, 4h y 4i, pero siguen sin ser asignados debido a corresponderse a una única secuencia viral aislada ⁶².

1.3 Transmisión

Las vías de transmisión del VHE son varias. Principalmente se transmite por la ruta fecal-oral, asociada al consumo de aguas contaminadas o no cloradas en países en vías de desarrollo ^{63,64}. Esta vía de transmisión es la principal para los genotipos VHE1 y VHE2.

Una vía de transmisión cada vez más extendida es la de origen alimentario (o transmisión zoonótica) por consumo de productos cárnicos contaminados crudos o poco cocinados ⁶⁵, muy común en los genotipos VHE3 y VHE4. Recientemente se han publicado varios estudios con demostraciones filogenéticas de transmisión del VHE por esta vía en Cataluña, España ⁶⁶, relacionada con el consumo de salchichas *Figatellu* en Francia ⁶⁷, consumo de cerdo crudo o poco cocinado en un restaurante de Japón ⁶⁸ y más

recientemente en Reino Unido por consumo de salchichas con origen europeo ¹⁵.

Además se han descrito otras como transmisión materno-fetal (transmisión vertical), frecuente en países en desarrollo donde abundan los genotipos VHE1 y VHE2; y mediante transfusión de productos sanguíneos (transmisión horizontal), forma de transmisión presente globalmente y también observada en Cataluña ^{69,70}. Este ha hecho que desde 2017 en Cataluña se incorpore la determinación serológica y carga viral para el VHE en todos los productos sanguíneos de donantes del Banco de Sangre y Tejido.

1.4 Respuesta inmune e infección

La patogénesis del VHE no está todavía bien aclarada. La forma en la que el virus infecta a las células hepáticas sigue siendo una incógnita. Datos recientes de Marion et al ⁷¹ sugieren que el VHE replica en las células intestinales y llega al hígado en partículas quasi-envueltas o vesículas extracelulares (EVs). El VHE estaría rodeado por una quasi-envuelta, se replicaría en el tracto intestinal antes de infectar las células hepáticas por vía sanguínea.

Una vez en el hígado, el virus replica en el citoplasma del hepatocito y es liberado al torrente sanguíneo en forma de lipovirpartículas (LVPs) por su asociación con lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low-density lipoprotein*) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *very low-density lipoprotein*). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que pese a la liberación de partículas víricas de VHE en las dos caras de los hepatocitos como LVPs, la mayor parte de las partículas son liberadas de las células por su lado apical, (cara biliar) sin utilizar este proceso. El ratio de partículas infecciosas y copias de ARN viral en el lado apical vs la cara basolateral sugiere que sería esta la principal ruta de liberación del virus ⁷². Otros virus hepatotrópicos como el VHA, el virus de la hepatitis B (VHB) y el

VHC usan la polarización de los hepatocitos para su liberación.⁷³⁻⁷⁵

Asimismo, pese a que el VHA está asociado a lipoproteínas en sangre⁷⁶, como en el caso del VHE, estos virus tienen diferentes mecanismos de liberación de las células hepáticas, siendo en el caso del VHA más común su liberación por el lado basolateral de los hepatocitos, en comparación con el VHE por la cara apical de la célula⁷⁷.

En el hígado, la infección por VHE puede provocar daño hepático debido a la respuesta inmune mediada por las células T citotóxicas y las células *Natural Killer (NK)*.

1.4.1 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata frente al VHE no está totalmente definida. Estudios infectando chimpancés con VHE, VHC o VHA sugieren que la respuesta inmune innata mediada por interferón (IFN)- α restringe la replicación del VHE de forma más eficiente que en el caso del VHC⁷⁸, y que el VHE desencadena una respuesta al IFN más fuerte que el VHA⁷⁹. Otros estudios realizados en macacos sugieren que la respuesta inmune innata difiere según genotipos, estando los genes de respuesta al interferón (IRF3 o

IRF7) infraexpresados durante la infección con VHE1 y supraexpresados con VHE3 ⁸⁰.

El VHE ha desarrollado mecanismos para suprimir la señalización del IFN- α . Estudios in vitro sugieren que la proteína del ORF3 inhibe al activador de la transcripción STAT1 bloqueando la activación de dos proteínas antivirales: Proteína quinasa activada por ARN (PKR) y la 2'5'-oligodenilatosintetasa (2'5'-OAS) (Figura 3) ^{81,82}; y realza la producción de IFN-I por las células HEK293T al interactuar con el gen I inducible por el ácido retinoico (RIG-I) del receptor de reconocimiento de patrones (PRR). Asimismo, la proteína del ORF1 inhibe la señalización de RIG-I y previene la inducción de IFN- β por la desubiquitinación de RIG-I y la quinasa de unión (TBK1) ⁸³, silenciando componentes clave de la cascada de señalización Janus Quinasa (JAK)-STAT (JAK1, STAT1 e IRF9), estimulando la infección y replicación del VHE ⁸². Estudios con hepatocitos primarios humanos sugieren que la infección por el VHE es capaz de persistir pese a la producción de IFN tipo III, sugiriendo que el virus es más eficiente bloqueando la vía de señalización del IFN que inhibiendo su producción ⁸⁴.

Las células NK y *Natural Killer T* (NKT) constituyen la mayor fracción de linfocitos en el hígado, siendo importantes para la patogénesis de la hepatitis viral por su actividad contra los

hepatocitos infectados por VHE durante la respuesta inmune innata. Estudios sugieren que la proporción de CD4+ en sangre periférica en pacientes con infección aguda por VHE es mayor que en la sangre de pacientes control reflejando un incremento de las células NKT o de las células T reguladoras (Tregs)⁸⁵. Un estudio sugiere que entre las células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) la proporción de células NK y NKT es inferior durante la fase aguda de infección del VHE que en pacientes control, pudiendo deberse al aumento de la migración de estas células al hígado del paciente con la infección o a la activación de la apoptosis en las mismas⁸⁶. Asimismo, un análisis inmunohistoquímico de biopsias hepáticas de pacientes con infección aguda por VHE concluyó que el número de células CD56+ (NK y NKT) era significativamente mayor que en biopsias de pacientes infectados con VHA, VHB o VHC⁸⁷.

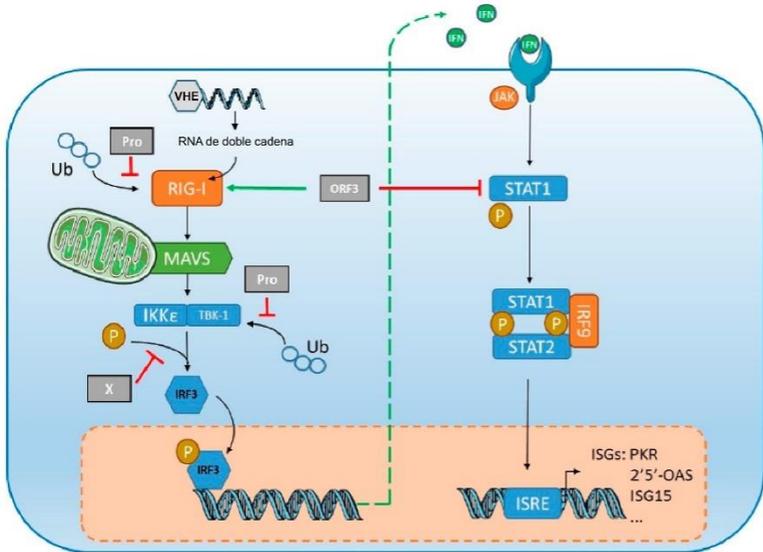


Figura 3: Interferencia de VHE con la respuesta inmune innata. El ARN del VHE se detecta en el citoplasma por el gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I), lo que conduce a la producción de interferón de tipo I y tipo III (IFN). El dominio de proteasa (Pro) de la proteína ORF1 inhibe la señalización a través de RIG-I y evita la inducción de IFN desubiquitinando la quinasa 1 de unión a RIG-I y TANK (TBK-1). El dominio X (X) inhibe la fosforilación (P) de la proteína reguladora de IFN 3 (IRF3). La proteína ORF3 estimula la interacción directa de IFN tipo I con RIG-I, pero también se une a STAT1 para restringir su fosforilación y activación de la cascada de señalización, inhibiendo así la expresión de los genes estimulados por IFN (ISG). Imagen adaptada de LHomme et al ¹⁷.

1.4.2 Respuesta inmune humoral

De manera general los pacientes infectados por el VHE producen una respuesta serológica desarrollando anticuerpos anti-VHE durante la infección. La inmunoglobulina (Ig) M anti-VHE se

presenta al inicio de la fase clínica de la enfermedad (Figura 4), pudiendo detectarse durante meses y siendo utilizada como herramienta diagnóstica de infección aguda por VHE ⁸⁸. En un reciente estudio se demostró que la IgM antiVHE puede detectarse hasta 34 meses después de la infección aguda autolimitada ⁸⁹. La inmunoglobulina G (IgG) anti-VHE aparece poco después de la respuesta de la IgM y puede detectarse durante largos periodos de hasta 14 años ⁹⁰.

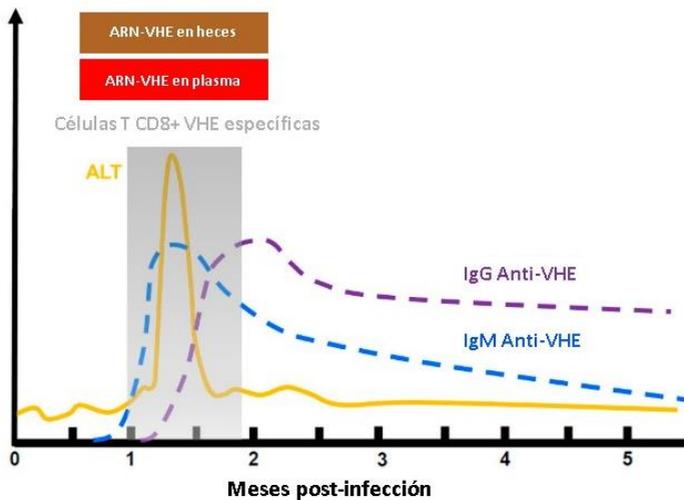


Figura 4: Curso de una infección aguda autolimitada por VHE. ALT: alanina aminotransferasa. Modificada de LHomme et al ¹⁷.

1.4.3 Infección aguda y crónica

Varios estudios han reportado que la mayoría de los casos de infección por el VHE son asintomáticos ⁹¹, objetivándose una alta prevalencia de IgG anti-VHE entre la población general. Datos recientes de estudios europeos muestran prevalencias de IgG del 6,8% en donantes de sangre en Alemania ⁹² y 8% en adultos y un 4,6% en niños en Cataluña ^{31,93}. Recientemente Sauleta et al ⁹⁴ reportó un 10,7%/20% de seroprevalencia (dependiendo de la metodología utilizada) en diez mil donantes de sangre en Cataluña.

La mayoría de las infecciones por VHE en pacientes inmunocompetentes son asintomáticas y autolimitadas, siendo el período de incubación de unas 2-8 semanas en la mayoría de los casos. La infección aguda icterica por VHE ocurre en el 5-30% de los pacientes infectados, con sintomatología no específica (vómitos, fiebre, náuseas, orina oscura...) que se resuelven en pocos días-semanas. La tasa de mortalidad varía de 0,5 a 4% de las infecciones en un brote epidémico ⁹⁵. Los genotipos VHE1 y VHE2 infectan mayoritariamente a hombres jóvenes (15-30 años) en países en vías de desarrollo, pudiendo ser la infección asintomática o causando infección aguda icterica, la cual puede derivar en hepatitis fulminante, con una alta mortalidad.

La infección por el VHE puede ser grave en las poblaciones de riesgo incluyendo mujeres embarazadas ^{92,96}, pacientes con hepatopatía previa o sujetos inmunosuprimidos ⁶. Las mujeres embarazadas tienen mayor riesgo de progresar a fallo hepático agudo en el segundo y tercer trimestre de embarazo, así como padecer abortos o morbilidad y mortalidad neonatal. La tasa de mortalidad durante el tercer trimestre de embarazo asciende al 25% ^{97,98}.

En países desarrollados, la infección por VHE está relacionada con los genotipos VHE3 o VHE4, suelen ser hombres mayores de más de 55 años, y sintomática en el 5%-33% de los casos⁹⁹⁻¹⁰¹. Además puede evolucionar a infección por VHE crónica en caso de inmunosupresión, siendo las patologías subyacentes más frecuentes el trasplante (tanto de órgano sólido como progenitores hematopoyéticos) ¹⁰²⁻¹⁰⁴, co-infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ^{105,106} o inmunosupresión farmacológico por otras patologías.

La hepatitis E crónica se define por la presencia de replicación persistente del VHE durante más de 3 meses ¹⁰⁷. La importancia de la infección por VHE crónica es que puede progresar a cirrosis en el 10% de los infectados de forma rápidamente progresiva ^{102,103,108,109}.

La infección por el VHE también se asocia con manifestaciones extrahepáticas, principalmente neurológicas. Se han reportado casos de trastornos neurológicos, incluyendo polirradiculopatía, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis o miopatía proximal tanto en pacientes con infección aguda como crónica por el VHE ^{110,111}.

1.5 Diagnóstico de la infección por VHE

Existen técnicas moleculares y serológicas para detectar la infección por VHE. Un diagnóstico completo de la infección por el VHE estará basado en serología, carga viral y datos bioquímicos. La serología se basa en la detección de anticuerpos específicos contra VHE y el diagnóstico se completa con la detección de proteínas virales y la detección del genoma viral como demostración de la infección activa.

La detección de anticuerpos anti-VHE como las inmunoglobulinas IgM o IgG proporciona información sobre el estado de la infección, pero no refleja si está presente o no el genoma viral en la sangre del paciente. Asimismo, el éxito de la prueba se puede ver influenciado por el tipo y cantidad de muestra, así como qué test se ha utilizado. No existe un ensayo serológico aprobado por la Agencia de Medicamentos y Alimentación (*FDA, Food and Drugs*

Administration) disponible para la realización de un diagnóstico clínico más preciso de la infección por VHE.

Varios estudios han demostrado que existen diferencias entre datos serológicos en muestras según el kit de diagnóstico utilizado. En 2010 un estudio realizado utilizando el suero estándar de referencia de la OMS mostró que el test Wantai (Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Beijing, China) tenía un 98% de sensibilidad frente al 56% de sensibilidad IgG anti-VHE que mostraba el kit Genelabs (Singapur) ¹¹². Otro estudio utilizando los mismos kits concluyó que, en un total de 147 personas examinadas la seroprevalencia del VHE era de 23,1% según Wantai y 14,3% en el caso de Genelabs ¹¹³. Y recientemente Sauleda et al ⁶⁹ publicó un trabajo con 1082 muestras de donantes de sangre en los que comparó la sensibilidad de los kits para IgG anti-VHE Wantai (Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Beijing, China) y Mikrogen Ig ELISA (Mikrogen GmbH), dando como resultado una seroprevalencia de 19,96% y 10,72% respectivamente. Lo mismo ocurre en el caso de la IgM. Un estudio publicado este año comprobó la eficacia de dos kits para la detección de IgM anti-VHE, Mikrogen y Wantai, en 25 pacientes con una infección aguda previa por VHE, dando como resultado una IgM detectable en 14 pacientes (56%) según Mikrogen y 6

(24%) según Wantai. Este mismo estudio también sugirió el uso del antígeno del VHE (VHE-Ag) para su uso como marcador de carga viral en sangre cuando no es posible realizar una determinación de carga viral dando lugar a una precisión diagnóstica del 57%, mayor que la obtenida con los kits de IgM Wantai (42%) y Mikrogen (31%)⁸⁹.

Varios estudios de respuesta inmune basada en anticuerpos consideran que las IgM están asociadas a respuesta aguda hacia una infección viral reciente, pudiendo ser detectadas los primeros meses de esta; mientras que la respuesta de IgG es una respuesta a largo plazo^{6,17}.

La detección de ARN del virus se considera el *gold standard* para el diagnóstico de la infección por VHE, tanto aguda como crónica¹¹⁴⁻¹¹⁶. Esta detección se realiza mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real. Utilizando una muestra estándar proporcionada por el OMS¹¹⁷ con la cual correlacionar los resultados se hace posible la cuantificación en tiempo real de la muestra problema. El test clásico se basa en detectar ARN circulante en suero/plasma¹¹⁸. Recientemente se han utilizado las heces como otro tipo de muestra para el diagnóstico de infección por el VHE, sobre todo en pacientes con infección crónica que son tratados con

antivirales. Un estudio reciente asoció la persistencia de ARN viral en heces al final del tratamiento antiviral con un riesgo mayor de recaída ¹¹⁹. Otro estudio comparó dos grupos de pacientes, con y sin persistencia de ARN viral en heces, y destacó que el 70% de los pacientes que seguían teniendo ARN viral detectable en heces después de 12 semanas de tratamiento antiviral recaían en la infección. Por el contrario, de aquellos que habían aclarado la infección en plasma y heces, solo el 15,6% recaían ¹²⁰. Por tanto, es necesario comprobar en pacientes con infección crónica de larga duración, y que han sufrido tratamientos que no han sido efectivos, cuál es la determinación más efectiva de actividad viral para poder ser usada como test para indicar el fin de tratamiento.

1.6 Tratamiento de la infección crónica

La infección por el VHE suele ser asintomática y autolimitada ⁶. Sin embargo, en los casos de infección por genotipo VHE3 y VHE4 en pacientes inmunocomprometidos o pertenecientes a grupos de riesgo, esta infección puede desencadenar una hepatitis aguda grave o bien derivar en una infección crónica. En pacientes inmunocomprometidos, principalmente trasplantados de órgano sólidos, la prevalencia de infección crónica por VHE oscila entre el 0.9-3.5%, estimándose que hasta el 60% de las infecciones agudas en estos pacientes puede cronificar ¹⁰⁸.

Actualmente el tratamiento de la infección por el VHE, tanto aguda como crónica está limitado al uso de dos fármacos: ribavirina (RBV), y en menor medida, interferón (IFN).

El antiviral más extendido para su uso en infecciones crónicas virales es la RBV. La RBV o 1-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida, es un análogo de purinas con actividad antiviral de amplio espectro que actúa tanto sobre virus ADN como ARN. A nivel celular, la RBV es fosforilada por quinasas celulares, como la adenosina quinasa (AK), generando las formas activas ribavirina-5'-monofosfato (RMP), ribavirina-5'-difosfato (RDP) y ribavirina-5'-trifosfato (RTP). La RBV se ha utilizado, debido a sus mecanismos de acción contra los virus ARN, para tratar infecciones por el VHC, virus de fiebre hemorrágica o infección por el virus respiratorio sincitial y también para tratar la infección crónica por el VHE. Entre estos mecanismos de acción destacamos la inhibición de la actividad replicativa de la ARN polimerasa ARN dependiente, el bloqueo de la síntesis de ARN, la estimulación de las células T reguladoras y el incremento de la tasa de error y extinción del virus mediante mutagénesis letal ¹²¹⁻¹²⁴. Algunos estudios han demostrado que se trata de un fármaco mutagénico, capaz de alterar la estructura del ARN viral ¹²⁵. Recientemente se

han reportado mutaciones en la ARN polimerasa ARN dependiente ¹²⁶⁻¹²⁸ que pueden originar fallo al tratamiento en pacientes trasplantados con órgano sólido ^{126,128}. Este carácter mutagénico se ha descrito in vivo, identificándose mutaciones asociadas con la replicación viral, la sensibilidad a la RBV y la capacidad infectiva del virus como son Y1320H, K1383N, D1384G, K1398R, V1479I, Y1587F y G1634R ^{126,128,129}.

El IFN también ha mostrado su eficacia sobre el VHE, básicamente en pacientes trasplantados con infección crónica. Sin embargo, su bajo perfil de seguridad, con múltiples efectos adversos, y sobre todo el riesgo de inducir rechazo en los sujetos trasplantados ha limitado enormemente su uso como antiviral para el VHE ^{130,131}.

Más recientemente se ha testado en un pequeño ensayo clínico la posible eficacia del sofosbuvir, un antiviral de acción directa contra el VHC, observándose una falta de respuesta en 9 pacientes que habían fracasado a tratamiento previo con RBV o con contraindicación para la misma ¹³².

En este sentido, la persistencia de la infección por VHE en pacientes con inmunosupresión requiere de un estudio en profundidad para identificar la posible selección de mutaciones de resistencia y descartar si se ha producido reinfección. Estos

estudios se pueden llevar a cabo mediante el uso de técnicas de alto rendimiento que permitan comparar las secuencias virales que componen la población de virus que infectan a un paciente en diferentes aislados.

1.7 Variabilidad intragenómica y mutaciones

Algunos estudios han demostrado que las secuencias genómicas del VHE son bastante estables ¹³³, con una alta homología genómica entre secuencias de un mismo brote, y estudios de pasajes celulares en modelos animales no han demostrado deriva genética ²⁵.

Sin embargo, la tasa de fijación de mutaciones o tasa de evolución para el VHE se ha estimado que es de $1,4-1,75 \times 10^{-3}$ sustituciones/ciclo replicativo /año, la cual es similar a la reportada para el VHC ($1,5 \times 10^{-3}$) ⁵⁶. La tasa de error difiere a lo largo del genoma, donde algunas regiones como la región hipervariable en el ORF1 son altamente polimórficas. La alta variabilidad y la selección de mutaciones en el genoma del VHE puede explicarse por los procesos de transcripción, la selección por los fármacos antivirales y la respuesta inmune del huésped ¹³⁴.

Esta elevada cinética de replicación y mutabilidad da lugar a una distribución de variantes denominada quasiespecies, que se

define como una población viral formada por un conjunto de mutantes cada uno de ellos distinto de los demás, pero estrechamente relacionados entre sí. La quasispecies como conjunto constituye una unidad de selección sujeta a una continua variación genética, competición y selección siguiendo los principios evolutivos de Darwin¹³⁵ y actúa como un reservorio que alberga un amplio espectro de variantes otorgando al virus una gran capacidad adaptativa^{136,137}. Este espectro de mutantes está dominado por una secuencia máster, aquella que se encuentra en mayor frecuencia por su mayor capacidad replicativa o fitness^{138,139}. Además, también se define una secuencia consenso, representada por el nucleótido más frecuente en cada posición, que puede diferir de la secuencia máster y que puede, o no, estar representada dentro del espectro¹⁴⁰.

La distribución en quasispecies refleja un equilibrio entre la preservación de información genética esencial y la continua generación y selección de mutantes que confieren una ganancia de eficacia biológica al virus.

En este sentido, los estudios de epidemiología molecular que pretendan demostrar transmisión nosocomial o bien discernir entre reinfección o reactivación de la infección, no pueden llevarse a cabo comparando la secuencia consenso de los

diferentes aislados, puesto que la información estará limitada, sino que es necesario comparar la población de virus de cada aislado, y esto se consigue aplicando las técnicas de secuenciación masiva o NGS (*next-generation sequencing*).

1.8 Aplicaciones de la secuenciación masiva en virología

El desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha supuesto un cambio revolucionario en el campo de la genómica, ya que permite generar millones de secuencias en una sola carrera, reduciendo considerablemente el coste por nucleótido secuenciado ¹⁴¹. El uso de la secuenciación masiva resulta especialmente prometedor en el terreno de la virología y tiene aplicaciones importantes en algunos aspectos generales como 1) la identificación y caracterización de nuevas especies virales y su asociación con patologías nuevas o ya existentes, 2) caracterizar la composición de viromas en un nicho determinado, 3) analizar la distribución epidemiológica de los virus en la población general y las diferentes cepas existentes mediante estudios filogenéticos ¹⁴², 4) entender la biología genética de los virus, así como su evolución, diversidad, transmisión, patogénesis e impacto sobre la progresión de las enfermedades ¹⁴³, 5) estudiar el tropismo de los virus e identificar los reservorios y mecanismos de patogenicidad.

En lo que refiere a la práctica clínica, la secuenciación masiva es una herramienta potente en la detección de variantes minoritarias resistentes presentes en la población viral, así como el impacto de éstas en el tratamiento antiviral o en su transmisión^{126,127,129}. La información obtenida después cada estudio de NGS, requiere de un desarrollo de algoritmos bioinformáticos específicos para cada problema que se pretenda resolver.

Hipótesis y objetivos

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

La mejora en la evaluación de los marcadores diagnósticos y de seguimiento de infección en heces y plasma va a permitir una toma de decisión más acertada para el tratamiento de los pacientes infectados de manera crónica por el VHE.

La detección de IgM anti-VHE no es un marcador óptimo para el diagnóstico de infección aguda por el VHE. El seguimiento de la infección crónica por VHE basado en la detección del RNA-VHE en plasma es insuficiente para definir la curación de la hepatitis crónica E y no predice en que pacientes la infección por VHE va a recaer una vez finalizado el tratamiento con RBV.

2.2 Objetivos

- 1- Estudiar si la detección de IgM es un buen marcador de infección aguda, comparando si existen diferencias en la isoforma de IgM detectada en fase aguda y en la infección crónica por el VHE.
- 2- Determinar si la cuantificación del ARN-VHE en heces es una herramienta útil de seguimiento de pacientes con infección crónica E en el tratamiento con RBV y predecir las recaídas.
- 3- Identificación de partículas virales de VHE en muestras de plasma y heces de pacientes con infección aguda e infección crónica por el VHE mediante técnicas de *Next-Generation Sequencing*.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1 Pacientes

Para el presente estudio se analizaron un total de 32 muestras basales pareadas de plasma y heces procedentes de un total de seis pacientes con infección por el VHE, tres con infección aguda por VHE (Paciente, Px.1, Px.2 y Px.3) y tres con infección crónica (Px.4-6), del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Las muestras de sangre con EDTA se centrifugaron durante 15 minutos a 1500g y se extrajo el plasma. Las cargas virales en las muestras de plasma de los pacientes se expresan en UI/ml. Para el tratamiento de las heces, se resuspendió 1 gr de heces en 10 ml de PBS (1x), se centrifugó a 1500g durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante. Asumiendo que 1ml de plasma pesa 1gr y teniendo en cuenta el volumen de la resuspensión de las heces, las cargas virales en heces de los pacientes se expresan en UI/ml. Para cada paciente se solicitó información clínica, y ésta se introdujo en una base de datos anonimizada para su posterior análisis. Las muestras de plasma y de heces fueron codificadas y almacenadas a -80°C.

3.2 Determinación de la isoforma de la IgM en infección aguda e infección crónica por VHE

La presencia de IgM en pacientes con infección crónica por VHE así como en muestras de individuos con infección aguda mucho tiempo después de superar dicha infección, planteaba la posibilidad de que se tratara de posibles isoformas de IgM diméricas tal y como se ha demostrado para otras infecciones virales ¹⁴⁴. Para explorar esta posibilidad se analizaron dos muestras de plasma correspondientes a una infección crónica persistente previa a iniciar su tercer tratamiento con RBV y una infección aguda autoresuelta por VHE un mes y medio después de ser diagnosticada y con ya ARN indetectable en la misma. Se prepararon gradientes de densidad continuos de sacarosa 10-30% con 5 fracciones de 10, 15, 20, 25 y 30% de sacarosa y se almacenó O/N. Las muestras se diluyeron 1:3 con PBS (1x) y se concentraron mediante centrifugación durante 15 minutos a 1000 rpm. Se trasasó el sobrenadante y se centrifugó durante 30 minutos a 10000 rpm. Posteriormente el sobrenadante (300 µl) se depositó sobre la superficie del gradiente. Los gradientes se ultracentrifugaron durante 20 horas a 40000 rpm a 4°C en el rotor basculante TH-641 de la ultra centrifuga CP100NX (Eppendorf Himac Technologies, Japan). Se recogieron fracciones de 0,5 ml en

las que se midió la densidad y se llevó a cabo la determinación de IgM, mediante un test ELISA (Mikrogen, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3 Determinación de ARN viral en muestras de plasma y heces de pacientes con infección aguda y crónica

Por cada paciente se recogieron cinco muestras pareadas de plasma y heces (a excepción del Px.1 con tres muestras pareadas). En el caso de los pacientes con infección crónica se obtuvieron: muestra basal, muestra a las cuatro semanas post inicio tratamiento, doce semanas post inicio tratamiento y la última muestra previa a finalizar el tratamiento. Se midió el ARN viral por PCR a tiempo real (COBAS 6800, Roche Diagnostics) con un límite de detección de 18,6 UI/ml. El ARN viral se cuantificó utilizando el estándar internacional de la OMS (código 6329/10, 2500000 UI/ml)¹⁴⁵ El análisis se realizó con el programa R¹⁴⁶. Los resultados se compararon con test no paramétricos. Las diferencias se consideraron significativas a un valor de $p < 0,05$. La carga viral ARN VHE en plasma se determinó de forma directa en el sistema 6800, mientras que en heces se refirió a gr de heces teniendo en cuenta el volumen de resuspension en PBS. Para comparar las cargas virales de plasma y heces se asumió que 1 gr de heces una vez

efectuada la conversión por el efecto dilutorio de la resuspension, correspondía a 1 ml de volumen.

3.4 Identificación de partículas virales y vesículas extracelulares (EVs) en muestras de plasma y heces de pacientes con infección aguda y crónica

Para este propósito se generaron gradientes de densidad discontinuos con iodixanol al 8, 16, 24, 32 y 40%, cada una de estas fracciones con un volumen de 2ml. Una vez generado se agregaron 2ml de plasma diluido 1:2 con PBS en la superficie del gradiente. Los gradientes se ultracentrifugaron durante 18 horas a 140000 g (286000 rpm) a 4°C con el rotor basculante TH-641 de la ultra centrifuga CP100NX (Eppendorf Himac Technologies, Japan). Se recogieron fracciones de 1 ml en las que se midió la carga viral, el VHE-Ag y la densidad, seleccionándose cinco fracciones de gradientes de plasma y heces para realizar criomicroscopía y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Estas fracciones se seleccionaron teniendo en cuenta su carga viral.

Para obtener imágenes por TEM y criomicroscopía electrónica se diluyó la muestra 1:3 en PBS (1x) y se ultracentrifugó durante 4 horas a 100000 g (24200 rpm) a 4°C con el rotor basculante TH-

641 de la ultra centrífuga CP100NX (Eppendorf Himac Technologies, Japan). Se desechó el sobrenadante por decantación y el pellet se resuspendió en 50 μ l de PBS (1x).

Para la TEM se colocaron 8 μ l en una rejilla TEM durante 1 minuto y se añadieron 8 μ l de acetato de uranilo (2%) antes de escurrirla con papel de filtro. Esta rejilla se depositó en un microscopio JEM-400 (JEOL USA, Pleasanton, CA, EE. UU.) de transmisión de electrones a 120 KV para la obtención de imágenes.

Para la criomicroscopía electrónica se depositó la muestra en una rejilla de cobre de malla 400, dispuesta en un émbolo (Leica EM GP). La suspensión se vitrificó por inmersión rápida en etanol líquido (-179°C) y se montó en un sistema de crio-transferencia Gatan 626 para su posterior inserción en el microscopio. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio crioeléctrico Jeol JEM 2011 operado a 200 KV. El protocolo para la realización de las imágenes por criomicroscopía y TEM lo llevó a cabo Martí de Cabo Jaume, técnico superior del Servicio de Microscopía de la Universidad Autónoma de Barcelona.

También se llevó a cabo un protocolo de aislamiento de EVs en fracciones de gradientes seleccionados y muestras basales de heces de los seis pacientes utilizando el MegCapture Exosome

Isolation Kit PS (Wako, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este protocolo de aislamiento se basa en la unión de la inmunoglobulina TIM4 (en inglés, *T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing protein 4*) a la fosfatidilserina, uno de los conocidos componentes presente en las membranas de EVs. A las *beads* magnéticas que contiene el kit se les añade el receptor TIM4 en su exterior, capaz de unirse a EVs en muestras de sobrenadantes de cultivo y suero en presencia de calcio, y liberarlos cuando se eluyen con un tampón con agentes quelantes^{147,148}.

Se trata de un protocolo fácilmente utilizado para la purificación de EVs por centrifugación como formas intactas, pues permite el uso de los EVs obtenidos en otras aplicaciones como TEM, análisis de nanopartículas, análisis moleculares, etc.

A partir de este protocolo se obtuvo:

- Eluido: EVs extraídos con el protocolo los cuales se han unido satisfactoriamente a las *beads* magnéticas (unión de TIM4 a la fosfatidilserina), y se han purificado (y separados de las *beads*) con tampón de lavado ya dispuesto en el kit comercial.

- Sobrenadante (SN): en la sección de lavado del protocolo de aislamiento, se conservó el SN del último lavado previo a obtener las *beads* magnéticas unidas a EVs, con el fin de recuperar los posibles EVs remanentes en el SN que no se hubieran unido satisfactoriamente a las *beads* magnéticas.

El protocolo también se llevó a cabo modificando la sección de preparación de la muestra, omitiendo la incorporación del receptor TIM4 a las *beads* magnéticas y por tanto imposibilitando la unión de las EVs a éstas. Esta modificación del protocolo se realizó con el objetivo de visualizar si existía unión no específica de EVs a las *beads* magnéticas.

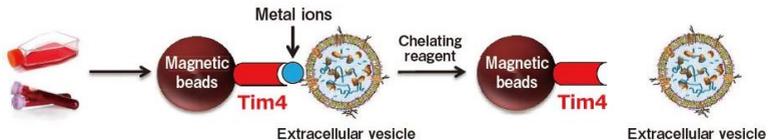


Figura 5: Esquema del procedimiento del kit el MegCapture Exosome Isolation de aislamiento de EVs. Imagen modificada de <https://labchem-wako.fujifilm.com/us/category/01118.html>.

También se cuantificó la carga viral por PCR a tiempo real, qRT-PCR (COBAS 6800, Roche Diagnostics) y se analizó el VHE-Ag mediante ELISA específico (Wantai Biopharmaceutical, Beijing, China) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La

densidad se obtuvo midiendo la absorbancia de las fracciones por espectrofotometría mediante el sistema Nanodrop (Thermo Fischer Scientific) y utilizando la siguiente fórmula para crear una recta patrón con la cual deducir las densidades de las fracciones de los gradientes:

$$d = \frac{(V_i \times d_m) + (V_{di} \times d_{di})}{(V_i + V_{di})}$$

donde,

d = densidad

V_i = volumen iodixanol

d_m = densidad de la muestra

V_{di} = volumen diluyente

d_{di} = densidad diluyente

3.5 Estudio de diversidad y complejidad de quasiespecies por NGS (*Next-generation sequencing*)

3.5.1 Extracción del ARN viral

El ARN viral fue extraído a partir de muestras de plasma y/o heces (previamente disueltas 1:10 en PBS (1x) según el procedimiento descrito en el apartado anterior) mediante extracción manual con

QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.2 Retrotranscripción y amplificación del genoma viral

RT-PCR

Para la reacción de la retrotranscripción y amplificación se usó el kit Transcriptor One Step reverse RT-PCR kit (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). Se amplificaron dos regiones: el ORF2, un total del 1,1kb; y parte del ORF1, con un total de 2kb.

La región del ORF2 se amplificó con los cebadores 5'-CCGACAGAATTGATTCGTCGGC -3' como cebador Fw y el cebador Rv 5'-ACTCCCGRGTYTTACCYACCTT -3'. Para esta RT-PCR se utilizaron las siguientes condiciones de reacción (Tabla 1) y programa de amplificación (Tabla 2):

Tabla 1. Condiciones de la RT-PCR para la amplificación de la región ORF2

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O	28,5
Buffer 5x	10
Cebador Fw	1,5
Cebador Rv	1,5
DMSO (5%)	2,5
Polimerasa	1
ARN	5

Tabla 2. Programa de RT-PCR usado para la amplificación de la región ORF2

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
Retrotranscripción	50	30:00	1
Desnaturalización inicial	94	07:00	1
Desnaturalización por ciclo	94	00:10	35
<i>Annealing</i>	51	00:30	
Elongación	68	01:30	
Elongación final	68	07:00	1
Conservación	4	∞	1

La región del ORF1 se amplificó con el cebador degenerado Fw 5'-TTYGAYGCTGGGARCGBAA-3' y el cebador Rv 5'-GTCTGYAGCATRCCAATAAGGTTATG-3'. Para esta RT-PCR se utilizaron las condiciones de reacción anteriores (Tabla 1) y el siguiente programa de amplificación (Tabla 3):

Tabla 3. Programa de RT-PCR usado para la amplificación de la región ORF1

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
Retrotranscripción	45	45:00	1
Desnaturalización inicial	94	07:00	1
Desnaturalización por ciclo	94	00:10	10
<i>Annealing</i>	46	00:30	
Elongación	68	02:10	25
Elongación	94	00:10	
<i>Annealing</i>	46	00:30	
Elongación	68	02:10 ¹	
Elongación final	68	07:00	1
Conservación	4	∞	1

¹ Se añaden 00:05 segundos por ciclo a partir del ciclo 1 de los 25 totales.

Nested-PCR

Para incrementar la especificidad y el rendimiento de los fragmentos deseados, se realizó una segunda amplificación usando como secuencia molde el producto de la amplificación de

la RT-PCR. La metodología de secuenciación utilizada permite tamaños de secuencia máximos de 600 nucleótidos (incluyendo los adaptadores). Por ello, se utilizaron cebadores para fragmentos de tamaños no superiores a 500 nucleótidos.

En el caso de la amplificación de la región del ORF2, se amplificó una región de 412 nucleótidos con los cebadores Fw 5'-GTCGTCTCAGCCAATGGCGAGCC -3' y el cebador Rv 5'-CASARAANGTCTTNGARTACTGCT -3'. Para la Nested-PCR se usó el kit FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) con las siguientes condiciones de reacción (Tabla 4) y programa de amplificación (Tabla 5):

Tabla 4. Condiciones de la Nested-PCR para la amplificación de la región ORF2

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O	33
Buffer 10x	5
Cebador Fw	1,5
Cebador Rv	1,5
dNTPs	1
DMSO (5%)	2,5
Polimerasa	0,5
Producto primera PCR	5

Tabla 5. Programa de Nested-PCR usado para la amplificación de la región ORF2.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	04:00	1
Desnaturalización por ciclo	94	00:30	30
<i>Annealing</i>	50	00:30	
Elongación	72	00:30	
Elongación final	72	07:00	1
Conservación	4	∞	1

Para la amplificación de la región del ORF1, se amplificó un fragmento de 411 nucleótidos utilizando los cebadores Fw 5'-TGGAAGAARCA YTCYGGTGAGCC -3' y el cebador Rv 5'-GTCTGYAGCATRCCAATAAGGTTATG -3'. Para la Nested-PCR se usó el kit FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) con las condiciones de reacción descritas en la Tabla 4 y el siguiente programa de amplificación (Tabla 6):

Tabla 6. Programa de Nested-PCR usado para la amplificación de la región ORF1

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	04:00	1
Desnaturalización por ciclo	94	00:30	40
<i>Annealing</i>	χ^1	00:30	
Elongación	72	00:40	
Elongación final	72	07:00	1
Conservación	4	∞	1

¹La temperatura de la etapa de *annealing* para cada reacción de amplificación se ajustó en función de los cebadores usados, tal y como se indica en la tabla 6.

Análisis y purificación de los fragmentos amplificados por Nested-PCR

Tanto los productos amplificados como los controles negativos realizados en paralelo durante cada reacción de PCR fueron posteriormente analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con SYBR-SAFE (Invitrogen Molecular Probes). Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) y se recortaron las bandas específicas

de cada fragmento. Para la purificación de las bandas se utilizó el kit QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.3 Secuenciación de los amplicones por NGS

Para llevar a cabo la secuenciación de las muestras se usó la plataforma Illumina MiSeq System (Illumina, San Diego, CA). Con ella se utilizaron los MiSeq Reagent kit v3 (Modo 2 x 300 pb con 600 ciclos) (Illumina, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de la librería

Cuantificación y control de calidad de los amplicones purificados

Los amplicones purificados de la Nested-PCR se cuantificaron por Qubit dsDNA Assay kit (Thermo Fisher Scientific). El análisis de calidad del material genético se realizó con BioAnalyzer DNA 1000 LabChip (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Normalización de los amplicones

Los amplicones se normalizaron a una concentración de 4×10^9 moléculas/ μ l, diluyendo el tampón EB (10mM Tris-HCl, pH 8-8,5)

(Qiagen, Valencia, CA, USA). Para cada *pool* se añadió 20 µl de muestra por amplicón.

Purificación y cuantificación de cada pool de muestra

Cada *pool* fue purificado con Kappa Pure Beads (Kapa Biosystems, Roche) y cuantificado mediante Qubit dsDNA Assay kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ligación de los adaptadores

Cada *pool* se sometió a una ligación de los adaptadores SeqCap Adapter kit A/B (Nimblegen) con el fin de unir estas secuencias de índices a los amplicones para su posterior identificación mediante procesos bioinformáticos. Para cada *pool* se asignó un índice.

Secuenciación de la librería

Para la librería final se recogieron 4 µl de cada *pool* y se cuantificó por LightCycler 480 (Kapa Library Quantification kit). Para obtener una densidad de *clúster* de 900K/mm², la librería fue ajustada a una concentración de 14 pM. El control de la secuencia conocida PhiX (PhiX control V3) fue también ajustado a la misma concentración que la librería y mezclado con esta a una proporción de 20% PhiX. Este volumen se cargó en el cartucho de reactivos correspondiente para su posterior transferencia a la

placa de secuenciación o *Flow Cell*, donde los amplicones se unen a la placa mediante su secuencia de adaptador. Durante la secuenciación en paralelo de las copias, la cámara capta señales de luz generada por cada reacción de incorporación de nucleótido.

Algoritmo para el análisis de datos

Para el análisis y procesamiento de los datos generados por la plataforma MiSeq System (FastQ), se utilizaron los programas R (227) y Bioconductor (228) garantizando la integridad y calidad de las secuencias. Para los archivos FastQ se realizó un control de calidad añadido donde se excluyeron las secuencias con un valor *phred* inferior a Q30. Para el solapamiento por FLASH de los extremos de las lecturas R1 y R2 se estableció un solapamiento mínimo de 20pb con un máximo de 10% de diferencias permitidas. Todas las secuencias obtenidas (tanto secuencias de nucleótidos como de aminoácidos) se enfrentaron con la secuencia de referencia del genoma completo del VHE LC055973, de genotipo 3f. El análisis del genotipo viral se hizo mediante un análisis filogenético basado en distancias genéticas.

Estudio de la complejidad de las quasiespecies

El estudio de la complejidad de las quasiespecies del VHE es necesario debido a su capacidad de influir en la patogenia y la evolución clínica de la infección. La complejidad de una quasiespecies se define como una propiedad para cuantificar la diversidad y la frecuencia de los haplotipos independientemente del tamaño de la población viral ¹⁴⁹. Para ello, se lleva a cabo el cálculo de índices de diversidad de incidencia, de abundancia y de función.

- Índices de incidencia: son índices de riqueza o número de especies en una comunidad ¹⁴⁹. Los índices calculados han sido el número de haplotipos y número de mutaciones de cada muestra.
- Índices de abundancia: se considera las entidades observadas y su frecuencia dentro de la población. Miden diversidad o uniformidad de distribución de los haplotipos ¹⁴⁹. Se ha calculado la Entropía de Shannon (*Shannon entropy*), la cual permite medir la diversidad de la quasiespecies teniendo en cuenta la cantidad de haplotipos que se han encontrado y la frecuencia relativa

entre ellos. Los valores van de 0 (las variantes son idénticas) a 1 (todas las variantes son diferentes).

- Índices funcionales: se basan en las diferencias entre haplotipos dentro de la quasiespecie, pudiendo o no tener en cuenta la frecuencia en la que se encuentran estos. Mide cuan de diferentes son los miembros de una población ¹⁴⁹. Se ha calculado la frecuencia media de mutaciones por entidad y la diversidad nucleotídica.
 - Frecuencia media de mutaciones por entidad (*Average mutation frequency by entity*) mide la media de mutaciones detectadas por nucleótido secuenciado respecto al haplotipo dominante teniendo en cuenta la frecuencia de estas mutaciones. Cuanto más alto es el valor, mayor es la tasa de mutación ¹⁴⁹.
 - Diversidad nucleotídica (*Nucleotide diversity*) mide la heterogeneidad genética global calculando la media del número de mutaciones existentes entre cada posible pareja de haplotipos de la quasiespecie.

Los índices de diversidad comentados se realizaron para los dos amplicones secuenciados de las muestras de los seis pacientes, el amplicón del ORF1 y el amplicón del ORF2.

Resultados

4. Resultados

4.1 Determinación de la isoforma de la IgM en infección aguda e infección crónica por el VHE

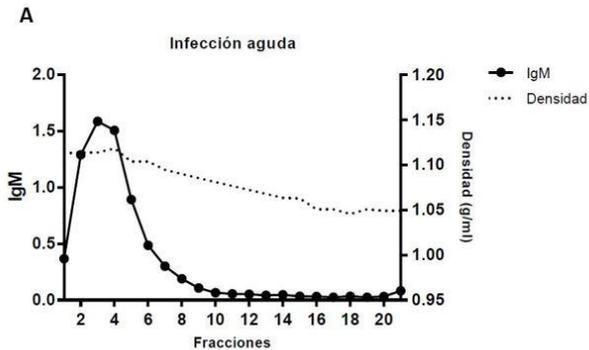
Ambos pacientes con infección aguda previa resuelta espontáneamente y con infección crónica fueron positivos para IgM Anti-VHE en plasma en la fase basal de la infección.

En el paciente con infección aguda se detectó IgM anti-VHE en plasma al inicio de la enfermedad. Sin embargo, seis meses después de una infección autolimitada sin incidentes, la IgM no era detectable. El análisis mediante gradientes de sacarosa en el estadio agudo de la enfermedad el paciente mostró una IgM predominantemente en las fracciones 2-5, con una densidad aproximada a 1,14 g/ml (Figura 6A), sugiriendo que podría tratarse de la isoforma pentamérica de la misma.

En el paciente con infección crónica E se detectó una IgM preminente en las fracciones 2-6 del gradiente, con una densidad aproximada de 1,12 g/ml en el estadio

basal de la enfermedad previo a recibir tratamiento con RBV (Figura 6B).

Por tanto, no se observaron diferencias en la densidad de la IgM entre la muestra en fase aguda de la muestra en fase crónica, sugiriendo que en ambos casos se trata de IgM pentaméricas, que corresponde a la isoforma convencional a diferencia de lo observado en otras infecciones virales en las que en los casos de infección crónica se han reportado isoformas diméricas ¹⁴⁴.



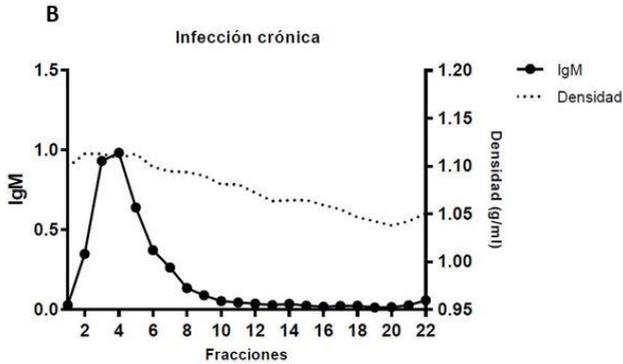


Figura 6: Determinación de la IgM Anti-VHE en gradiente de sacarosa. (A) Muestra de plasma de paciente con infección aguda. (B) Muestra de plasma de paciente con infección crónica. La densidad del gradiente se expresa en g/ml y la IgM Anti-VHE en OD 450nm.

4.2 Determinaciones de ARN viral en muestras de plasma y heces de pacientes con infección aguda y crónica

Se seleccionaron un total de seis pacientes: tres con infección aguda y tres con infección crónica. Tal como se describe en el apartado de Material y métodos, los pacientes Px.1-3 presentaron una infección aguda con curación espontánea, mientras que Px.4-6 presentaron una infección crónica: Px.4 recibió tratamiento con RBV y resolvió la infección, Px.5 fue tratado con RBV sin éxito,

y Px.6 recibió 3 ciclos de tratamiento con RBV sin éxito. Los datos clínicos de los pacientes se encuentran representados en la tabla 7.

Tabla 7: Datos clínicos de los pacientes seleccionados.

Paciente	Colesterol (mg/dl)	Ictericia	Triglicéridos (mg/dl)	IgM (OD 450nm)	IgG (OD 450nm)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	Trasplante	Cirrosis	Otras infecciones víricas
Px.1	142	1	331	+	+	1017	837	0	0	0
Px.2	87	1	287	+	+	725	773	0	0	0
Px.3	157	1	416	+	+	4095	2285	0	0	Epstein-Barr virus
Px.4	256	0	336	+	+	45	55	renal	0	Epstein-Barr virus
Px.5	198	0	96	+	+	42	36	renal	0	0
Px.6	186	0	94	-	-	129	124	unipulmonar renal	1	0

Paciente número 1, Px.1, varón de 31 años natural de Pakistán, con antecedente de tuberculosis intestinal tratada con cuadros suboclusivos de repetición en este contexto, fue diagnosticado de hepatitis aguda en marzo de 2020 a raíz de ictericia y diarreas. La IgM fue detectable en plasma, con una carga viral (ARN-VHE) de $1,6 \times 10^6$ UI/ml en plasma y $3,60 \times 10^5$ UI/ml en heces. Analítica basal mostraba una Hb 14,4 g/dl, plaquetas 276×10^9 /l, AST/ALT 899/1571 UI/l, FA/GGT 184/151 UI/l, bilirrubina total 6,65 mg/dl (directa 5,4 mg/dl).

En cuanto a comorbilidades, el paciente presentó gastroenteritis bacteriémica concomitante por Salmonella. El seguimiento analítico mostró la negativización de la carga viral posterior en tres ocasiones siendo dado de alta por curación espontánea.

Paciente 2, Px.2, de 39 años, varón natural de Pakistán, sin hábitos tóxicos ni antecedentes de interés presentó un cuadro de ictericia cutaneomucosa un mes después de su vuelta de Pakistán, siendo diagnosticado de hepatitis aguda E, con IgM positiva y ARN viral en plasma de $5,7 \times 10^5$ UI/ml y $2,40 \times 10^7$ UI/ml en heces. Basalmente presentaba Hb 16,4 g/dl, plaquetas 165×10^9 /l AST/ALT

495/768 UI/l, FA/GGT 171/150 UI/l, bilirrubina total 15 mg/dl (directa 10,8 mg/dl).

Paciente 3, Px.3, varón de 66 años de nacionalidad española, fumador, con hábito enólico de 60 g/día, con antecedente de enfermedad por reflujo gastroesofágico y úlcera duodenal, que ingresó en febrero de 2020 por hepatitis colestásica (AST 3312, ALT 5147 UI/L, con bilirrubina total de 8 mg/dL, sin coagulopatía) siendo diagnosticado de hepatitis aguda E, con una carga viral en plasma 5×10^5 UI/ml y 1×10^5 UI/ml en heces. La exploración ecográfica mostró esteatohepatitis moderada-severa. Presentó una buena evolución sin requerimiento de tratamiento antiviral con negativización de la carga viral en plasma y heces.

Paciente 4, Px.4, mujer, de 53 años de nacionalidad española trasplantada renal por insuficiencia renal crónica, inmunosuprimida con micofenolato, ciclosporina y corticoides, con cirrosis hepática descompensada por VHE (elasticidad 60 kPa y ascitis). Basalmente: plaquetas 222×10^9 /l, filtrado glomerular 35 ml/min, bilirrubina 6 mg/dl, AST/ALT 55/45 UI/ml, con ARN viral en plasma $5,2 \times 10^6$ UI/ml y 4×10^7 UI/ml en

heces. Se inició RBV a dosis de 400 mg/día. Tras 2 muestras ARN-VHE indetectables en heces se suspendió RBV después de 12 semanas de tratamiento. El ARN VHE se ha mantenido indetectable en controles posteriores.

Paciente 5, Px.5, varón español de 25 años, trasplantado renal en dos ocasiones, un primer trasplante renal en 2011 por hipoplasia renal con necesidad de retrasplante en 2013 por trombosis y rechazo agudo, inmunosuprimido con tacrólimus, micofenolato y everólimus. Diagnosticado de infección aguda por VHE en 2018 sin signos de cirrosis hepática por fibroscan (elasticidad 6,6 kPa) o ecografía. Con una carga viral de ARN-VHE en plasma de $8,1 \times 10^5$ UI/ml y $8,6 \times 10^7$ UI/ml en heces, inició tratamiento con RBV durante 12 semanas 600 mg/día sin respuesta. Posteriormente se retrató con RBV 800 mg/día con aumento de dosis a 1000 mg tras 24 semanas por repunte de la carga viral, sin éxito. Previo al tratamiento, presentaba Hb 15 g/dl, plaquetas 251×10^9 /l AST/ALT 51/76UI/l FA/GGT 158/29 UI/l, bilirrubina total/directa 0,68/0,3 mg/dl. Se encuentra actualmente pendiente de decidir nueva pauta de retratamiento.

Paciente número 6, Px.6, varón de 70 años de nacionalidad española con antecedente de trasplante unipulmonar derecho por fibrosis pulmonar idiopática y trasplante renal en 2007 por glomerulonefritis extracapilar, inmunosuprimido con tacrólimus, micofenolato y corticoides. Fue diagnosticado de infección crónica por VHE a raíz de hipertransaminemia (AST/ALT 115/150 UI/l) en octubre de 2012, con determinación persistentemente positiva de IgM y ARN de VHE en plasma. Basalmente, presenta Hb 14 g/dl, plaquetas $60 \times 10^9/l$ FA 68 UI/l, GGT 92 UI/l, bilirrubina total/directa 0,6/0,3 mg/dl, albúmina 3,6 g/dl. Elastografía por fibroscan inicial de 16kPa. Inició tratamiento con RBV ajustada a función renal (200 mg/día) en diciembre de 2012 completando 12 semanas con recidiva posterior en 2015, habiendo recibido hasta 3 ciclos (posteriormente realizó 24 semanas con dosis alternas de 200 y 400 mg al día) sin conseguir negativizar la carga viral en sangre ni en heces. El último ciclo de tratamiento se inició con una carga viral en plasma de $1,5 \times 10^7$ UI/ml y $4,94 \times 10^7$ UI/ml en heces. Actualmente en fase de cirrosis (fibroscan de 38kPa), no ha

presentado episodios de descompensación. Se encuentra pendiente de plantear nueva estrategia de tratamiento antiviral. La evolución de la infección por VHE y los tratamientos con RBV del paciente se encuentran representados en la Figura 7.

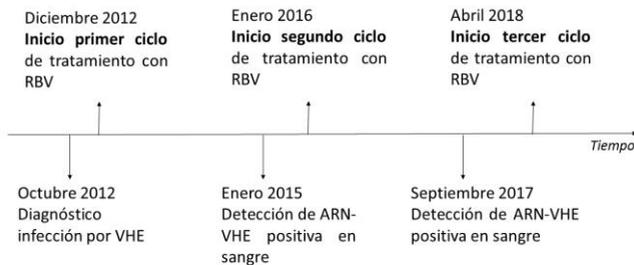


Figura 7: representación gráfica de la evolución de la infección por VHE del Px.6 y de los diferentes ciclos de tratamiento con RBV a los que fue sometido el paciente.

De cada paciente se recogieron y analizaron un total de 5 muestras de plasma y 5 muestras de heces, a excepción de los pacientes Px.4 y Px.6, de los cuales se recogieron 9 y 3 muestras pareadas de plasma y heces, respectivamente. Las cargas virales en las muestras se encuentran representadas en la Tabla 8.

Tabla 8: Cargas virales (CV) en plasma y heces. En los pacientes con infección crónica. Se indica las CV en muestra basal, 4 semanas (w) post inicio tratamiento (tto), 12w post inicio tto y muestra previa a finalizar el tto. CVs expresadas en UI/ml.

Infección	Paciente	Plasma	Heces	Tratamiento
Aguda	Px.1	1,60x10 ⁶	3,60x10 ⁶	NP*
		5,20x10 ³	1,40x10 ⁴	
		0	0	
		0	0	
		0	0	
Aguda	Px.2	5,70x10 ⁵	2,40x10 ⁸	NP*
		1,20x10 ³	4,40x10 ³	
		4,70x10 ¹	0	
		0	0	
		0	0	
Aguda	Px.3	5,40x10 ⁵	1,00x10 ⁶	NP*
		3,70x10 ⁴	8,30x10 ⁴	
		5,20x10 ²	0	
		0	0	
		0	0	
Crónica	Px.4	5,20x10 ⁶	4,00x10 ⁸	Basal
		2,30x10 ⁵	4,90x10 ⁸	
		6,00x10 ⁵	1,70x10 ⁷	
		2,00x10 ⁴	1,20x10 ⁷	
		8,50x10 ¹	6,00x10 ⁵	4 semanas
		7,50x10 ¹	3,40x10 ⁴	
		7,90x10 ¹	1,87x10 ²	
		0	0	12 semanas
		0	0	Fin
		Px.5	8,10x10 ⁵	8,60x10 ⁸
3,30x10 ²	1,93x10 ⁵		4 semanas	

Resultados

Crónica		3,50x10 ¹	9,86x10 ³	12 semanas
		1,10x10 ³	2,02x10 ⁵	
		1,50x10 ⁵	7,39x10 ⁷	Fin
<hr/>				
Crónica	Px.6	1,50x10 ⁷	4,94x10 ⁸	Basal
		9,20x10 ⁴	2,34x10 ⁸	12 semanas
		8,20x10 ⁴	9,67x10 ⁷	Fin

**NP, no procede*

Se llevaron a cabo varios análisis confrontando las muestras entre sí mediante el uso del test no paramétrico de Wilcoxon.

Se analizaron las cargas virales de las muestras de plasma frente a las muestras de heces de ambos tipos de infección (aguda y crónica). Según el test no paramétrico de Wilcoxon, existen diferencias significativas entre las cargas virales en heces, con una media de $9,14 \times 10^7$ UI/ml, frente a las cargas virales en plasma, con una media de $7,79 \times 10^5$ UI/ml, con un p-valor $< 0,0001$ (Figura 9).

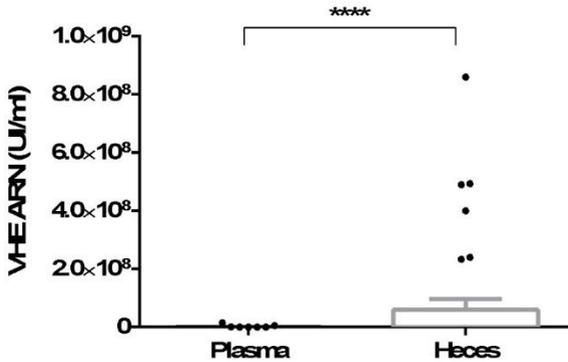


Figura 9: Comparativa entre las muestras de plasma y las muestras de heces de los seis pacientes. Se usó el test no paramétrico de Wilcoxon para hacer la comparativa entre muestras.

Se compararon las cargas virales en plasma y heces de los pacientes con infección aguda. El test no paramétrico de Wilcoxon determinó que existen diferencias significativas (p -valor=0,03) entre las cargas virales en heces frente a las cargas virales en plasma, con unas medias de $1,6 \times 10^7$ y $1,8 \times 10^5$ UI/ml respectivamente (Figura 10).

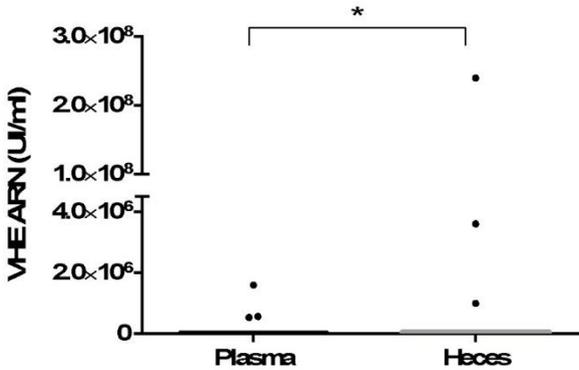


Figura 10: Comparativa de las muestras de plasma y heces de los pacientes con infección aguda. Se usó el test no paramétrico de Wilcoxon para hacer la comparativa entre muestras.

De la misma forma, se analizaron las cargas virales en plasma y en heces de los pacientes diagnosticados con infección crónica. Según el test no paramétrico de Wilcoxon existen diferencias significativas entre las cargas virales en heces frente las cargas virales en plasma (p -valor $<0,0001$), con unas medias de $1,5 \times 10^8$ UI/ml y $1,3 \times 10^6$ UI/ml, respectivamente (Figura 11).

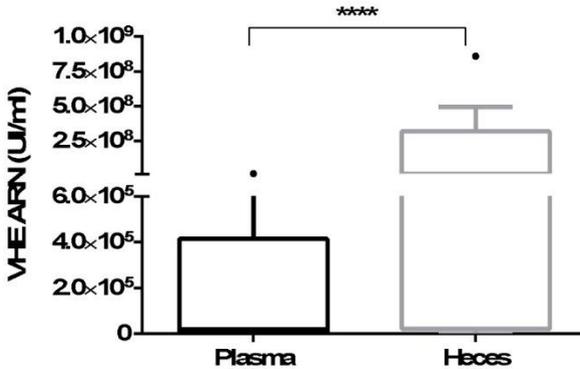
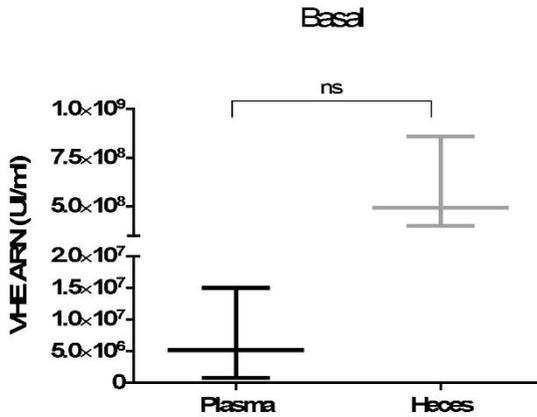


Figura 11: Comparativa de las muestras de plasma y heces de los pacientes con infección crónica. Se usó el test no paramétrico de Wilcoxon para hacer la comparativa entre muestras.

En los pacientes con infección crónica por el VHE que fueron tratados con RBV, se analizaron las cargas virales en plasma y en heces en diferentes tiempos al iniciar y durante el tratamiento con RBV: muestra basal, 12 semanas de tratamiento y fin de tratamiento; sin tener en cuenta la dosis de RBV diaria. No se pudieron analizar las cargas virales en plasma y heces a 4 semanas de tratamiento debido a la falta de datos. El test de Wilcoxon determinó que no existen diferencias significativas entre las cargas virales en plasma y heces independientemente del momento de extracción de la

muestra durante el tratamiento (p -valor $>0,05$) (Figura 12). Estos resultados son debido al bajo número de muestras: al tratarse de tres pacientes con infección crónica solo se obtienen 3 datos para cada tiempo del tratamiento, suficientes para poder realizar el análisis pero no como para que las diferencias observadas sean significativas.



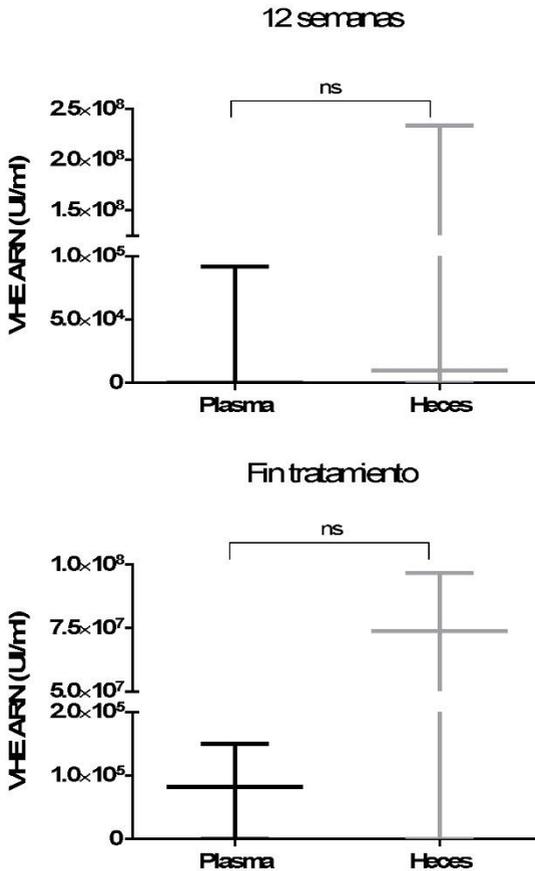


Figura 12: Comparativa de las muestras de plasma y heces según el momento de tratamiento siendo muestra basal previa al tratamiento, 12 semanas de tratamiento y fin de tratamiento. Se usó el test no paramétrico de Wilcoxon para hacer la comparativa entre muestras.

Se compararon las muestras de plasma de los pacientes con infección aguda frente a las muestras de plasma de

los pacientes con infección crónica. El test de Wilcoxon determinó que no existen diferencias significativas entre las cargas virales de éstas (Figura 13).

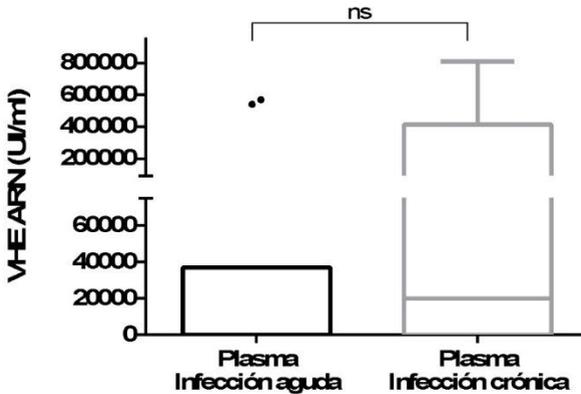


Figura 13: Comparativa entre las muestras de plasma de los pacientes con infección crónica y las muestras de plasma de los pacientes con infección aguda. Se usó el test no paramétrico de Wilcoxon para hacer la comparativa entre muestras.

Además, se compararon las muestras de heces de los pacientes con infección aguda frente a las muestras de heces de los pacientes con infección crónica. El test no paramétrico de Wilcoxon determinó que existen diferencias significativas (p -valor $<0,05$) entre éstas. (Figura 14).

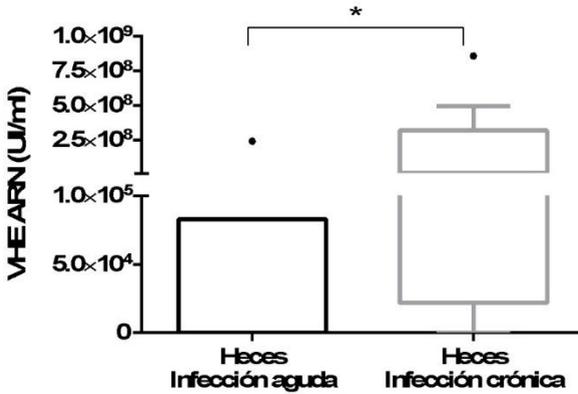


Figura 14: Comparativa de las muestras de heces de los pacientes con infección crónica y pacientes con infección aguda. Se usó el test no paramétrico de Wilcoxon para hacer la comparativa entre muestras.

También se analizaron mediante el test no paramétrico de Wilcoxon las cargas virales de heces y plasma de cada paciente de manera individual. El Px.1 no mostró diferencias significativas entre plasma y heces (p -valor $> 0,05$), con medias de $3,27 \times 10^5$ y 2×10^5 UI/ml respectivamente (Figura 15).

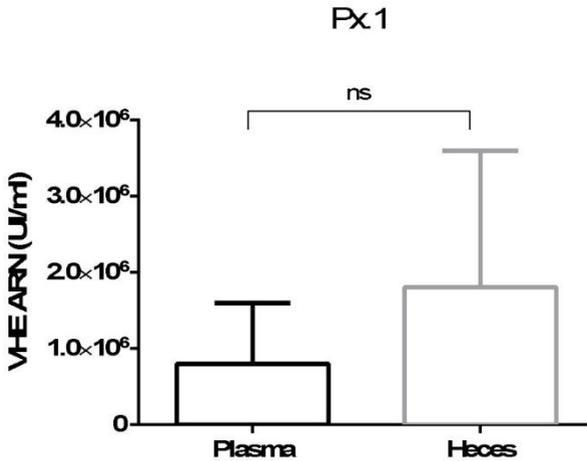


Figura 15: Análisis comparativo de las cargas virales de las muestras de plasma y de heces del Px.1. Se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon para realizar el análisis. ns: no significativo.

El Px.2 no mostró diferencias significativas entre las cargas virales de los dos tipos de muestra, con una media de $4,8 \times 10^7$ UI/ml en heces y $1,1 \times 10^5$ UI/ml en plasma (Figura 16).

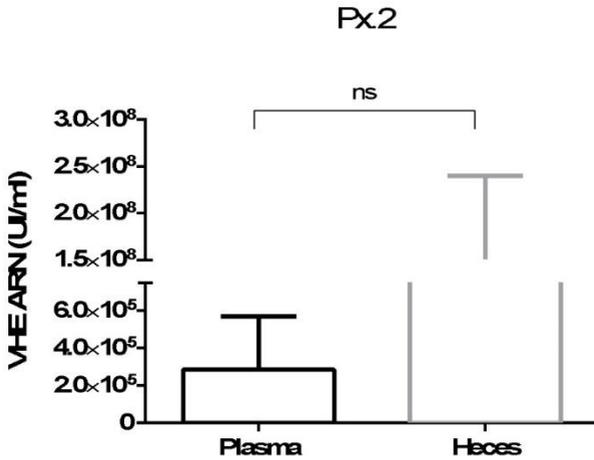


Figura 16: Análisis comparativo de las cargas virales de las muestras de plasma y de heces del Px.2. Se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon para realizar el análisis. ns: no significativo.

El Px.3, tampoco manifestó diferencias significativas entre heces y plasma (p -valor $>0,05$), con una media de $2,1 \times 10^5$ y $1,1 \times 10^5$ UI/ml respectivamente (Figura 17).

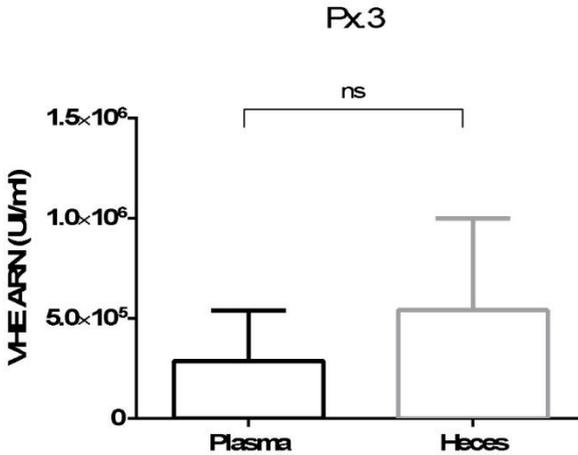


Figura 17: Análisis comparativo de las cargas virales de las muestras de plasma y de heces del Px.3. Se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon para realizar el análisis. ns: no significativo.

En cuanto a los pacientes con infección crónica, según el test no paramétrico de Wilcoxon la Px.4 mostró diferencias significativas entre las cargas virales en plasma y heces (p -valor=0,01) con unas medias de $6,7 \times 10^5$ y $1,02 \times 10^8$ UI/ml respectivamente (Figura 18).

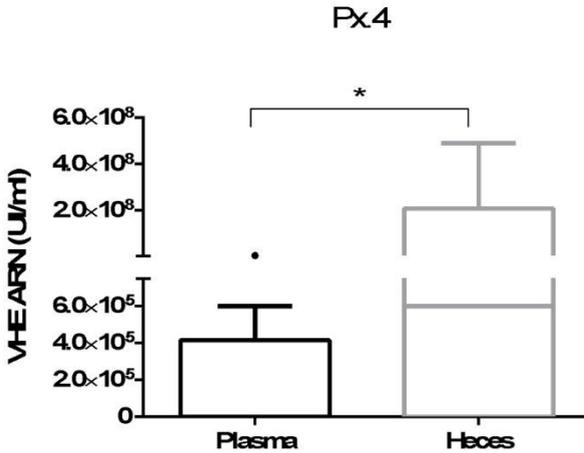


Figura 18: Análisis comparativo de las cargas virales de las muestras de plasma y de heces del Px.4. Se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon para realizar el análisis. *p-valor=0,01.

El Px.5 no manifestó diferencias significativas entre las cargas virales de las muestras de plasma y de heces (p-valor>0,05) con medias de $1,9 \times 10^5$ y $1,8 \times 10^8$ UI/ml respectivamente (Figura 19).

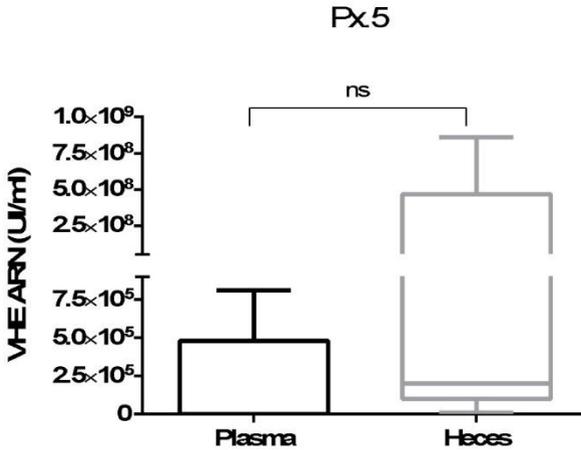


Figura 19: Análisis comparativo de las cargas virales de las muestras de plasma y de heces del Px.5. Se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon para realizar el análisis. ns, no significativo.

Por último, el Px.6 no mostró diferencias significativas entre las cargas de sus muestras de plasma y heces (p-valor > 0,05) con medias de $2,7 \times 10^7$ y $5,05 \times 10^7$ UI/ml respectivamente (Figura 20).

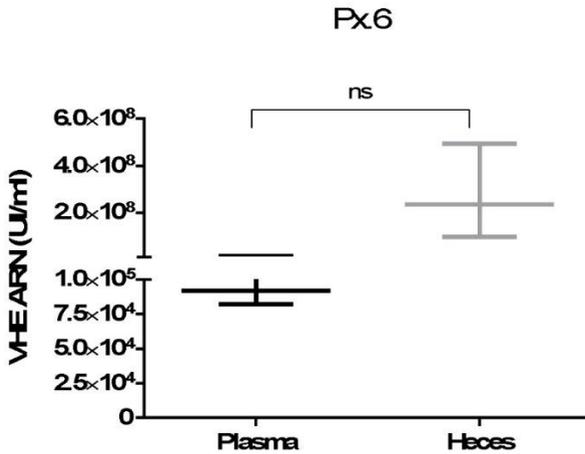


Figura 20: Análisis comparativo de las cargas virales de las muestras de plasma y de heces del Px.6. Se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon para realizar el análisis. ns: no significativo.

4.3 Identificación de partículas virales en muestras de plasma y heces de pacientes con infección aguda y crónica.

4.3.1 Descripción general de patrones ARN-VHE y VHE-Ag en gradientes de iodixanol.

Se obtuvieron 12 gradientes, dos gradientes por paciente correspondientes a la muestra basal de plasma y la muestra basal de heces. Se midió la carga viral de VHE, la densidad y el VHE-Ag en cada uno de los gradientes realizados.

Globalmente se observaron picos de señal correspondientes a ARN-VHE en las fracciones 4-6 y fracciones 8-10 indicando la presencia de partículas virales de VHE a las densidades esperadas reportadas previamente por Nagashima et al ¹⁵⁰. En contraste, el VHE-Ag apareció distribuido homogéneamente por todo el gradiente sin picos marcados, a diferencia del ARN-VHE.

En el Px.1 (Figura 21) la muestra de plasma (ARN-VHE: $1,6 \times 10^6$ UI/ml) presentó un pico de ARN-VHE definido en la fracción 6 del gradiente, con una densidad de 1,12

g/ml y *VHE-Ag* 10,8 OD 450nm. La muestra de heces (ARN-VHE: $3,6 \times 10^5$ UI/ml) del mismo paciente dio lugar a un pico de ARN-VHE en la fracción 8 con densidad 1,19 g/ml y *VHE-Ag* 0,3 OD 450nm. Si bien el ARN VHE muestra un pico claro, esto no es así con el VHE Ag, con una distribución homogénea entre las fracciones 4 y 9, tanto en plasma como en heces. No obstante, valorando el ARN VHE como indicativo de la presencia de partículas virales con su genoma en su interior, la densidad del pico correspondiente evidencia dos formas de partículas cuyas densidades coinciden con las descritas por Nagashima et al ¹⁵⁰ con envuelta (la observada en plasma) o sin ella (observada en heces).

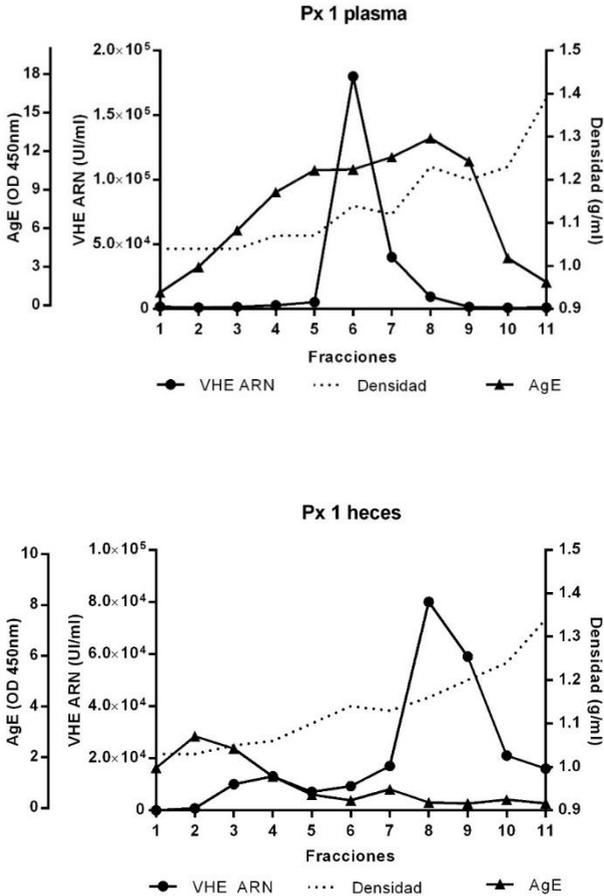


Figura 21: Representación de las cargas virales, VHE-Ag y densidad en los gradientes de iodixanol de las muestras de plasma y de heces de Px.1. El VHE-Ag y la IgM se representan en los ejes de la izquierda del gráfico. La densidad está representada en el eje derecho. Se observa un pico de ARN-VHE contundente en la fracción 6 del gradiente de la muestra de plasma y en la fracción 8 del gradiente de la muestra de

heces. El VHE-Ag se encuentra distribuido homogéneamente en ambas gráficas.

La muestra de plasma del Px.2 (Figura 22), con una carga viral de $5,7 \times 10^5$ UI/ml, dio lugar a un pico de detección de ARN-VHE en la fracción 6 con una densidad de 1,12 g/ml y VHE-Ag 1,1 OD 450nm. Sin embargo, la muestra de heces ($2,4 \times 10^7$ UI/ml), esta dio lugar a un pico en la fracción 11 con densidad de 1,39 g/ml y VHE-Ag 0,35 OD 450nm, no pudiendo descartar que se trate de un artefacto. Esta densidad (superior en heces que en plasma) sugiere un tipo diferente de partícula en ambas muestras. La distribución del VHE-Ag fue homogénea en plasma mientras que en heces ésta mostró un pico en la fracción 4 y una pendiente muy pronunciada en las fracciones finales, no pudiendo descartar que se trate de una precipitación artefactual.

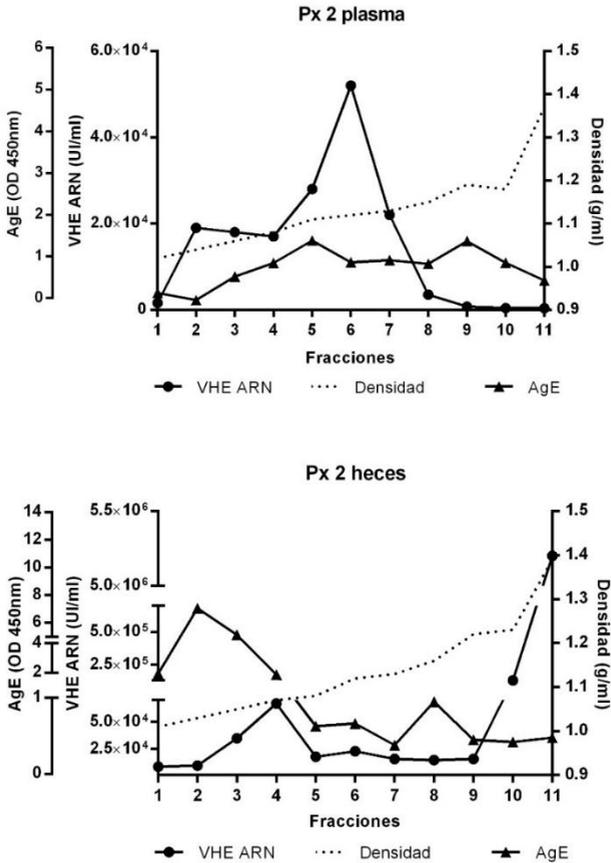


Figura 22: Representación de las cargas virales, VHE-Ag y densidad en los gradientes de iodixanol de las muestras de plasma y de heces de Px.2. El VHE-Ag y la IgM se representan en los ejes de la izquierda del gráfico. La densidad está representada en el eje derecho. Se observa un pico de ARN-VHE contundente en la fracción 6 del gradiente de la muestra de plasma y en la fracción 11 del gradiente de la muestra de heces. El VHE-Ag se encuentra distribuido homogéneamente

en la muestra de plasma, pero no en la de heces, dónde muestra un perfil descendente.

En la muestra de plasma del Px.3 (Figura 23) se observa un pico de ARN-VHE en la fracción 5 ($5,4 \times 10^5$ UI/ml) con una densidad de 1,1 g/ml y VHE-Ag 2,47 OD 450nm. En la muestra de heces (1×10^5 UI/ml) el pico de detección de ARN-VHE se dio en la fracción 10 con 1,24 g/ml de densidad y 0,42 OD 450nm VHE-Ag. Las densidades claramente diferentes de los picos de ARN-VHE entre plasma y heces sugieren dos tipos diferentes de partículas virales en estos dos tipos de muestras. Por lo que respecta al perfil del VHE-Ag, en plasma resultó homogéneo sin picos agudos mientras que en heces este perfil mostró un nivel descendente con la densidad con un valor máximo a densidades muy bajas (fracciones 1 a 4) sugestivas de no formar parte de estructuras particuladas.

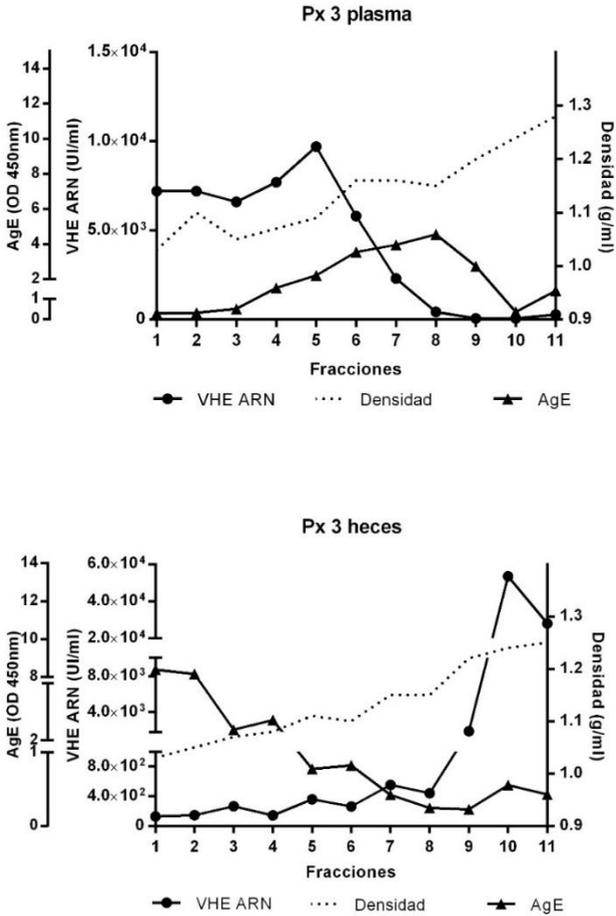


Figura 23: Representación de las cargas virales, VHE-Ag y densidad en los gradientes de iodixanol de las muestras de plasma y de heces de Px.3. El VHE-Ag y la IgM se representan en los ejes de la izquierda del gráfico. La densidad está representada en el eje derecho. Se observa un pico de ARN-VHE contundente en la fracción 5 del gradiente de la muestra

de plasma y en la fracción 10 del gradiente de la muestra de heces. El VHE-Ag se encuentra distribuido homogéneamente en la muestra de plasma. Sin embargo, en la muestra de heces se observa el VHE-Ag con un valor máximo a densidades bajas en el gradiente.

El Px.4 (Figura 24) en la muestra de plasma (ARN-VHE: $5,2 \times 10^6$ UI/ml) presentó un pico en la fracción 6 del gradiente, con una densidad de 1,1 g/ml y VHE-Ag 15,22 OD 450nm. La muestra de heces ($4,1 \times 10^7$ UI/ml) dio lugar a un intenso pico de ARN-VHE en la fracción 11, de densidad superior a 1.3 g/ml, demasiado alta para ser valorada, pudiendo tratarse de nuevo (como en Px.2), de un artefacto del gradiente en su última fracción. No obstante, se observó un valor alto de ARN-VHE en la fracción 10 con una densidad más valorable de 1,28 g/ml y VHE-Ag 3,03 OD 450nm. Los picos de ARN VHE claramente diferenciados entre plasma y heces vuelven a sugerir distintos tipos de partículas virales en estas dos muestras: menos densos en plasma que podrían corresponder a virus con envuelta, más densos en heces, que podrían corresponder a viriones sin envuelta. De nuevo el perfil de VHE-Ag fue más homogéneo sin picos claros en plasma, pero mostrando un pico a densidades bajas (fracciones 1 a 3) sugiriendo la

presencia de esta proteína fuera de estructuras virales. En heces, el VHE-Ag muestra un perfil descendiente desde las primeras fracciones del gradiente.

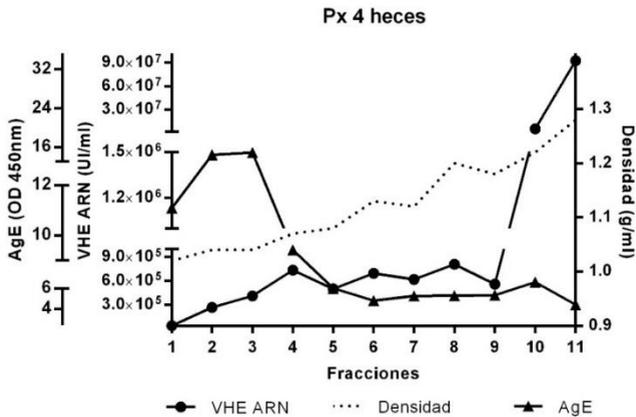
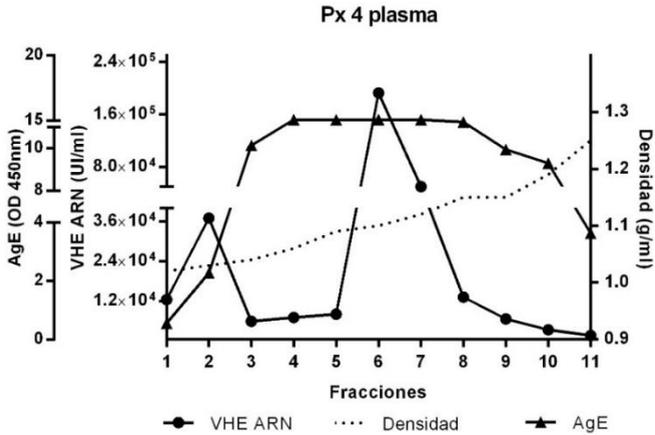
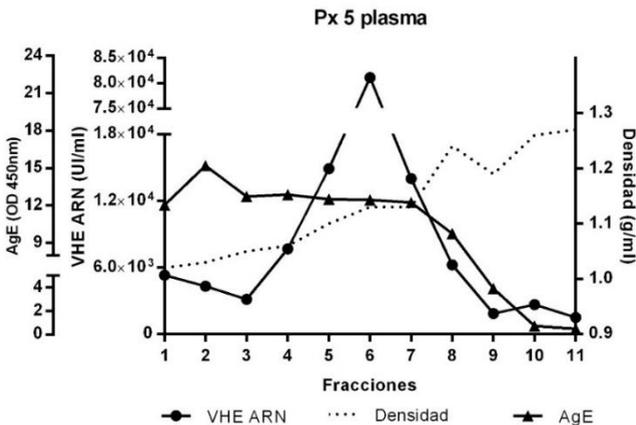


Figura 24: Representación de las cargas virales, VHE-Ag y densidad en los gradientes de iodixanol de las muestras de plasma y de heces de Px.4. El VHE-Ag y la IgM se representan en los ejes de la izquierda del gráfico. La densidad está representada en el eje derecho. Se observa un pico de ARN-VHE contundente en la fracción 6 del gradiente de la muestra de plasma y en la fracción 11 del gradiente de la muestra de heces. El VHE-Ag se encuentra distribuido homogéneamente en la muestra de plasma, con un pico en las primeras fracciones; y con un perfil descendente en la muestra de heces.

En el Px.5 (Figura 25) se observan patrones muy análogos al paciente 4: La muestra de plasma del Px.5, con una carga viral de $8,1 \times 10^5$ UI/ml, dio lugar a un pico de detección de ARN-VHE en la fracción 6 con una densidad de 1,12 g/ml y VHE-Ag 12,08 OD 450nm. En cuanto a la muestra de heces ($8,6 \times 10^7$ UI/ml), se observó un pico intenso en la fracción 10, con densidad aparente del orden de 1.25gr/mL, análogo a lo visto en Px.5, continuado en la fracción 11 con densidad de superior a 1,3 g/ml y VHE-Ag 0,7 OD 450nm, pero también un segundo pico de menor intensidad entre la fracción 3 y 4 con densidad aparente de 1.05 gr/mL compatible con formas con envuelta. Como lo observado en el paciente 4 (Px.4), los picos de ARN VHE claramente diferenciados entre plasma y heces vuelven a sugerir distintos tipos de partículas virales en estas dos muestras: menos densos

en plasma que podrían corresponder a virus con envuelta , más densos en heces, que podrían corresponder a viriones sin envuelta. Sin embargo, en este paciente se observa un segundo pico de ARN VHE a densidades inferiores (fracciones 3 a 4) sugiriendo partículas de mayor tamaño con masas muy parecidas, que podrían corresponder a vesículas extracelulares conteniendo viriones. De nuevo el perfil de VHE-Ag fue más homogéneo sin picos claros en plasma, pero mostrando un pico a densidades bajas (fracciones 1 a 3) en heces, sugiriendo la presencia de esta proteína fuera de estructuras virales.



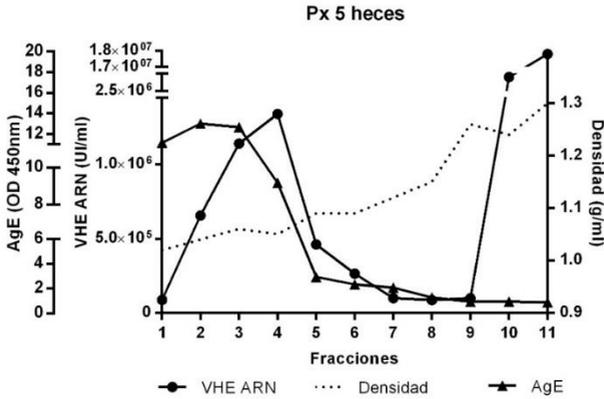
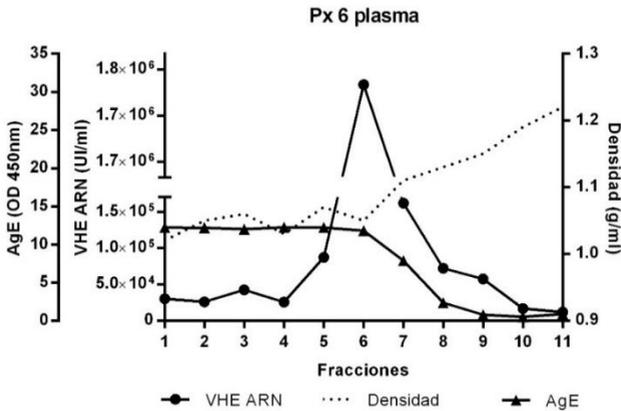


Figura 25: Representación de las cargas virales, VHE-Ag y densidad en los gradientes de iodixanol de las muestras de plasma y de heces de Px.5. El VHE-Ag y la IgM se representan en los ejes de la izquierda del gráfico. La densidad está representada en el eje derecho. Se observa un pico de ARN-VHE en la fracción 6 del gradiente de la muestra de plasma y en la fracción 10 del gradiente de la muestra de heces. El VHE-Ag se encuentra distribuido homogéneamente en la muestra de plasma, mientras que en la muestra de heces se mostró un pico en las primeras fracciones.

El Px.6 (Figura 26) mostró un pico de ARN-VHE en la fracción 6 en la muestra de plasma ($1,5 \times 10^7$ UI/ml) con una densidad de 1,09 g/ml y VHE-Ag 12,39 OD 450nm. En la muestra de heces ($4,49 \times 10^7$ UI/ml) se observaron picos de ARN-VHE muy irregulares entre las fracciones 8 y 11, correspondiendo este último a una densidad superior a 1,3 g/ml, que como se ha comentado para

otros pacientes podría ser un artefacto de la última fracción. Sin embargo, el pico de ARN-VHE en el gradiente de heces de la fracción 8 corresponde a una densidad más baja (del orden de 1.15 gr/ml) más compatible con formas con envuelta. De nuevo el perfil de VHE-Ag presenta un pico a densidades muy bajas (fracciones 2 a 3) sugiriendo no estar asociado a estructuras virales y por lo tanto podría estar presente como proteína libre.



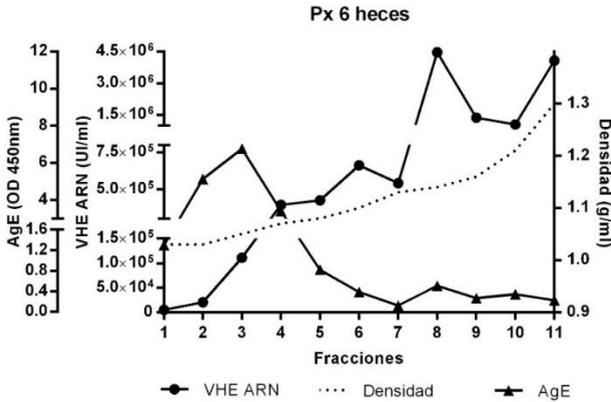


Figura 26: Representación de las cargas virales, VHE-Ag y densidad en los gradientes de iodixanol de las muestras de plasma y de heces de Px.6. El VHE-Ag y la IgM se representan en los ejes de la izquierda del gráfico. La densidad está representada en el eje derecho. Se observa un pico de ARN-VHE en la fracción 6 del gradiente de la muestra de plasma y entre las fracciones 8-11 del gradiente de la muestra de heces. El VHE-Ag se encuentra distribuido homogéneamente en la muestra de plasma, pero mostrando un pico en las primeras fracciones de la muestra de heces del paciente.

De forma global estos gradientes parecen mostrar que las partículas virales recuperadas en plasma y heces presentan densidades claramente diferenciadas: menos densas en plasma y más densas en heces, compatible con la presencia estructuras de mayor diámetro que podrían ser compatibles a su vez con partículas con envuelta, como las descritas en vesículas extracelulares

por Capelli et al y Nagashima et al (^{72,150}, mientras que en heces serían compatibles con partículas sin envuelta ¹⁵¹. No obstante, en las muestras de heces de los pacientes 2 y 5 (Px.2 y Px.5) se observa la posible presencia de partículas con ARN-VHE de densidad inferior, del orden de las que corresponderían a las partículas con envuelta, e incluso inferior a estas (habitualmente en la fracción 6 de los gradientes en plasma, con densidades de 1.12 gr/ml del orden de las reportadas para las partículas con envuelta¹⁵¹. Estas estructuras de menor densidad podrían corresponder a diámetros mayores, compatibles con vesículas extracelulares que contuvieran viriones, que también se sugieren en la muestra de plasma del paciente Px.4. No obstante, parece un fenómeno frecuente la posible presencia de ARN-VHE en la fracción terminal en los gradientes de heces, que nos sugiere que por algún motivo desconocido estas partículas se quedaron en esta parte más baja del mismo. Sin embargo títulos altos de ARN-VHE en fracciones inmediatamente anteriores, frecuentemente la fracción 10, parecen coincidir con la presencia de partículas sin envuelta de densidades del

orden de 1.25 gr/ml, compatibles con las reportadas
72,150 .

4.3.2 Exploración de posibles EVs conteniendo partículas virales

4.3.2.1. Aislamiento y análisis de EVs

El protocolo de aislamiento de EVs, además de llevarse a cabo en la fracción 11 de la muestra de heces de los pacientes Px.2 y Px.5, la fracción 1 de la muestra de heces del Px.3 y la fracción 6 de la muestra de plasma del Px.4, también se llevó a cabo en las muestras de heces basales totales de los seis pacientes.

De cada muestra testada con este protocolo se obtuvieron cuatro resultados representados mediante diagrama de barras en las figuras 27, 28, 29 y 30.

La fracción 11 de la muestra de heces del Px.2 (Figura 27) muestra una casi total recuperación del ARN-VHE en el sobrenadante de la muestra y no en el eluido, sugiriendo la detección de partículas virales libres no asociadas a EVs, tanto en presencia como en ausencia del receptor TIM4. En el eluido no se ha detectado ARN-VHE en ausencia de TIM4, no detectándose una unión

inespecífica entre EVs y las *beads* magnéticas. Se detecta una cantidad ínfima de ARN-VHE en el eluido en presencia de TIM4, pareciendo indicar que no hay presencia de ARN-VHE unido a EVs.

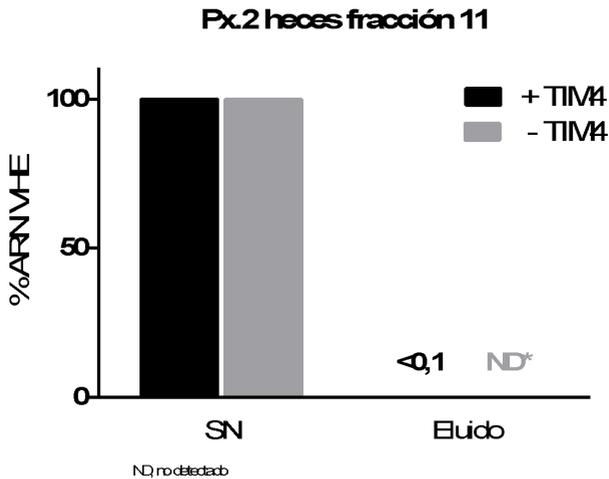


Figura 27: Gráfico de barras de la fracción 11 de la muestra de heces del Px.2. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

Por lo que respecta a la misma fracción 11 pero en la muestra de heces del Px.5 (Figura 28), se ha recuperado casi en su totalidad la cantidad de ARN-VHE presente en la muestra en el sobrenadante en presencia y en

ausencia del receptor TIM4. No se ha detectado ARN-VHE en el eluido de la muestra, denotando que no se encuentran partículas virales asociadas a EVs o membranas lipídicas. Se observa sin embargo la presencia de viriones libres.

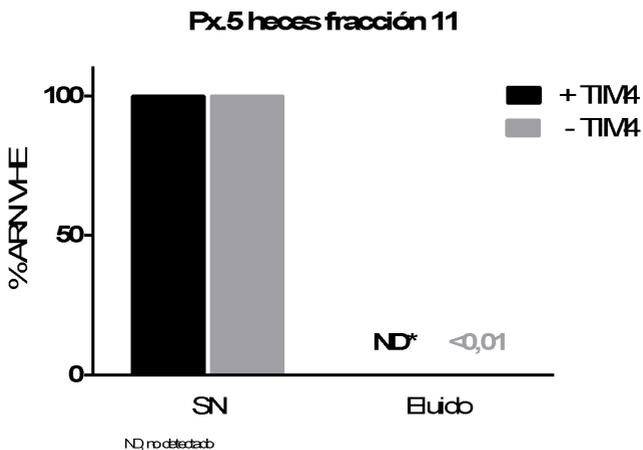


Figura 28: Gráfico de barras de la fracción 11 de la muestra de heces del Px.5. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

La fracción 1 de la muestra de heces del Px.3 se encuentra representada en la figura 29. En ella se observa la recuperación total del ARN-VHE en el sobrenadante de la muestra en presencia y ausencia del

receptor TIM4, sugiriendo la presencia de partículas virales no asociadas a membranas en la muestra. A diferencia de las dos muestras anteriores, en esta no se ha detectado ARN-VHE en el eluido, sugiriendo, nuevamente, que no se encuentran partículas virales asociadas a membranas en la muestra.

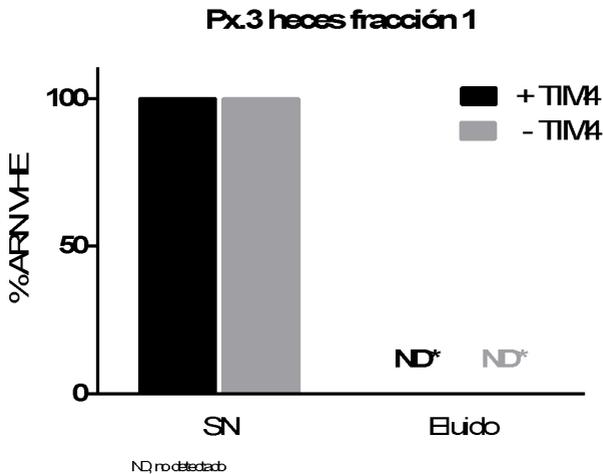


Figura 29: Gráfico de barras de la fracción 1 de la muestra de heces del Px.3. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

La última fracción individual analizada fue la fracción 6 de la muestra de plasma del Px.4 (Figura 30). En ella se observa recuperación de ARN-VHE tanto en el SN como

en el eluido. En el SN, el ARN-VHE se ha recuperado en su totalidad en ausencia del receptor TIM4, pero se ha recuperado menos de un 50% en presencia del mismo receptor, sugiriendo que en plasma se encuentran partículas virales no envueltas, pudiendo tratarse este resultado de un artefacto. Asimismo, en el eluido se ha detectado aproximadamente el 60% de ARN-VHE en presencia del receptor TIM4, lo que parece indicar que en el plasma del paciente si hay partículas virales con envuelta o asociadas a EVs, tal como se ha descrito anteriormente ⁷².

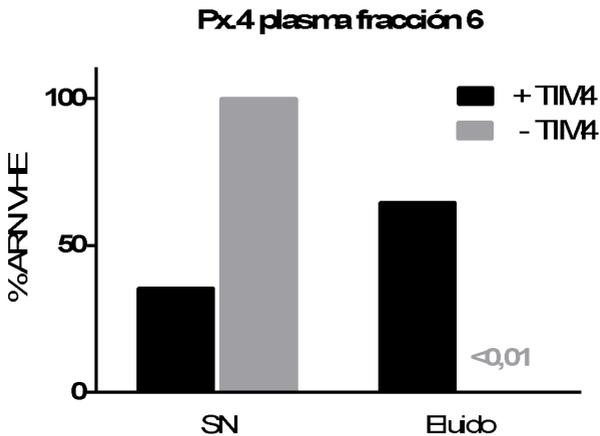


Figura 30: Gráfico de barras de la fracción 6 de la muestra de plasma del Px.4. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el

eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

Globalmente estos resultados sugieren que, en heces, las partículas virales se encuentran, en mayor medida, no asociadas a membranas o EVs, dado que se ha detectado ARN-VHE en su mayoría en el SN de la muestra. Sin embargo, la mínima detección de ARN-VHE en el eluido de las muestras de los Px.2 y Px.5 (ARN-VHE <0,01) sugieren que una menor proporción de partículas se encuentra en heces unida a membranas.

Además de las cuatro fracciones ya comentadas, también se llevó a cabo el protocolo de aislamiento de EVs en las seis muestras de heces de los seis pacientes (Px.1- Px-6). Los resultados se encuentran representados en las figuras 31, 32, 33, 34, 35 y 36.

En el Px.1 (Figura 31), se observa la recuperación de casi el 100% del ARN-VHE en el SN de la muestra tanto en presencia como en ausencia del receptor TIM4, sugiriendo la presencia de partículas virales libres en las heces de este paciente. En el eluido del mismo, se han detectado cantidades ínfimas de ARN-VHE, sugiriendo

que no hay partículas virales asociadas a membranas en las heces.

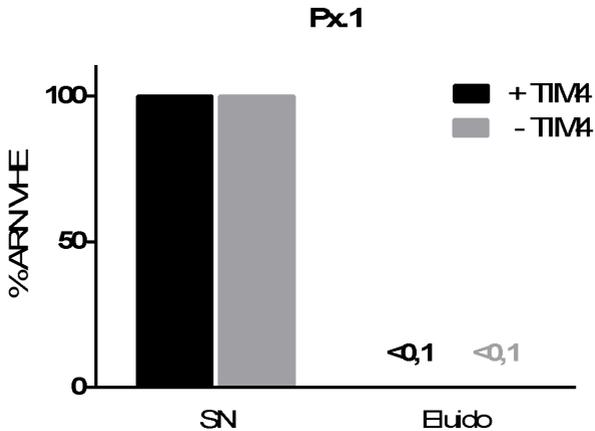


Figura 31: Gráfico de barras de la muestra de heces del Px.1. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

Por lo que respecta a la muestra de heces del Px.2 (Figura 32), se observa un resultado muy similar a la muestra del Px.1, recuperando prácticamente el 100% del ARN-VHE en el SN de la muestra y no en el eluido (<math><0.01\%</math>). Estos resultados sugieren, nuevamente, la presencia de partículas virales libres no asociadas a membranas o EVs en las heces de este paciente.

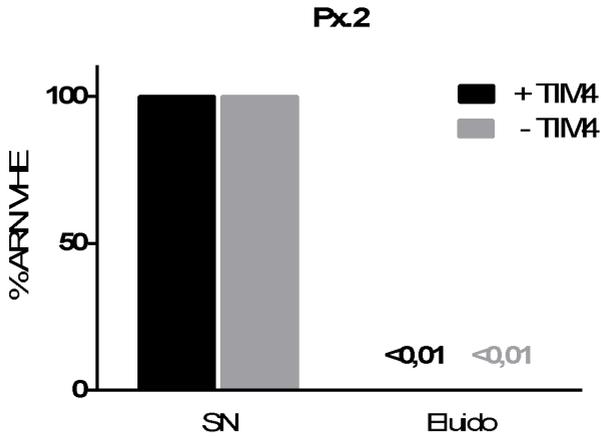


Figura 32: Gráfico de barras de la muestra de heces del Px.2. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

En el Px.3 (Figura 33), se observa la recuperación del 100% del ARN-VHE en el SN de la muestra de heces del paciente, no detectándose ARN-VHE en el eluido en presencia ni en ausencia del receptor TIM4. Estos resultados sugieren la presencia de partículas virales libres no asociadas a EVs en la muestra de heces.

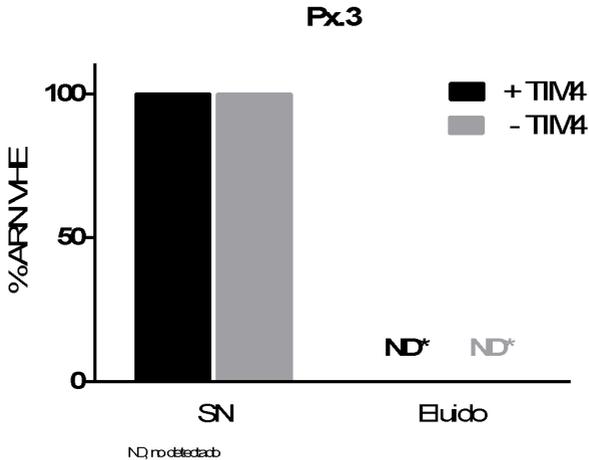


Figura 33: Gráfico de barras de la muestra de heces del Px.3. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

Por lo que respecta a la muestra de heces de la Px.4 (Figura 34), se observa un resultado muy similar a las muestras de los pacientes 1 y 2, Px.1 y Px.2, recuperando prácticamente el 100% del ARN-VHE en el SN de la muestra y no en el eluido (<0.1%) en presencia y ausencia de TIM4. Estos resultados sugieren una vez más la presencia de partículas virales libres no asociadas a membranas o EVs en las heces de este paciente.

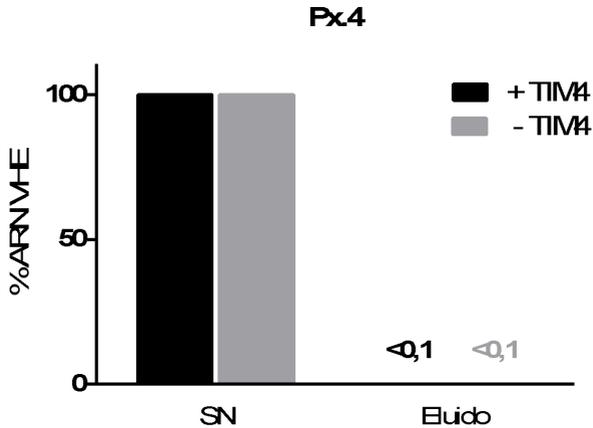


Figura 34: Gráfico de barras de la muestra de heces del Px.4. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

En cuanto a a la muestra de heces del Px.5 (Figura 35), se observa una recuperación de casi el 100% del ARN-VHE en el SN de la muestra tanto en presencia como en ausencia de TIM4. Sin embargo, nse ha recuperado una ínfima parte de ARN-VHE en el eluido, sugiriendo la presencia de partículas virales libres no asociadas a membranas o en las heces.

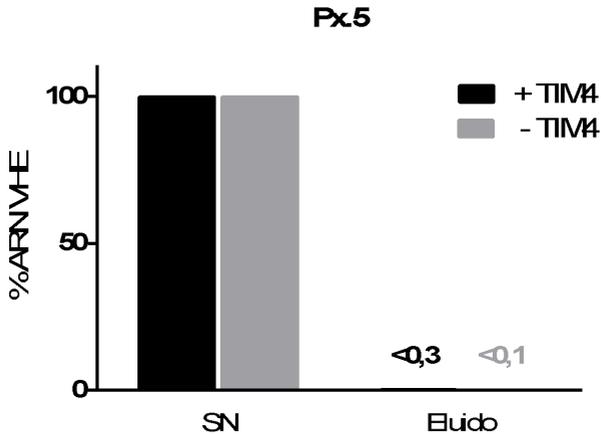


Figura 35: Gráfico de barras de la muestra de heces del Px.5. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

Por último, la muestra de heces del Px.6 (Figura 36), se observa un resultado muy similar a la anterior muestra, donde se recupera casi el 100% del ARN-VHE en el SN de la muestra y no en el eluido con y sin TIM4 presente. Estos resultados vuelven a sugerir la presencia de partículas virales libres no asociadas a membranas o EVs en las heces de este paciente.

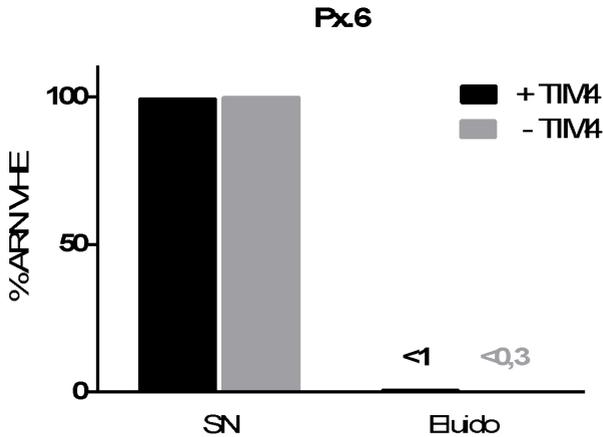


Figura 36: Gráfico de barras de la muestra de heces del Px.6. Se representa el porcentaje de ARN-VHE recuperado en el sobrenadante (SN) de la muestra y en el eluido (ver el apartado 3.4 de Material y métodos) en presencia y ausencia del receptor TIM4.

Globalmente, los resultados del protocolo de aislamiento de EVs sugieren, como era de esperar, que en las muestras de heces el virus se encuentra mayoritariamente de manera libre, no asociado a membranas o vesículas extracelulares. Esto lo plasman tanto los resultados de las muestras basales de los seis pacientes, como los análisis de las fracciones de las muestras de heces seleccionadas de los pacientes Px.2, Px.3 y Px.5. Asimismo, se observa una mínima fracción de virus asociado a membranas o EVs, pero en menor

medida, como se puede observar sobre todo en los pacientes Px.5 y Px.6.

Para corroborar la presencia de partículas virales asociadas a membranas o EVs detectadas en el protocolo de aislamiento anteriormente descrito, se procedió a la toma de imágenes de microscopía y criomicroscopía electrónica de un total de cinco fracciones de muestras. Los resultados se encuentran representados en el apartado 4.3.2.2.

4.3.2.2: Estudios de microscopia electrónica

Se seleccionaron un total de 5 fracciones de diferentes gradientes para la realización de microscopía electrónica y criomicroscopía electrónica. Las fracciones seleccionadas fueron la fracciones 10 y 11 del gradiente de heces del Px.4 (Figuras 37 y 38), la fracción 6 del gradiente de plasma del Px.6 (Figura 39) y las fracciones 8 y 11 del gradiente de heces del Px.6 (Figuras 40 y 41).

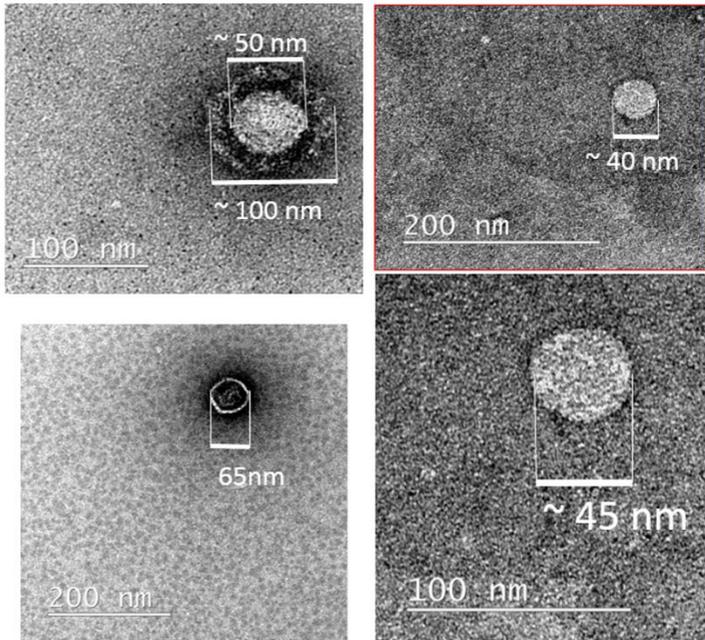


Figura 37: imágenes de microscopía electrónica de la fracción 10 del gradiente de la muestra de heces del Px.4. Se expresan en nanómetros, nm, los diámetros de las estructuras observadas.

En las imágenes de microscopía electrónica del Px.4 correspondientes a la fracción 10 del gradiente de la muestra de heces (Figura 37) se observan cuerpos similares a vesículas extracelulares que conservan una membrana lipídica y que tienen un diámetro aproximado de 100nm. En el interior se pueden

observar partículas con un diámetro 50nm, pudiendo tratarse de lipoproteínas que transportan a su vez vesículas extracelulares en su interior. Asimismo, también se observan partículas sin envuelta mayores de lo esperado para considerarse VHE, puesto que sus diámetros rondan los 40-60 nm y no los 27-34 nm esperados ¹⁵⁰.

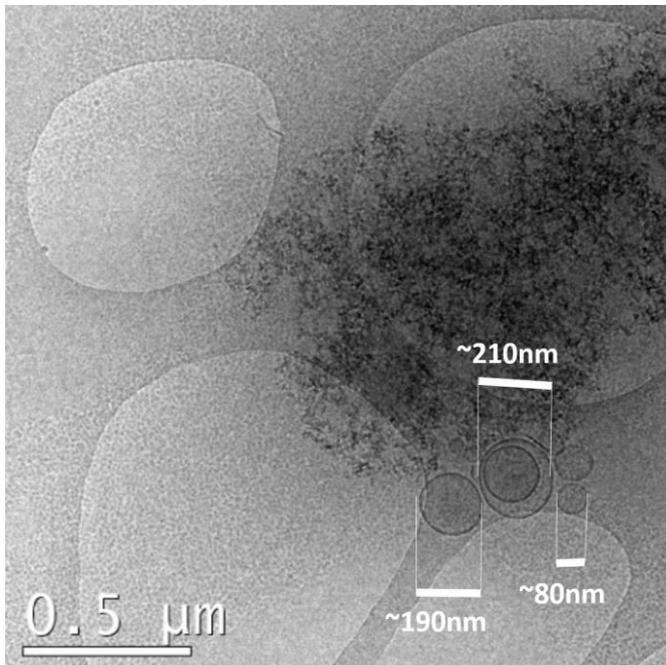


Figura 38: imagen de criomicroscopía electrónica de la fracción 11 del gradiente de la muestra de heces del Px.4. Se

expresan en nanómetros, nm, los diámetros de las estructuras observadas.

Por lo que respecta a la fracción 11 del mismo gradiente de heces del Px.4 (Figura 38), la imagen de criomicroscopía electrónica mostró una cantidad ínfima de partículas con diámetros que oscilan entre 80 y 200 nm, similares a las observadas en la fracción 10 del mismo gradiente, pudiendo tratarse, nuevamente, de lipoproteínas. No se observan viriones de VHE libres en heces en ninguna de las dos fracciones analizadas correspondientes al Px.4.

También se tomaron imágenes por criomicroscopía electrónica de la fracción 6 de la muestra de plasma del Px.6, representadas en la figura 39. En ella se observan estructuras similares a lipoproteínas de un diámetro de entre 180 y 200 nm, muy similares a los cuerpos encontrados en las imágenes del Px.4, sugiriendo la presencia de lipoproteínas en esta muestra.

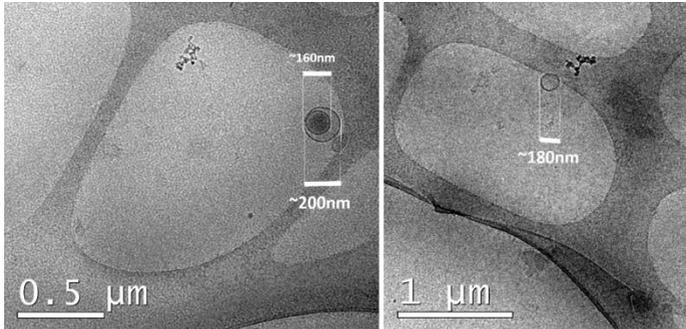


Figura 39: imagen de criomicroscopía electrónica de la fracción 6 del gradiente de la muestra de plasma del Px.6. Se expresan en nanómetros, nm, los diámetros de las estructuras observadas, pese a estar en μm la escala.

Del mismo paciente, Px.6, se obtuvieron también imágenes de microscopía y criomicroscopía electrónica de las fracciones 8 y 11 del gradiente de heces. Las imágenes correspondientes a la fracción 8 se encuentran representadas en la figura 40. En ella se observan cuerpos con diámetros entre 35 y 55 nm, pudiendo tratarse, en el caso de los cuerpos de 35 nm, de partículas virales sin envuelta, como ya se ha descrito en otros trabajos anteriormente ¹⁵⁰. Por lo que respecta a las estructuras de diámetros mayores, podría tratarse de otro tipo de partículas ajenas al VHE.

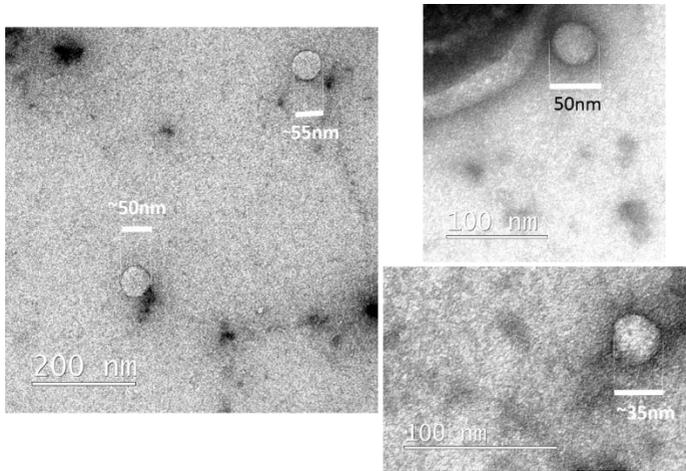


Figura 40: imagen de criomicroscopía electrónica de la fracción 8 del gradiente de la muestra de heces del Px.6. Se expresan en nanómetros, nm, los diámetros de las estructuras observadas.

Por último, en la figura 41 están representadas la imagen obtenida por criomicroscopía electrónica de la fracción 11 del gradiente de la muestra de heces del Px.6. En ella observan cuerpos con un tamaño de entre 20 y 30 nm que podría corresponderse a partículas virales sin envuelta del VHE. No se han observado estructuras con membrana. Asimismo, esta imagen se realizó con pocos aumentos (2000 nm), por lo que sería interesante repetir la toma de imágenes a 500 nm o incluso 100 nm.

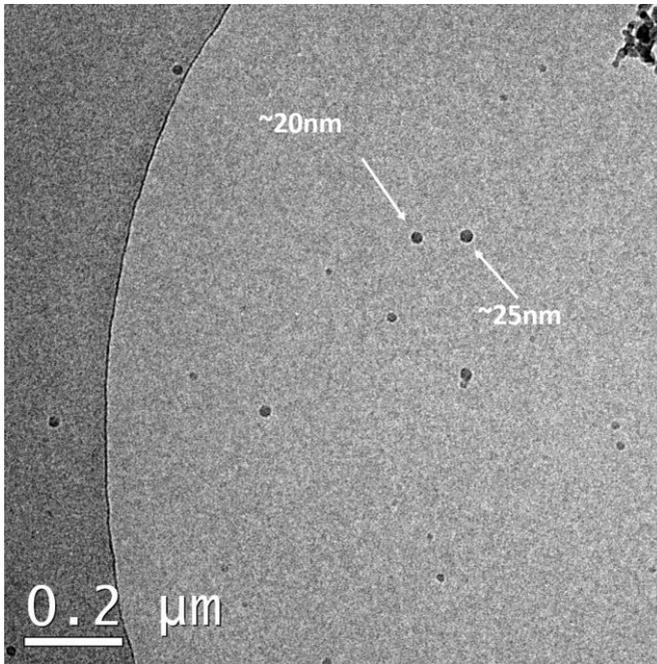


Figura 41: imagen de criomicroscopía electrónica de la fracción 11 del gradiente de la muestra de heces del Px.6. Se expresan en nanómetros, nm, los diámetros de las estructuras observadas. La escala se encuentra representada en μm .

Globalmente, las imágenes obtenidas parecen confirmar las sugerencias de los resultados de los gradientes (por la densidad de los picos de ARN-VHE hallados) y del protocolo de aislamiento, de que el VHE se encuentra en heces tanto de manera independiente como asociado a membranas lipídicas, debido a que los cuerpos membranosos identificados en la muestra de

heces del Px.4, con un tamaño de 210 nm, son similares a los hallados en la muestra de plasma del Px.6, de 205 nm. Sin embargo, en la muestra de plasma del Px.6 se observaron únicamente partículas con envuelta, corroborando lo ya descrito por Nagashima et al ¹⁵⁰. En ambas fracciones seleccionadas de la muestra de heces del Px.6 las partículas virales aisladas tienen un tamaño de 20-35 nm, pudiendo tratarse de partículas de VHE sin envuelta. Aún así, se observan posibles partículas envueltas por membranas con diámetros superiores, cuestionando que se trate de verdaderos viriones.

La presencia del VHE con y sin envuelta en heces sugiere que este virus se podría comportar como otros virus hepáticos como son el VHA, el cual se muestra como partícula envuelta (eVHA) como estrategia protectora de los viriones frente a los anticuerpos del huésped, y el VHC, el cual se ha conseguido aislar de exosomas en cultivo celular y en plasma de pacientes ^{152,153}.

4.4 Estudio de diversidad y complejidad de quasiespecies por NGS

Se secuenciaron dos fragmentos del genoma del VHE pertenecientes al ORF1 y ORF2 en las seis muestras basales de heces y de plasma de los 6 pacientes. La secuenciación se realizó con la plataforma Illumina MiSeq System (Illumina, San Diego, CA) y para el análisis de datos se utilizaron los programas R y Bioconductor.

Se calcularon los índices de diversidad de las muestras, así como el análisis filogenético y el cálculo de las distancias de Nei-Li.

Los índices de diversidad calculados a partir del amplicón del ORF1 del genoma del VHE para las muestras de los seis pacientes se encuentran representados en la Tabla 9. Los índices de diversidad calculados a partir del amplicón del ORF2 del genoma del VHE para las muestras de los seis pacientes se encuentran representados en la Tabla 10.

Tabla 9: representación de los índices de diversidad seleccionados para los amplicones del ORF1 del VHE de las muestras de plasma y de heces de los pacientes con infección aguda e infección crónica. Se encuentran representados el número de haplotipos, número de mutaciones, la entropía de Shannon, la frecuencia media de mutaciones y la diversidad nucleotídica.

ORF1	Px.1		Px.2		Px.3		Px.4		Px.5		Px.6	
	Plasma	Heces										
Número de haplotipos	32	32	40	36	40	30	49	16	37	37	91	37
Número de mutaciones	33	44	40	35	40	34	50	15	41	48	493	184
Entropía de Shannon	1,162	1,503	1,126	1,053	1,535	1,240	1,371	0,384	1,520	2,078	4,389	3,484
Frecuencia media de mutaciones por entidad	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003	0,021	0,012
Diversidad nucleotídica	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,002	0,003	0,023	0,019

Tabla 10: representación de los índices de diversidad seleccionados para los amplicones del ORF2 del VHE de las muestras de plasma y de heces de los pacientes con infección aguda e infección crónica. Se encuentran representados el número de haplotipos, número de mutaciones, la entropía de Shannon, la frecuencia media de mutaciones y la diversidad nucleotídica.

ORF2	Px.1		Px.2		Px.3		Px.4		Px.5		Px.6	
	Plasma	Heces										
Número de haplotipos	44	27	46	31	43	36	48	21	63	65	77	92
Número de mutaciones	43	26	46	31	43	37	47	20	63	64	245	338
Entropía de Shannon	1,342	0,991	1,492	1,134	1,487	1,326	1,196	0,418	2,116	2,258	3,734	4,093
Frecuencia media de mutaciones por entidad	0,004	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,003	0,004	0,004	0,011	0,013
Diversidad nucleotídica	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,000	0,003	0,003	0,015	0,019

El número de haplotipos encontrado es mayor en las muestras de plasma que en las muestras de heces en todos los pacientes en ambos amplicones, a excepción de los Px.5 y Px.6 en el amplicón del ORF2, donde el número de haplotipos es mayor en heces. El número de mutaciones es también mayor en casi todas las muestras de plasma en comparación con las muestras de heces, a excepción del Px.1 y Px.5 en el caso del amplicón del ORF1 y el Px.5 y Px.6 en el caso del amplicón ORF2, donde el número de mutaciones en heces supera el número de mutaciones en plasma.

Los valores de la entropía de Shannon son mayores en las muestras de plasma que en las de heces en los pacientes agudos (Px.1-Px.3) en ambos amplicones, pero se observan diferencias en los pacientes crónicos (Px.4-Px.6), donde el Px.5 tiene valores más altos en la muestra de heces en ambos amplicones y el Px.6 muestra valores más altos en heces en el ORF2.

La frecuencia media de mutaciones por entidad es similar en todos los pacientes, girando en torno a 0,002-0,004 en ambos amplicones, a excepción del Px.6 el cual presenta valores más altos, en torno a 0,01-0,02.

La diversidad nucleotídica es similar en todos los pacientes en ambos amplicones, con valores que oscilan entre 0,001 y 0,002, a excepción del Px.6 que presenta valores en torno a 0,015-0,023.

Además de las tablas con los índices de diversidad para cada muestra, también se llevaron a cabo diversos estudios filogenéticos. En primer lugar, se llevó a cabo la creación de árboles filogenéticos UPGMA, una clasificación que se basa en la identificación y agrupación de secuencias que tienen una menor distancia genética entre sí. Este árbol se realizó para cada ORF, ORF1 y ORF2. El árbol para el ORF1 está representado en la Figura 42.

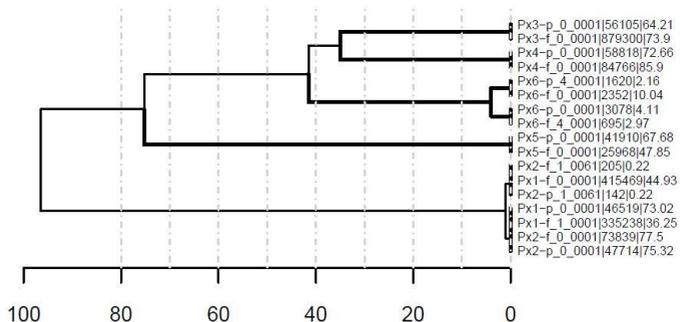


Figura 42: árbol filogenético UPGMA donde se observan las secuencias máster del ORF1 de las muestras de plasma y heces

de los 6 pacientes interrelacionadas. Las secuencias denominadas como "Px.N_p" corresponden a las muestras de plasma de los pacientes, siendo la secuencia Px.N_p_0 la secuencia máster y a Px.N_p_1 la secuencia más aparecida a la anterior con 1 mutación.. Las secuencias denominadas como "Px.N_f" corresponden a las muestras de heces de los pacientes.

Analizando el árbol filogenético con las secuencias máster del ORF1, se observa que los Px.1 y Px.2 se encuentran estrechamente relacionados, relacionándose la secuencia máster de plasma del Px.2 con la secuencia máster de heces del mismo, la secuencia máster de plasma del Px.1 y la secuencia máster con una mutación de la muestra de heces del Px.1. Esto parece indicar que se trata de variantes del virus muy similares o iguales, a pesar de ser dos pacientes diferentes pero que comparten su origen en Pakistán. Por lo que respecta al resto de secuencias máster del ORF1 de los demás pacientes, éstas se correlacionan entre si, intrapaciente. Sin embargo, cabe destacar el caso del Px.6, en el cual la secuencia máster de plasma se encuentra estrechamente relacionada con la secuencia de heces con cuatro mutaciones, y viceversa Esta situación podría tener varias

explicaciones, discutidas en el apartado de discusión de este trabajo.

En cuanto al análisis del árbol filogenético correspondiente al ORF2 (Figura 43), en este se aprecia una vez más la angosta relación entre las secuencias máster de los Px.1 y Px.2, pues se observa que las secuencias máster del Px.1 de plasma y de heces están estrechamente relacionadas (distancia 0) con las secuencias con una mutación de plasma y heces del Px.2. Asimismo, apenas hay diferencias entre estas cuatro secuencias y las secuencias máster de plasma y heces del Px.2, con las cuales también muestran un gran parentesco. Por lo que respecta al resto de pacientes, se observa una alta correlación entre las secuencias máster intrapaciente y distancias considerables entre pacientes. Por lo que respecta al Px.6, en este caso, la secuencia máster de plasma está estrechamente relacionada con la secuencia máster de heces. Esta situación, diferente que en el ORF1, podría deberse a la alta conservación de esta parte del genoma del VHE, correspondiente a la cápside viral y la cual ha

demostrado estar altamente conservada entre pacientes y entre genotipos^{96,150}.

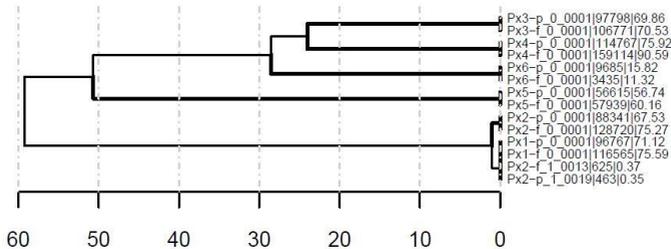


Figura 43: árbol filogenético UPGMA donde se observan las secuencias máster del ORF2 de las muestras de plasma y heces de los 6 pacientes interrelacionadas. Las secuencias denominadas como “Px.N_p” corresponden a las muestras de plasma de los pacientes, siendo la secuencia Px.N_p_0 la secuencia máster y a Px.N_p_1 la secuencia más aparecida a la anterior con 1 mutación.. Las secuencias denominadas como “Px.N_f” corresponden a las muestras de heces de los pacientes.

Asimismo, también se llevó a cabo el análisis de la distancia nucleotídica entre las poblaciones de plasma y las poblaciones de heces de los seis pacientes respecto a la diversidad nucleotídica de las muestras de plasma para el ORF2, con el fin de ver cuán “separadas” se encuentran las poblaciones conforme su diversidad nucleotídica (Figuras 44). En el gráfico de barras se observa que los valores son bajos, pues van de 0,01 a

0,05, queriendo decir que las poblaciones son muy coincidentes: entre el las poblaciones son el 1% - 5% de la diversidad nucleotídica, siendo por tanto prácticamente las mismas. El paciente con más distancia nucleotídica diferenciada en el ORF2 sería el Px.6, que presenta un 5%, es decir, domina la diversidad nucleotídica respecto a la distancia entre poblaciones. Sin embargo, estamos viendo distancias muy cortas.

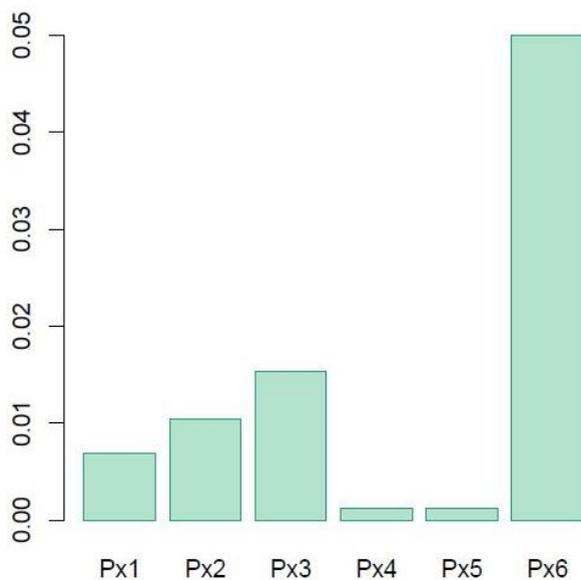
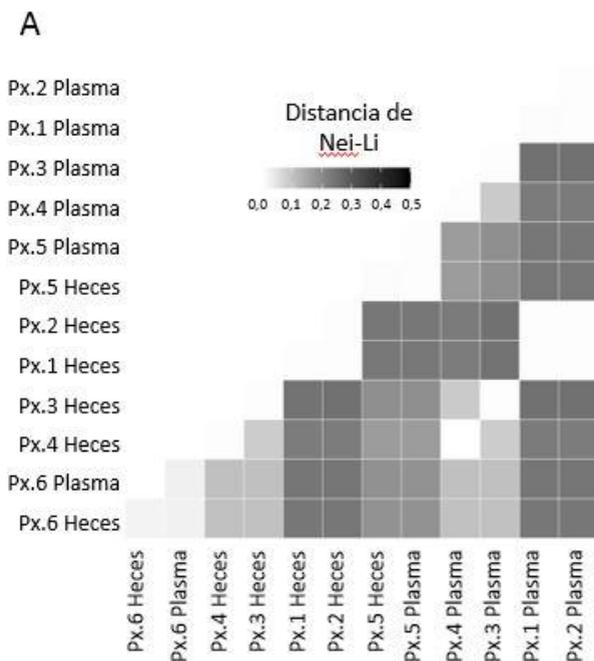


Figura 44: Gráfico de distancia nucleotídica entre las poblaciones de plasma y heces corregidas versus la diversidad

nucleotídica de la muestra de plasma. Se observa que las poblaciones son muy similares.

Con el fin de calcular las distancias entre muestras, se procedió al análisis de las distancias de Nei-Li, que se encuentran representadas en la Figura 45.



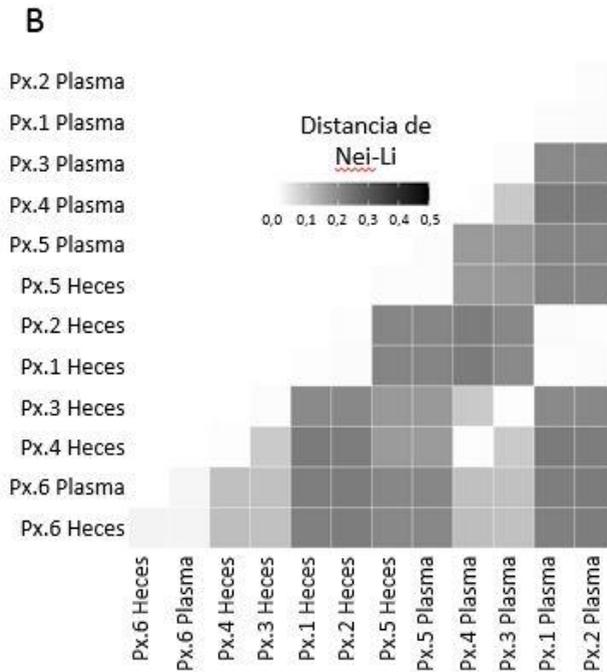


Figura 45: representación gráfica en forma de Heat Map de las distancias de Nei-Li. (A) Distancias de Nei-Li calculadas con los amplicones de ORF1. (B) Distancias de Nei-Li calculadas con los amplicones de ORF2.

Las distancias de Nei-Li en ambos amplicones muestran que existe una menor distancia entre muestras de plasma y heces de un mismo paciente que entre muestras de plasma y heces de pacientes diferentes. También se observa que los Px.1 y Px.2 se encuentran estrechamente relacionados, con valores de la distancia

de Nei-Li de en torno a 0,005. No se observan diferencias en las distancias entre muestras de plasma y de heces dentro de un mismo paciente independientemente del tipo de infección.

Por otro lado, también se llevó a cabo la creación de árboles filogenéticos Neighbor-joining (NJ), los cuales se encuentran basados en el criterio de mínima evolución, tratándose así de un árbol no enraizado en el cual la longitud de las ramas presentan diferentes distancias, indicando cambios evolutivos. Se llevó a cabo la creación de dos árboles por cada paciente, correspondientes a las secuencias del ORF1 y el ORF2. Asimismo, con el fin de que éstos árboles fueran legibles, se han seleccionado los 50 haplotipos más abundantes en la población, independientemente de qué muestra provinieran. Los árboles de cada paciente se muestran a continuación.

En el árbol filogenético NJ del Px.1 para el amplicón del ORF1 (Figura 46), se observa que la secuencia máster de plasma Px1_p_0 es diferente a la máster de heces Px1_f_0, pero en cambio idéntica a una secuencia de heces con una mutación Px1_f_1. Además se detectan clusters de secuencias con 1 o 2 mutaciones de

diferencia respecto a las secuencias máster (señalizado en la imagen).

Resultados

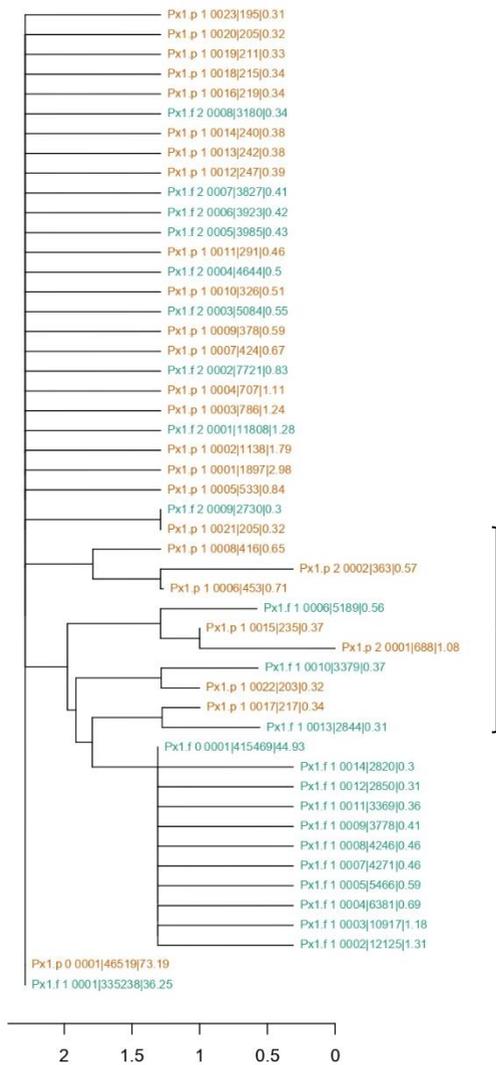


Figura 46: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF1 del Px.1. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

En cuanto al árbol NJ para el ORF2 del mismo paciente Px.1, que se encuentra representado en la Figura 47, se observa que no hay una diferenciación clara entre las secuencias de la muestra de plasma y de heces, por lo que se trata de la misma población viral. Observamos además de que la secuencia máster de la muestra de heces es la misma que la secuencia máster de la muestra de plasma.

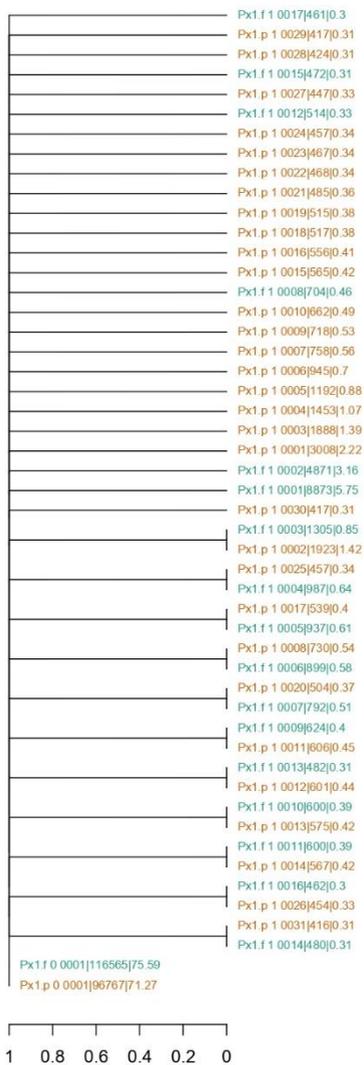


Figura 47: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF2 del Px.1. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

Por lo que respecta al Px.2, en ambos árboles NJ para el ORF1 y el ORF2 se ha observado que en ambos amplicones las muestras de plasma y heces comparten la secuencia máster. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la cantidad de haplotipos compartidos entre muestras: en el análisis del ORF1 se observa que las muestras de plasma y heces comparten más haplotipos (N=15) que en el ORF2 (N=8). Esto se encuentra representado en las Figuras 48 y 49.

Resultados



Figura 48: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF1 del Px.2. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

Resultados

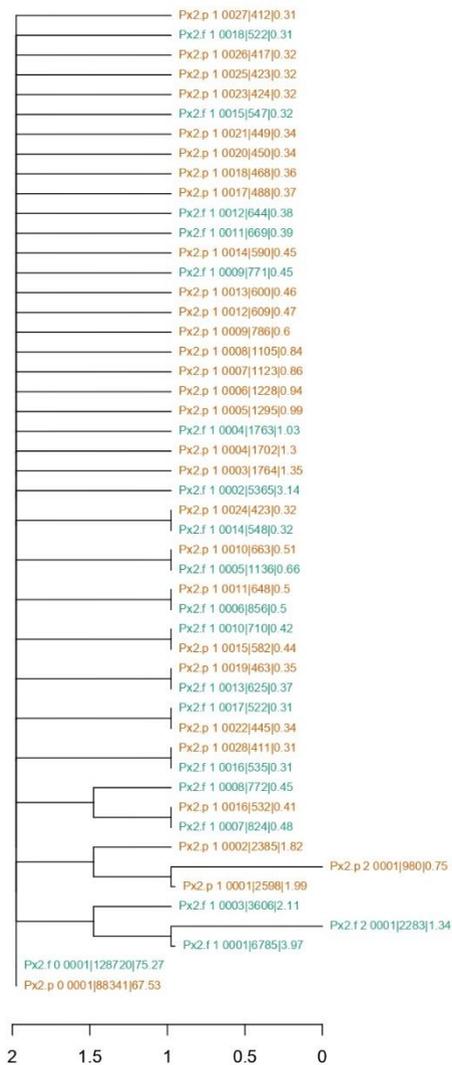


Figura 49: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF2 del Px.2. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

Por lo que respecta al Px.3, los árboles NJ se encuentran representados en las Figuras 50 y 51. Se puede observar cómo las secuencias máster están emparejadas en ambos amplicones ORF1 y ORF2. Se observan las secuencias ordenadas indistintamente del tipo de muestra: las poblaciones virales de la muestra de plasma y de la muestra de heces del paciente son iguales. Asimismo, se observa que el ORF2 comparte más secuencias entre la muestra de plasma y heces (N=9).

Resultados

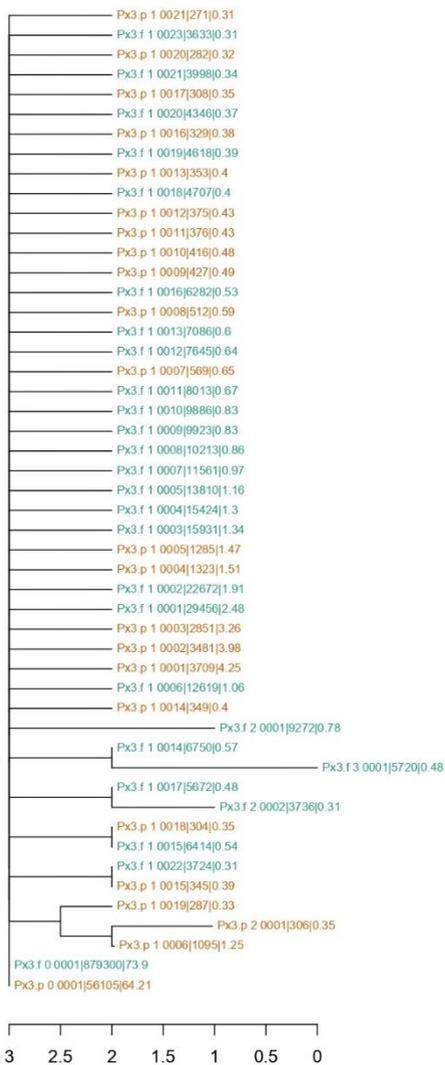


Figura 50: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF1 del Px.3. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

Resultados

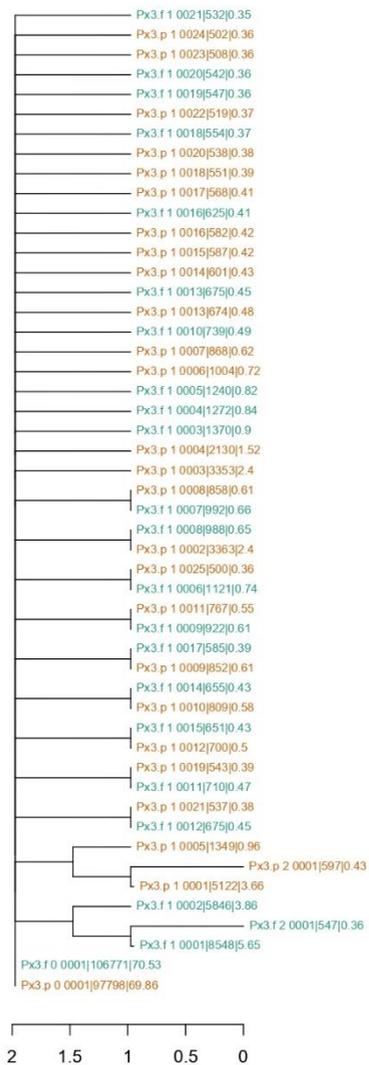


Figura 51: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF2 del Px.3. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

En cuanto al árbol NJ para el ORF1 de la paciente Px.4, Figura 52, las secuencias de plasma y heces se encuentran intercaladas en el árbol, coincidiendo un total de 5 secuencias en ambas muestras. Asimismo, se observa que la secuencia máster de heces es igual a la secuencia máster de plasma, las cuales representan el 85 y 72% de la población viral.

Resultados

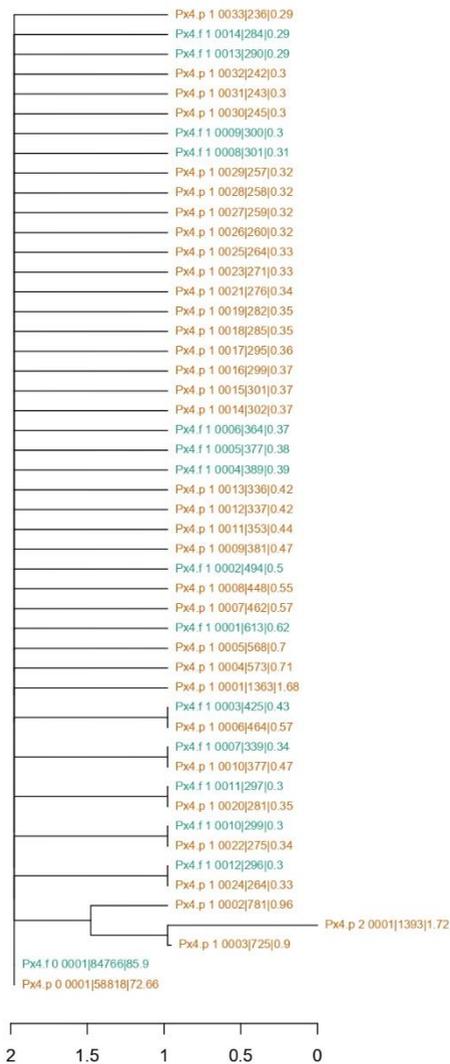


Figura 52: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF1 de la Px.4. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

En cuanto el ORF1 de la paciente Px.4, representado en la Figura 53, se observa que no hay una diferenciación clara entre las secuencias de la muestra de plasma y de heces, tratándose de la misma población viral. Observamos además de que la secuencia máster de la muestra de heces se correlaciona con la secuencia máster de la muestra de plasma, y que un total de 7 secuencias son iguales en ambas muestras. Asimismo, del total de 50 secuencias u haplotipos incluidos en el árbol, solo 12 provienen de la muestra de heces, en contraste con las 38 restantes de la muestra de plasma, sugiriendo que la población viral en heces es más homogénea, debido a que la frecuencia de la secuencia máster es de un 90%, frente al 75% de la secuencia máster en plasma.

Resultados

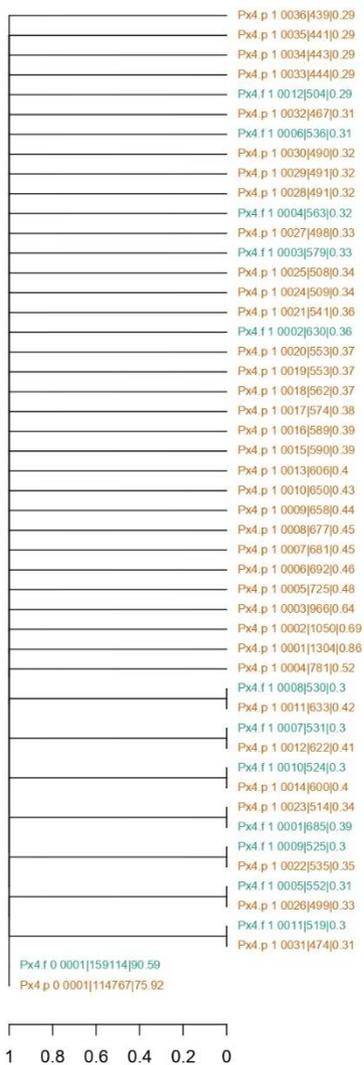


Figura 53: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF2 de la Px.4. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

Por lo que respecta al árbol filogenético del ORF1 del Px.5, representado en la Figura 54, se observa un desajuste en las muestras con una complejidad mayor que el resto de árboles, habiendo un par de mutantes en dos secuencias que complican el árbol. Sin embargo, las secuencias máster de plasma y heces coinciden. En el caso del ORF2, en el cual las secuencias máster vuelven a coincidir, presentan 12 haplotipos duplicados en plasma y heces (Figura 55).

Resultados

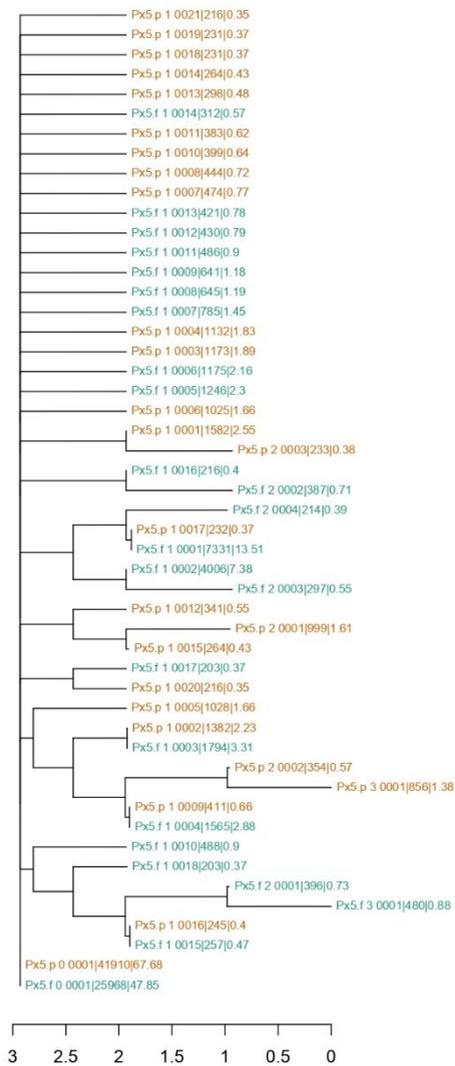


Figura 54: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF1 del Px.5. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

Resultados

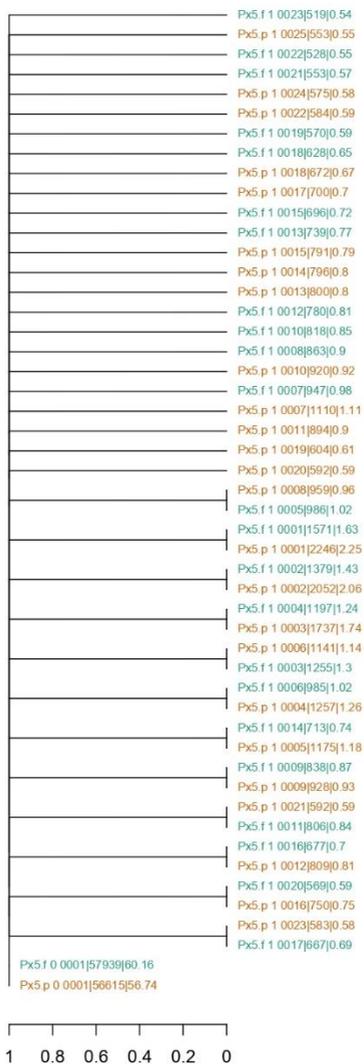


Figura 55: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF2 del Px.5. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

Por último, el Px.6 es un caso excepcional. Se trata de un árbol filogenético que presenta una mayor complejidad que el resto de árboles analizados, lo cual les hace especialmente interesante para futuros estudios.. Esta situación podría ser explicada por la epidemiología de la infección del paciente, el cual lleva más de 8 años diagnosticado y quién ha sido sometido a tres ciclos de tratamiento con RBV, presión selectiva que habría podido causar desajustes en las poblaciones virales de las muestras de plasma y heces. Asimismo, en este análisis las secuencias máster no se corresponden: la secuencia máster de la muestra de heces se corresponde con una secuencia de plasma con cuatro mutaciones respecto a la secuencia máster de plasma. Además, vemos que las secuencias máster están a muy baja frecuencia en la población, con un 4 y un 10% en heces y plasma, respectivamente. En cuanto al ORF2 (Figura 57), continúa presenciándose una gran complejidad en el análisis, si bien es cierto que las

secuencias máster de ambas muestras coinciden, a diferencia del ORF1.

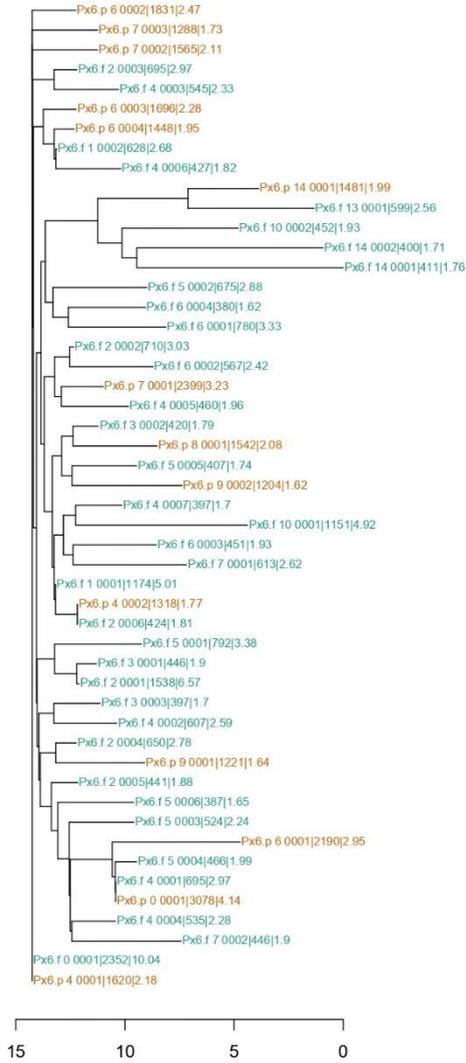


Figura 56: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF1 del Px.6. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

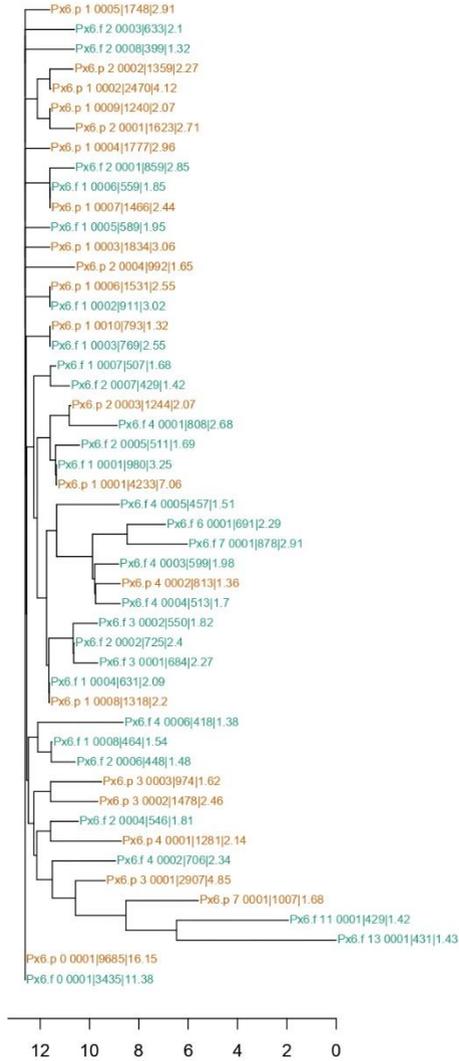


Figura 57: árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) del ORF2 del

Px.6. Las últimas dos secuencias presentadas en el árbol corresponden a las secuencias máster.

Discusión

5. Discusión

La infección por el VHE es la causa más común de hepatitis aguda a nivel mundial ⁷, con una morbilidad y mortalidad importante en algunas poblaciones especiales. Se estima que afecta a 20 millones de personas anualmente ⁹. La infección se presenta como una infección aguda pudiendo derivar a infección crónica en pacientes no inmunocompetentes o con inmunodeficiencias ¹⁵⁴.

El diagnóstico de VHE es clave para identificar las infecciones crónicas y tratarlas a tiempo antes de que ocurra un daño hepático irreversible. Este se basa principalmente en serología y cargas virales en plasma. La serología es el método diagnóstico más extendido por su rápida ejecución y bajo coste. Sin embargo, según estudios recientes ésta metodología de diagnóstico podría quedar incompleta debido a verse influenciada por características de la muestra y por el test utilizado, evidenciando así no ser un buen marcador diagnóstico de infección por VHE ⁹⁶. El significado clínico de los anticuerpos Anti-VHE en la infección por el VHE no está totalmente definido. Actualmente el diagnóstico de la

infección aguda en la práctica clínica se basa en la presencia de IgM en plasma con ALT elevadas pero hay poca información sobre su durabilidad ¹⁵⁵. En pacientes con infección aguda por el virus de la hepatitis E la duración del ARN viral en plasma es corta (aproximadamente 2 semanas) y frecuentemente desaparece cuando aumentan los niveles de ALT en sangre ¹⁵⁶.

Sin embargo, estudios recientes afirman que la IgM Anti-VHE puede durar hasta 14 meses después de padecer una infección aguda por el VHE ¹⁵⁷. Otros estudios afirman que la IgM puede ser detectable de media hasta 34 meses después del episodio de infección aguda ⁸⁹. Esta anómala durabilidad y las diferencias individuales entre pacientes hacen que sea difícil distinguir entre hepatitis aguda y hepatitis crónica.

Según estudios realizados en los virus de la hepatitis B (VHB) y hepatitis Delta (VHD), la IgM podría responder de manera diferente según el tipo de infección. Jardi et al ¹⁵⁸ concluyó que la respuesta inmunológica IgM frente a infección aguda por el VHD se trataba de la forma IgM pentamérica, pues ésta aparecía en las fracciones 3-6 de

sus gradientes, discrepando de la infección crónica donde la IgM es dimérica, fracciones 11-14. Estos resultados a su vez fueron similares a los observados por Tsuda et al ¹⁵⁹ en la hepatitis crónica por el VHB.

Los resultados del primer estudio presentado en esta tesis doctoral muestran que tanto en fase aguda como crónica (meses después de infección) por el VHE la IgM anti-VHE que se detecta en las fracciones 2-6 del gradiente de sacarosa que correspondería a la forma pentamérica, similar a lo que detecta Jardí et al ¹⁵⁸ en la Figura 1 de su trabajo, donde la IgM anti-VHD se detecta en las fracciones 3-6 de gradiente de sacarosa. Estos resultados sugieren que para caracterizar una infección como aguda o crónica, la detección de IgM no resulta un marcador eficaz, y apoyan el trabajo de Riveiro-Barciela et al ⁸⁹ donde concluye que el diagnóstico basado en la detección de anti-VHE IgM en pacientes con ALT elevadas y sin detección de ARN viral en plasma no parece ser la mejor opción, recomendando la detección de VHE-Ag en plasma para el diagnóstico en estos casos y la combinación de serología y carga viral como método diagnóstico más efectivo. Asimismo, la combinación de

serología, detección de VHE-Ag y la detección de carga viral es la estrategia más recomendada para el diagnóstico de la infección aguda por el VHE ^{155,160,161}.

La detección de la carga viral en plasma supone no solo una mejora en el diagnóstico de infección por el VHE, sino también una herramienta útil para monitorizar los cambios en la carga viral de pacientes con infección crónica durante su tratamiento antiviral, siendo las disminuciones significativas o el aclaramiento viral durante el tratamiento variables predictoras importantes de la respuesta virológica ¹⁶². Estudios anteriores han demostrado que el rendimiento de las pruebas desarrolladas en laboratorio para la detección y cuantificación del ARN-VHE puede variar enormemente como resultado de la diversidad del virus y según el diseño de la técnica ^{117,163}.

La utilización de la qRT-PCR para cuantificar el ARN-VHE en plasma o suero es la más extendida como técnica diagnóstica. Sin embargo, el uso de la misma técnica para la detección de ARN-VHE en heces no es tan amplio. En este sentido, se ha de tener en cuenta las complicaciones preanalíticas del manejo de la misma

para asumir una cuantificación de la carga viral. En este estudio se ha efectuado una resuspensión sistemática de estas muestras y procesado el sobrenadante de dicha resuspensión, valorándose el efecto dilutorio de este proceso sobre la carga viral final. Dicha carga viral, así como la correspondiente a las muestras de plasma, se ha determinado en un sistema totalmente automatizado (COBAS 6800, Roche Diagnostics) evitando así múltiples causas de variabilidad ¹⁴⁵. Varios estudios han demostrado la utilidad de la determinación de la carga viral del ARN-VHEARN-VHE en muestras de heces como indicador de fallo de tratamiento en pacientes con infección crónica. Este hecho se basa en que el virus se elimina por las heces durante más tiempo del que persiste la viremia en sangre, relacionando la persistencia del ARN viral en heces con un mayor riesgo de recaída por infección de VHE ^{119,120}.

Al analizar las cargas virales en plasma y en heces de los pacientes con infección aguda y crónica por el VHE, se observa que existen diferencias significativas entre el ARN-VHE en plasma y el ARN-VHE en heces independientemente del tipo de infección, llegando a

ser en la mayoría de casos más alta la carga viral en heces respecto a la muestra de plasma del mismo paciente. Estos resultados evidencian la gran utilidad de cuantificar las heces en aquellos diagnósticos en los que es impracticable la técnica de qRT-PCR por poca cantidad de muestra, baja carga viral en plasma, imposibilidad de obtención de muestra de sangre, etc. Las heces supondrían una muestra abundante, con cargas virales altas y un método de obtención poco invasivo.

En este estudio los análisis de las cargas virales de plasma y heces en los pacientes con infección aguda dieron diferencias significativas, siendo las cargas virales detectadas mayores en las muestras de heces versus las muestras de plasma de estos pacientes. Estos resultados aportan información novedosa y muy poco descrita en la bibliografía, debido a que en su mayoría, los estudios publicados de detección de ARN-VHE en heces se han realizado en pacientes con infección crónica con tratamiento antiviral y no en pacientes diagnosticados con infección aguda.

Estos resultados apoyan a los obtenidos en los pacientes con infección crónica donde también se han observado diferencias significativas entre las cargas virales obtenidas en plasma y en heces, siendo estas hasta 3 logaritmos superiores en heces (p -valor $<0,0001$). Estos resultados coinciden con los ya obtenidos por Abravanel et al ¹¹⁹ en su cohorte de 24 pacientes con infección crónica sugiriendo que el diagnóstico y monitorización de la infección crónica por VHE debería realizarse por serología y detección y cuantificación de ARN-VHE en plasma y heces para corroborar una adecuada respuesta al tratamiento antiviral y evitar recaídas. En este sentido, en los pacientes crónicos se observa una mayor carga en heces frente a plasma. No obstante, el significado no está claro, puesto que puede deberse a una concentración de la muestra y no a una mayor eliminación de virus comparado con la secreción a plasma. Es esencial aumentar el número de pacientes a estudiar con muestras pareadas y en seguimiento para identificar si esta mayor viremia se detecta de manera puntual y si se mantiene en el tiempo, especialmente durante tratamiento antiviral y en la fase final de la

infección. En los pacientes en fase aguda Px2 y Px3, la muestra de plasma se detectó positividad previa a la curación, y en el paciente Px1 y el crónico que resolvió la infección, se detecta positividad en la misma muestra pareada y no en muestras sucesivas en plasma o heces.

Los análisis de los pacientes con infección crónica donde se compararon tres puntos del tratamiento (muestras basales, muestras a las 12 semanas del tratamiento y muestras tras finalizar el tratamiento) no dieron diferencias significativas, si bien se observa una tendencia hacia ser mayores las cargas virales en heces. Asimismo, las muestras basales son las que más se diferencian en cuanto a las cargas virales se refiere. Sin embargo, se necesitaría una N mayor para poder dar conclusiones fiables al respecto. En este sentido hay que tener en cuenta que la infección crónica por VHE es muy poco frecuente y su abordaje terapéutico está muy poco extendido, lo que dificulta enormemente disponer de cohortes más amplias. En este punto se debe hacer constar que aun hoy día el diagnóstico diferencial de hepatitis aguda valorando la posibilidad de una hepatitis por VHE no está universalizado, por lo que

probablemente en un número significativo de casos no se establezca esta etiología a pesar de ser así, diagnosticándose erróneamente como hepatitis no filiaadas o tóxicas ^{155,164,165}. Son los profesionales sanitarios especializados en la hepatología o epidemiología de enfermedades emergentes infecciosas los que “rescatan” estos casos y ayudan a su diagnóstico. Por tanto, se trata de un cuello de botella importante en la obtención de muestras para la investigación de la infección en cuestión. Hay que tener en cuenta que todavía está muy extendida la creencia de que la infección por VHE es una enfermedad “que viene del exterior”, una patología importada, cuando la realidad es muy diferente especialmente en la etiología zoonótica asociada al consumo de carne de cerdo, extremadamente frecuente en los países desarrollados incluso teniendo en cuenta que el genotipo del VHE que afecta a nuestros pacientes es el genotipo 3, compartido con los cerdos ^{166,167}. En cambio, la infección por VHE en los países en vías de desarrollo, de donde frecuentemente se cree que proviene esta infección, los genotipos virales principales no son zoonóticos,

tratándose de los genotipos VHE1 y VHE2 ^{63,74}. Esta realidad aún puede ser más seria al tratarse de posibles infecciones crónicas por este virus, dada la alta prevalencia del mismo en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales el correcto y rápido diagnóstico es fundamental para tratar con éxito el avance de la infección ^{108,143}. A pesar del bajo número de pacientes analizado, los resultados apoyan la hipótesis de la utilidad de la detección y cuantificación de ARN-VHE en plasma y de manera paralela en heces para diagnóstico y monitorización de pacientes con infección crónica con tratamiento antiviral, con el fin de evitar posibles recaídas y observar la efectividad del tratamiento. El uso de heces como muestra diagnóstica ataja problemas de baja carga viral o cantidad insuficiente de muestra.

En el trabajo de Riveiro-Barciela et al ⁸⁹, los autores sugieren la detección de VHE-Ag en plasma y la combinación de serología y carga viral para diagnosticar la infección aguda por VHE ⁸⁹. Varios estudios han publicado la utilidad y la correlación de la detección de VHE-Ag con la carga viral en plasma. Zhang et al ¹⁶⁸

observó una concordancia entre los niveles de ARN-VHE y VHE-Ag en suero de pacientes, siendo esta muy alta en las fases tempranas de la infección, previamente a la aparición de anticuerpos y ALT elevadas. Esta situación podría ser explicada por la formación del complejo antígeno-anticuerpo, afectando a la detección de VHE-Ag una vez el paciente ha generado anticuerpos. Asimismo, Gupta et al ¹¹⁵ publicó la misma concordancia entre VHE-Ag y ARN-VHE proponiendo el VHE-Ag como un buen marcador para evaluar la replicación viral activa en muestras de plasma de pacientes con serología positiva, repitiéndola tres años más tarde Mishra et al ¹⁶⁹.

Se ha descrito que algunos test de detección de VHE-Ag dirigidos a detectar el ORF2 del virus pueden detectar diferentes formas de VHE-Ag persistente en suero no asociadas a partículas virales infecciosas, demostrando altos niveles de especificidad y sensibilidad pese haber discrepancias entre algunas muestras donde se detecta VHE-Ag en ausencia de carga viral ¹⁷⁰⁻¹⁷³. La presencia de proteínas virales no asociadas a las partículas virales se ha demostrado en la infección por el virus de la hepatitis

B en dos de sus marcadores antigénicos: las proteínas de la envuelta (HBsAg) y el agente inmunomodulador (HBeAg). De hecho en esta infección el HBsAg no asociado a partículas virales, constituye partículas formadas solo por envueltas virales en una abundancia de hasta 10.000 veces las partículas virales, siendo detectable incluso en ausencia de partículas virales detectables ^{174,175}. Esta situación podría explicar parcialmente el fenómeno observado en la infección por VHE, como la presencia de VHE Ag en fracciones sin ARN VHE de nuestros gradientes. Sin embargo, la secuencia de la proteína ORF2 asociada a partículas infecciosas no se conoce con exactitud, y la ultraestructura de las partículas infecciosas todavía no ha sido estudiada en profundidad por microscopía electrónica.

Montpellier et al ¹⁵¹ demostró que existen al menos tres formas de la proteína ORF2 en cultivo celular y pacientes. Los autores detectaron ORF2 en las fracciones 2-7 de sus gradientes de iodixanol, dividiéndose en dos formas con diferente peso molecular: 90kDa y 75 kDa en las fracciones 3-5 y una tercera forma de 80 kDa en las fracciones 6-7, en las que

también se detectó ARN-VHE. Su estudio concluye que las proteínas ORF2 no asociadas a carga viral son translocadas en el lumen de retículo endoplasmático, glicosiladas y procesadas por proteasas, y finalmente secretadas por la vía de secreción. En cambio, las proteínas ORF2 asociadas a ARN-VHE se quedan en el citoplasma de la célula y posteriormente se ensamblan con los viriones sin pasar por el retículo endoplasmático. En este sentido la observación de los perfiles de VHE-Ag en los gradientes de nuestro estudio parece coincidir con estas observaciones, al mostrar perfiles amplios más homogéneos que los picos observados con el ARN-VHE cubriendo varias fracciones y por lo tanto de diferentes densidades. Este hecho sugiere la presencia de esas múltiples formas de VHE Ag reportadas por Montpellier et al ¹⁵¹. Sin embargo, resulta más enigmático la observación de picos de VHE Ag en fracciones de baja densidad en los gradientes de muestras de heces. Este hecho sugiere la presencia de este antígeno de forma libre, no ligado a viriones, en un tipo de muestra en la que esta proteína no debería estar presente. No resulta fácil de explicar la presencia de una proteína viral

“aislada” en heces, aunque se puede suponer que provenga de la secreción directa por enterocitos en los que el VHE esté replicando, esta misma explicación se podría aludir para la presencia de formas del ARN-VHE recuperadas en densidades bajas de los gradientes en heces (como la fracción 4 de los pacientes Px.2, Px.4 y Px.5). Resulta muy interesante que casi sistemáticamente se observen picos de VHE Ag en los gradientes de muestras de heces en estas densidades bajas, sin ninguna asociación con ARN-VHE (fracciones totalmente opuestas del gradiente), mientras que en plasma estos perfiles son mucho más homogéneos indicando múltiples formas de densidades diferentes. Se puede especular que la forma de replicación del VHE en intestino y en hepatocitos es diferente, dando lugar a la liberación de VHE Ag de diferentes formas. El estudio de Yin et al ²³ en suero de pacientes infectados con VHE demostró que la forma de VHE-Ag no asociada a viriones es el resultado de un proceso de traducción diferente iniciado con un codón interior AUG no reconocido previamente. Asimismo, existen diferencias en las secuencias N-terminales de ambos tipos de VHE-Ag

dando como resultado diferentes destinos: la mayor parte del VHE-Ag no asociado a partículas virales se secreta en el espacio extracelular como dímero glicosilado, mientras que el VHE-Ag asociado a viriones permanece en el citosol de la célula hasta ensamblarse en partículas de virus con capacidad infectiva ²³. La traducción de múltiples proteínas del mismo ARNm es una forma de aumentar la capacidad de codificación utilizada frecuentemente por otros virus ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. A pesar de que el papel del VHE-Ag libre en la infección natural todavía no se ha investigado demasiado, algunos estudios sugieren que este no es esencial para el ciclo de vida del virus, pero supone una ayuda para reducir la neutralización por anticuerpos, actuando como un cebo contra la inmunidad humoral durante la infección por VHE ¹⁷⁹. Es posible que el VHE-Ag no asociado a viriones desempeñe funciones inmunomoduladoras adicionales a la infección natural por VHE, como ocurre con el VHA ¹⁸⁰.

En cuanto a los perfiles de ARN-VHE observados en nuestro estudio, estos parecen coincidir con los ya publicados por Behrendt et al ¹⁷³, donde observaron en

gradientes de iodixanol picos de ARN-VHE con una densidad de aproximadamente 1,1-1,15 g/ml en plasma de pacientes con infección crónica y aguda. Nuestros resultados muestran densidades que van de 1,05-1,14 g/ml en las muestras de plasma en las fracciones 5-8 del gradiente (situándose el pico sistemáticamente en la fracción 6) sin diferencias significativas entre pacientes con infección aguda y pacientes con infección crónica. En las muestras de heces, los picos de ARN-VHE aparecen en las fracciones 8-11 del gradiente, en densidades 1,23-1,39 g/ml, con densidades medias de 1,3 g/ml, ligeramente superiores a las densidades a las que se encuentran las partículas virales no envueltas (1,2-1,25 g/ml). Como se ha indicado en el apartado de resultados correspondiente, los picos en las fracciones 11 con densidades tan altas no se valoran en cuanto a su densidad, asumiendo algún proceso de precipitación o alteración del gradiente en esta fracción final incluso por la presencia elevada de viriones en el mismo. Estos resultados muestran la circulación de viriones de VHE asociados a membranas en plasma, mientras que en heces éstos se encuentran mayoritariamente de manera

independiente, sin importar el tipo de infección. No olvidemos la presencia de formas del -ARN-VHE recuperadas en densidades bajas de los gradientes en heces (como la fracción 4 de los pacientes Px.2, Px.4 y Px.5) que indicaría ARN-VHE ligado a membranas, en esta caso EVs de mayor tamaño que en plasma por su menor densidad (en plasma se recuperan en la fracción 6), pudiendo tratarse de lipoproteínas o quilomicrones con partículas virales en su interior, como ocurre con el VHC ⁷⁵. Si a esto se añade la evidencia del VHE Ag en densidades bajas que comentamos previamente, esta información podría indicar la producción local de viriones por enterocitos en los que el VHE este replicando ⁷¹.

En relación a esta dualidad del VHE que forma estructuras asociadas a membranas además de viriones libres, es interesante comentar los resultados del trabajo reciente de Capelli et al ⁷². Estos autores muestran que la liberación de partículas de VHE por los hepatocitos esta polarizada de forma que las liberadas tanto apical como baso lateralmente están asociadas a lípidos. Mediante microscopía confocal reportan que la

proteína de la cápside del marco de lectura abierto 2 (ORF2) se colocaliza apicalmente con la proteína del virus ORF3. Estos autores también reportan proteínas ORF2 glicosiladas solubles secretadas apical y baso lateralmente en cantidades similares, datos replicados posteriormente por Marion et al ⁷¹. Estos datos de hepatocitos polarizados sugieren que las partículas de VHE infecciosas se liberan principalmente en la bilis, mientras que la pequeña fracción liberada en la sangre podría propagar el VHE por el huésped. Nuestros resultados parecen confirmar las observaciones de Capelli et al, en el sentido de que observamos proteínas VHE Ag (que corresponderían al producto proteico del ORF2) en forma libre soluble, por lo que se puede deducir fácilmente que estarían glicosiladas. Así mismo observamos mediante una metodología análoga, (gradientes de iodixanol) la presencia de partículas VHE asociadas a membranas (estos autores indican lípidos) y otras que no parecen ligadas a estructuras membranosas, por la heterogeneidad de densidades, así como la heterogeneidad de tamaños observados mediante microscopía electrónica, no se puede

descartar, que estas estructuras membranosas sean grandes lipoproteínas de muy baja densidad o quilomicrones. La existencia de estas dos formas del VHE (aislado o asociado a membranas) podría tener una correlación directa con el tipo de infección que causan. Al encontrarse en plasma las partículas con envuelta éstas pueden llegar a tener acceso a otros sistemas, como también sugiere Capelli et al, provocando patologías sistémicas e incluso traspasando la barrera hematoencefálica y provocar así patologías neurológicas como el síndrome de Guillain-Barré. El estudio de Capelli et al también comenta que las partículas liberadas apicalmente colocan ORF2 con ORF3, pudiéndose especular que esta segunda proteína pudiera estar asociada a las patologías sistémicas relacionadas con las partículas liberadas al plasma en estructuras membranosas ⁷². Estas formas serían las que podrían transmitirse a nivel postransfusional o incluso a nivel zoonótico, por contacto de sangre de animales infectados con los productos cárnicos. En este sentido, tras el consumo de estos productos y por lo tanto la ingestión de estas formas del VHE asociado a

membrana, estas estructuras membranosas serían degradadas en el tracto digestivo. Estudios publicados han detectado ARN-VHE y proteínas virales en tejido neuronal en ratones inoculados con VHE e incluso en líneas celulares de tejido neuronal humano ^{181,182}. En modelos animales se demostró que el VHE podía traspasar la barrera hematoencefálica mediante estructuras celulares endoteliales¹⁸³.

En cuanto a las partículas detectadas en heces estas serían, según su alta densidad mayoritaria, partículas desnudas sin envuelta lipídica, que podrían provenir de la liberadas de forma baso lateral hacia los canalículos biliares y por tanto sin la proteína ORF3, donde por la acción de las sales biliares se eliminarían las posibles estructuras membranosas y serían detectadas en el lumen intestinal en las heces. Estas partículas virales se transmitirían desde las heces por la vía oro-fecal, mediante aguas contaminadas, causando patologías agudas de forma inicial y que al estimular intensamente la respuesta inmune se diera lugar a la eliminación de la infección previniendo el desarrollo de una carga viral con envuelta suficiente para generar una patología más

sistémica. En cambio, una infección por vía parenteral podría representar el contacto del huésped con una viremia con envuelta de mayor proporción y un acceso de estas partículas a múltiples órganos, favoreciendo la patología sistémica. No obstante, la producción apical de partículas con envuelta por parte de los hepatocitos (según los resultados reportados por Capelli), representaría un riesgo siempre presente de patología sistémica incluso en infecciones por vía enteral, aunque, se podría postular que sería menos probable que en la transmisión por vía parenteral. Sin embargo, por lo dicho anteriormente no podemos descartar que la presencia de ARN VHE en heces de estructuras membranosas, así como VHE Ag libre sea debido a replicación de este agente en los enterocitos.

Como se ha comentado previamente respecto al VHE-Ag, este fue detectado en todas las muestras si bien con diferencias en su distribución según el origen de la muestra. En plasma, el VHE-Ag se detectó casi en todas las fracciones del gradiente, sugiriendo la presencia de distintos fragmentos de la proteína ORF2 con diferentes densidades, sin necesidad de estar relacionados con

viriones infectivos. Estos datos se asemejan a los obtenidos por Behrendt et al ¹⁷³. Asimismo, se ven diferencias en los valores de VHE-Ag según el tipo de infección: en los pacientes con infección aguda (Px.1, Px.2 y Px.3) los valores de VHE-Ag no superan los 11 OD 450nm. En cambio, en los pacientes con infección crónica (Px.4 – Px.6), estos van de 12 a 15 OD 450nm. En cambio, como se ha comentado previamente, en las muestras de heces, se ha detectado una disociación sistemática del VHE-Ag y el ARN-VHE en todos los gradientes, estando el pico de VHE-Ag en las primeras fracciones del gradiente, con densidades en torno a 1,05-1,14 g/ml, y la carga viral en las últimas fracciones de los gradientes, con densidades del orden de 1,3 g/ml. Como se ha comentado, estos datos sugieren que existe una clara disociación entre fragmentos de ORF2 y partículas virales en heces sugiriendo su producción y liberación local por parte de los enterocitos por la posible replicación del VHE en ellos. En este sentido, se ha sugerido que este tejido podría ser la diana inicial de este virus entérico, que liberaría partículas a la circulación portal accediendo de esta manera al hígado.

De ser así, los enterocitos, al igual que se ha demostrado para los hepatocitos, liberarían VHE asociado a membranas, incluso a lipoproteínas tipo VLDL que serían captadas por el hígado. No se observaron diferencias entre pacientes con infección aguda y pacientes con infección crónica.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en los que los viriones de VHE circulan asociados a membranas en plasma y se encuentran de manera independiente en heces, se llevó a cabo el aislamiento de EVs en fracciones seleccionadas de los gradientes y las muestras totales basales de heces de los seis pacientes. La fracción 6 de la muestra de plasma del Px.4 seleccionada mostró que en plasma el virus circula asociado a membranas en EVs, coincidiendo con los resultados obtenidos anteriormente y los ya descritos por Capelli et al ⁷². En las fracciones seleccionadas correspondientes a muestras de heces (fracción 11 de Px.5 y Px.2 y fracción 1 del Px.3), se observó la presencia del VHE mayoritariamente sin envuelta, como ya se había descrito en la bibliografía ¹⁸⁴ y de forma acorde a lo observado anteriormente en este estudio, pero también

se observó una pequeña población de VHE presente en heces asociado a membranas en la fracción 11 de la muestra de heces del Px.5. Esta situación se ha corroborado con las imágenes de microscopía y criomicroscopía electrónica, en las que se pueden observar partículas virales envueltas por una membrana, de forma similar a lo que se observa en las muestras de plasma, con unos tamaños que oscilan entre 100 y 200 nm. Estas estructuras, dado su tamaño, podrían ser vesículas extracelulares o lipoproteínas que transportaran en su interior partículas virales. Sin embargo, las partículas que se encuentran dentro de estas estructuras han presentado diversos tamaños, en su mayoría mayores a los 27-34 nm que se considera que tiene el VHE, por lo que podría tratarse de otros virus o partículas de otra índole (Figura 38 y Figura 39). Asimismo, si se han observado partículas virales libres de tamaños que rondan los 25-35 nm y con formas icosaédricas, pudiendo tratarse de partículas de VHE no asociadas a membranas (Figura 40 y 41), coincidiendo con lo ya descrito con anterioridad ^{151,184,185}.

Para comprobar si las diferencias entre las partículas y cargas virales entre muestras de plasma y heces se observaban también en la composición y distribución de la población viral, se utilizó la secuenciación masiva. Esta técnica ya había sido utilizada previamente para el estudio de diversos virus de hepatitis, incluido el VHE, con el fin de caracterizar la composición genómica de la población viral, identificar reinfecciones, mutaciones asociadas a resistencia a tratamientos, etc. ¹⁴¹. Este análisis ha permitido observar diferencias entre las muestras de heces y de plasma por lo que respecta al número de haplotipos y mutaciones de las muestras, pero no existe una distancia genética remarcada entre estos, si no que las quasiespecies de las muestras de heces y de plasma de un mismo paciente se encuentran estrechamente relacionadas a pesar de las diferencias observadas en las cargas virales y los análisis anteriores. No se observan distribuciones de quasiespecies diferenciadas entre las muestras de plasma y de heces de cada paciente ni tampoco entre pacientes con infección aguda y pacientes con infección crónica. Se observa una menor distancia de Nei-Li entre los Px.1 y

Px.2 con el resto de pacientes, tanto en el ORF1 como en el ORF2 de ambas muestras. Tanto el Px.1 como el Px.2 son naturales de Pakistán por lo que se trata de un punto en común entre ambos. Una posible explicación a estos resultados tan estrechamente relacionados es que pudieran deberse a que ambos pacientes coincidieron en sus visitas a Pakistán, pudiendo tratarse de familiares o más probablemente provenir de una misma región del país, cosa frecuente en las comunidades de emigrantes y haber viajado a su región de origen en el mismo periodo de tiempo. En este sentido se han descrito varios brotes de VHE relacionados con la presencia del virus en contenedores de agua y alimentos de ciertas zonas del país ^{29,63}. Con el fin de confirmar esta posibilidad, sería interesante aplicar una encuesta epidemiológica más detallada a ambos pacientes para esclarecer esta conexión.

Por lo que respecta a la estrecha relación entre la secuencia máster del ORF1 de la muestra de plasma del Px.6 con la secuencia de heces con cuatro mutaciones (y viceversa, la secuencia máster de heces del Px.6 se relacionada con la secuencia de plasma con cuatro

mutaciones.), podría tener varias explicaciones. En primer lugar, podría tratarse de una recogida de muestras con horas o incluso días de diferencia, de forma que hubiera tenido lugar una cierta evolución de la quasispecie, pero esto resultaría muy inverosímil porque el tiempo transcurrido sería muy corto para justificar estas cuatro mutaciones diferentes entre plasma y heces. Sin embargo, ambas muestras se recogieron el mismo día en la cita con su médico, por lo que queda descartada esta posibilidad. Un dato extremadamente relevante en este caso es la historia epidemiológica del paciente. El Px.6 se diagnosticó con infección por VHE en el año 2012, hace ya más de 8 años. Durante este tiempo, se ha visto sometido a hasta tres ciclos de tratamiento con RBV, todos sin éxito y con recidiva de la infección. Es posible que el largo tiempo de infección así como los diferentes tratamientos con RBV a los que ha sido sometido el paciente, hayan podido hacer que las poblaciones virales en plasma y heces se encontraran bajo presiones selectivas diferentes, diferenciándose cada vez más las poblaciones virales hasta contar con cuatro mutaciones

entre las secuencias máster de la muestra de plasma y la muestra de heces. Asimismo, esta diferencia de cuatro mutaciones entre las secuencias observadas en el ORF1 no se ha observado en el ORF2, con lo cual otra posible explicación sería estudiar la zona del genoma donde vemos estas diferencias. El ORF1 es una parte del genoma que presenta una alta variabilidad, a diferencia del ORF2 del mismo, el cual está altamente conservado al tratarse de la zona genómica de codificación de la cápside viral, imprescindible para la supervivencia del virus^{142,155}. Además, se ha demostrado que la RBV es un fármaco mutagénico y se ha descrito que puede producir mutaciones en varias zonas del genoma, incluyendo el ORF1^{121,126,129}.

En definitiva, la secuenciación masiva nos es útil para valorar el contenido de las poblaciones virales, pudiendo observar diferencias entre pacientes pero no entre las muestras de plasma y heces de un mismo paciente: vemos, por tanto, que las poblaciones virales de plasma y de heces en un paciente son iguales. Asimismo, no se observan diferencias en cuanto al tipo de infección: las poblaciones virales de las infecciones agudas (Px.1-Px.3)

y de las infecciones crónicas (Px.4-Px.6) se comportan de la misma manera. Esa similitud de las poblaciones virales en plasma y heces demuestra que de las heces se puede obtener la misma información de la infección que del plasma, pudiendo utilizarse como muestra diagnóstica y como forma de monitorizar la infección y el tratamiento con RBV, como ya se propuso anteriormente con la orina¹⁷⁰. Sin embargo, cabe destacar el caso de tres pacientes. En primer lugar, los Px.1 y Px.2, en las secuencias de los cuales se ha detectado un alto grado de parentesco de la población viral y que sería interesante estudiar en profundidad. Asimismo, también cabe destacar al Px.6, el cual dado el complejo historial de su infección, requeriría de estudios más en profundidad y centrados exclusivamente en su línea temporal.

Los resultados globales de esta tesis doctoral sugieren cambios y mejoras para llevar a cabo el diagnóstico y tratamiento de la infección por el VHE. En primer lugar, se sugiere no utilizar la detección de IgM con el fin de caracterizar una infección aguda o crónica, y añadir a esta la determinación de la carga viral en plasma y la detección de VHE-Ag, tal y como viene recogido en las

guías clínicas para el tratamiento de la infección por el VHE ¹⁵⁵. Asimismo, en esta tesis se propone una nueva herramienta diagnóstica: las heces. Los resultados obtenidos han demostrado 1) que las cargas virales en heces pueden llegar a ser hasta 3 logaritmos más altas que en plasma, suponiendo una mayor facilidad de detección del virus en el uso de técnicas moleculares en las que la carga viral pueda suponer un problema o un límite de detección, 2) el estudio de las cargas virales en plasma y heces de manera paralela en pacientes con infección crónica por VHE y que están en tratamiento con RBV supone una mejora en la monitorización del tratamiento, útil para decidir la finalización del mismo y prevenir recidivas de la infección. 3) tanto en plasma como en menor proporción en heces, las partículas virales se encuentran asociadas a membranas, si bien en heces también se encuentran las partículas virales de forma independiente o sin envuelta, pudiendo ser más susceptibles a ensayos inmunohistoquímicos, 4) las quasiespecies de las muestras de plasma y de heces se encuentran estrechamente relacionadas intrapaciente, evidenciando que las poblaciones virales en plasma y

heces se encuentran bajo la misma presión selectiva y por tanto, se trata de la misma población viral, 5) no existen diferencias significativas entre las poblaciones virales de muestras de plasma y de heces de pacientes con infección crónica y las poblaciones virales en plasma y en heces de pacientes con infección aguda.

En definitiva, el uso de las heces como herramienta diagnóstica añadida al uso ya bien extendido del plasma podría facilitar el diagnóstico y la monitorización de las infecciones aguda y crónica por el VHE. Ambas muestras diagnósticas han demostrado ser útiles y fiables para dar suficiente información clínica necesaria para el tratamiento de este tipo de infección viral.

Conclusiones

6. Conclusiones

1. La inmunoglobulina M se detecta en plasma de pacientes con infección aguda e infección crónica E de forma pentamérica, similar a lo que ocurre con la IgM anti-VHD¹⁴⁴.
2. La detección y cuantificación paralela de ARN-VHE en plasma y en heces es útil para diagnóstico y monitorización de pacientes con infección crónica E en tratamiento antiviral, la persistencia de ARN-VHE en las heces en ausencia de su presencia en sangre se asocia a recidivas tras la interrupción del tratamiento. El uso de heces como muestra diagnóstica supone una novedad ventajosa en el diagnóstico de la infección por VHE al tratarse de una muestra de fácil obtención mediante técnicas no invasivas, con cargas virales frecuentemente mayores que en plasma, y con las cuales se descarta tener dificultades a la hora de obtener una cantidad de muestra suficiente para llevar a cabo los estudios.

3. Los viriones de VHE circulan en plasma asociados a membranas, como ya se ha descrito previamente ¹⁵⁰. En heces el VHE está presente mayormente libre, sin estar asociado a membranas. Sin embargo, una pequeña proporción podría estar asociada a EVs.
4. En heces se ha detectado una disociación sistemática del VHE-Ag y el ARN-VHE en todos los gradientes mientras que en plasma, se detectan distintos fragmentos de la proteína ORF2 con diferentes densidades, pudiendo tratarse de dos formas diferentes de ORF2, una de ellas relacionada con viriones infectivos.
6. Las quasiespecies de las muestras de plasma y de heces de los seis pacientes muestran una distribución homogénea, estando estrechamente relacionadas las muestras de heces y plasma intrapaciente y demostrando que se trata de la misma población viral en ambas muestras.
7. Los Px.1 y Px.2 parecen estar estrechamente relacionados. Naturales de Pakistán, podría

tratarse de familiares infectados con la misma variante de virus o viajeros con rutas de viaje similares.

8. El Px.6, dada su historia clínica y su larga infección por el VHE, debería estudiarse separado de los demás pacientes con el fin de caracterizar mejor la población viral de sus muestras para así dar con una estrategia de tratamiento eficaz.

Limitaciones del estudio

7. Limitaciones del estudio

Esta tesis doctoral consta de diversas limitaciones. La primera es el número de pacientes incluidos en el estudio. La cantidad de pacientes con infección aguda que desarrollan infección crónica por VHE es reducida, tratándose de pacientes inmunocomprometidos previamente o receptores de órgano sólido que han viajado a zonas donde el virus es endémico o han podido consumir carne de cerdo cruda o poco cocinada. Asimismo, la captación de estos pacientes y la recolecta pareada de muestras de plasma y de heces en tiempos concretos del tratamiento incrementa la dificultad de aumentar el número de pacientes admitidos en el estudio. Por lo que respecta a la recolecta de muestras de los pacientes con infección aguda, éstos también muestran una dificultad: la enfermedad se autolimita en un plazo de dos a tres meses, pudiendo recaudar alrededor de 5-6 muestras pareadas de las cuales aproximadamente la mitad tienen carga viral de VHE detectable.

Otra limitación del estudio consiste en la amplificación de las muestras para su secuenciación: el VHE consta de

mucha variabilidad en su genoma inter e intragenotipos, por lo que en muchas ocasiones los cebadores diseñados no amplifican todas las muestras del estudio, teniendo que reducir el número de muestras utilizadas. Además, los cebadores diseñados amplifican de manera efectiva las muestras que presentan una carga viral superior a cuatro logaritmos, quedando muchas de las muestras de monitorización de tratamiento excluidas, sobre todo las correspondientes a las últimas semanas de seguimiento.

Por último, el procesamiento de las muestras de heces también supone un reto: la variabilidad de su composición puede dar lugar a contaminaciones, amplificaciones de otros microorganismos no deseados u obturaciones de los equipos de procesado de muestras.

Líneas de futuro

8. Líneas de futuro

A raíz de los resultados obtenidos en este estudio sería interesante estudiar la isoforma de la IgM anti-VHE durante la infección aguda por el VHE así como durante la infección crónica y su tratamiento con RBV para, por un lado, observar que es pentamérica durante todo el transcurso de la infección, y para determinar la durabilidad de detección la IgM en la infección.

Con el fin de caracterizar las partículas asociadas a membranas identificadas en las muestras de heces sería interesante llevar a cabo un cultivo de VHE que permitiera obtener así cantidades de muestra mayores, permitiendo la realización de otras técnicas y poder realizar microscopía electrónica, citometría y gradientes de iodixanol.

También sería interesante secuenciar todas las muestras secuenciales obtenidas en el transcurso de la infección y poder determinar si existen sustituciones asociadas a resistencia frente al tratamiento con RBV diferenciales entre las muestras de plasma y las de heces tanto de un mismo paciente como de pacientes diferentes.

Por último, la continuación del estudio de la infección del Px.6 para su correcto y efectivo tratamiento es de gran interés; así como clarificar la relación genética entre los Px.1 y Px.2.

Bibliografía

9. Bibliografía

1. Viswanathan, R. Epidemiology. *Indian J. Med. Res.* **45**, 1–29 (1957).
2. Tam, A. W. *et al.* Hepatitis E Virus (HEV): Molecular Cloning and Sequencing of the Full-Length Viral Genome. **185**, 120–131 (1991).
3. Huang, C. C. *et al.* Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* **191**, 550–558 (1992).
4. Tsarev, S. A. *et al.* Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 559–563 (1992).
5. Smith, D. B. & Simmonds, P. Classification and genomic diversity of enterically transmitted hepatitis viruses. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, 1–16 (2018).
6. Wedemeyer, H., Pischke, S. & Manns, M. P. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* **142**, 1388–1397 (2012).
7. Holla, R. P., Ahmad, I., Ahmad, Z. & Jameel, S. Molecular Virology of Hepatitis E Virus. *Semin. Liver Dis.* **33**, 3–14 (2013).
8. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>. (2019).
9. CDC. *Viral Hepatitis - Hepatitis E Information 2015* (2016).
10. WHO. *Hepatitis E 2018* <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e> (2016).

11. Khuroo, M. S., Kamili, S. & Yattoo, G. N. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**, 778–784 (2004).
12. Cao, D. & Meng, X.-J. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerg. Microbes Infect.* **1**, 1–10 (2012).
13. Ditah, I. *et al.* Current Epidemiology of Hepatitis E Virus Infection in the United States: Low Seroprevalence in the National Health and Nutrition Evaluation Survey. **60**, 815–822 (2014).
14. Faramawi, M. F., Johnson, E., Chen, S. & Pannala, P. R. The incidence of hepatitis E virus infection in the general population of the USA. *Epidemiol. Infect.* **139**, 1145–1150 (2011).
15. Cook, N., Agostino, M. D. & Johne, R. Potential Approaches to Assess the Infectivity of Hepatitis E Virus in Pork Products : A Review. *Food Environ. Virol.* **9**, 243–255 (2017).
16. Meader, E., Thomas, D., Salmon, R. & Sillis, M. Seroprevalence of Hepatitis E Virus in the UK Farming Population. *Zoonosis Public Heal.* **57**, 504–509 (2010).
17. Lhomme, S., Marion, O., Abravanel, F., Izopet, J. & Kamar, N. Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. *J. Clin. Med.* **9**, 331 (2020).
18. Fry, K. E. *et al.* Hepatitis E virus (HEV): strain variation in the nonstructural gene region encoding consensus motifs for an RNA-dependent RNA polymerase and an ATP/GTP binding site. *Virus Genes* **6**, 173–185 (1992).
19. Nair, V. P. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Induced

- Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* **12**, 1–31 (2016).
20. Kenney, S. P. & Meng, X.-J. Hepatitis E Virus Genome Structure and Replication Strategy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **9**, (2019).
 21. Nimgaonkar, I., Ding, Q., Schwartz, R. E. & Ploss, A. Hepatitis e virus: Advances and challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 96–110 (2018).
 22. Pérez-Gracia, M. T., Suay, B. & Mateos-Lindemann, M. L. Hepatitis E: an emerging disease. *Infect. Genet. Evol.* **22**, 40–59 (2014).
 23. Yin, X. *et al.* Origin , antigenicity , and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 4773–4778 (2018).
 24. Ding, Q. *et al.* Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 3–8 (2017).
 25. Worm, H. C., van der Poel, W. H. M. & Brandstatter, G. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect.* **4**, 657–666 (2002).
 26. Wang, S. *et al.* Rabbit and human hepatitis E virus strains belong to a single serotype. *Virus Res.* **176**, 101–106 (2013).
 27. Centers for Disease Control and Prevention. *Investigation of Hepatitis E Outbreak Among Refugees. MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report* vol. 62 (2013).
 28. Ahmed, J. A. *et al.* Hepatitis E outbreak, Dadaab refugee

- camp, Kenya, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1010–1012 (2013).
29. Baqir, M. *et al.* Infectious diseases in the aftermath of monsoon flooding in Pakistan. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**, 76–79 (2012).
 30. Boccia, D. *et al.* High Mortality Associated with an Outbreak of Hepatitis E among Displaced Persons in Darfur, Sudan. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 1679–1684 (2006).
 31. Buti, M. *et al.* Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 1328–1332 (2006).
 32. Alberts, C. J. *et al.* Hepatitis E virus seroprevalence and determinants in various study populations in the Netherlands. *PLoS One* **13**, 1–17 (2018).
 33. Fang, S. Y. & Han, H. Hepatitis e viral infection in solid organ transplant patients. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **22**, 351–355 (2017).
 34. Spada, E. *et al.* A nationwide retrospective study on prevalence of hepatitis E virus infection in Italian blood donors. *Blood Transfus.* **16**, 413–421 (2018).
 35. Banks, M. *et al.* Human and Porcine Hepatitis E Virus Strains, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 953–955 (2004).
 36. Grodzki, M. *et al.* Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis e virus in bivalve shellfish from France. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 4269–4276 (2014).
 37. Izopet, J. *et al.* Hepatitis E virus strains in rabbits and

- evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 1274–1281 (2012).
38. Ponterio, E. *et al.* Detection of serum antibodies to hepatitis E virus in domestic pigs in Italy using a recombinant swine HEV capsid protein. *BMC Vet. Res.* **10**, 1–7 (2014).
 39. Lhomme, S. *et al.* Wildlife reservoir for hepatitis E Virus, Southwestern France. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1224–1226 (2015).
 40. Boadella, M. *et al.* Increasing Contact with hepatitis E virus in red deer, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1994–1996 (2010).
 41. Rivero-Juarez, A. *et al.* Prevalence of hepatitis E virus infection in wild boars from Spain: A possible seasonal pattern? *BMC Vet. Res.* **14**, 4–9 (2018).
 42. Tardif-douglin, D., Ryan-silva, R. & Magnani, R. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Shellfish , United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 2085–2087 (2012).
 43. Li, T. C., Miyamura, T. & Takeda, N. Short report: Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**, 170–172 (2007).
 44. Liang, H. *et al.* Hepatitis E Virus Serosurvey among Pet Dogs and Cats in Several Developed Cities in China. **9**, 1–6 (2014).
 45. Zeng, M. Y. *et al.* High hepatitis E virus antibody positive rates in dogs and humans exposed to dogs in the south-west of China. *Zoonoses Public Health* **64**, 684–688 (2017).

46. Zhao, C. *et al.* A Novel Genotype of Hepatitis E Virus Prevalent Among Farmed Rabbits in China. *J. Med. Virol.* **1379**, 1371–1379 (2009).
47. Takahashi, M. *et al.* Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res.* **180**, 59–69 (2014).
48. Geng, J. *et al.* Phylogenetic analysis of the full genome of rabbit hepatitis E virus (rbHEV) and molecular biologic study on the possibility of cross species transmission of rbHEV. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **11**, 2020–2025 (2011).
49. Woo, P. C. Y. *et al.* New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1044–1048 (2014).
50. Lee, G.-H. *et al.* Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* **150**, 355–357 (2016).
51. Woo, P. C. Y. *et al.* New hepatitis e virus genotype in bactrian camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 2219–2221 (2016).
52. Woo, P. C. Y. *et al.* New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1044–1048 (2014).
53. Sander, A.-L., Corman, V. M., Lukashev, A. N. & Drexler, J. F. Evolutionary Origins of Enteric Hepatitis Viruses. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, (2018).
54. Simmonds, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis

- C virus - 15 years on. *J. Gen. Virol.* **85**, 3173–3188 (2004).
55. Vaughan, G. *et al.* Genetic relatedness among hepatitis A virus strains associated with food-borne outbreaks. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
56. Lu, L., Li, C. & Hagedorn, C. H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* **16**, 5–36 (2006).
57. Widén, F. *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiol. Infect.* **139**, 361–371 (2011).
58. Oliveira-Filho, E. F., König, M. & Thiel, H. J. Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet. Microbiol.* **165**, 148–154 (2013).
59. Ijaz, S. *et al.* Indigenous Hepatitis E in England and Wales From 2003 to 2012: Evidence of an emerging novel phylogroup of viruses. *J. Infect. Dis.* **209**, 1212–1218 (2014).
60. Hewitt, P. E. *et al.* Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet (London, England)* **384**, 1766–1773 (2014).
61. Smith, D. B. *et al.* Proposed reference sequences for Hepatitis E virus subtypes. **97**, 537–542 (2017).
62. Liu, P. *et al.* Phylogenetic analysis of 626 hepatitis E virus (HEV) isolates from humans and animals in China (1986–2011) showing genotype diversity and zoonotic transmission. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 428–434 (2012).
63. Ahmad, T. *et al.* Frequency of HEV contamination in sewerage waters in Pakistan. *J. Infect. Dev. Ctries.* **4**, 842–

845 (2010).

64. Ceylan, A., Ertem, M., Ilcin, E. & Ozekinci, T. A special risk group for hepatitis E infection : Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation. *Epidemiol. Infect.* **131**, 753–756 (2003).
65. Minuk, G. Y. *et al.* Serological evidence of hepatitis E virus infection in an indigenous North American population. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 439–442 (2007).
66. Riveiro-Barciela, M. *et al.* Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J. Clin. Gastroenterol.* **49**, 165–168 (2015).
67. Colson, P. *et al.* Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* **202**, 825–834 (2010).
68. Miyashita, K. *et al.* Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. *Hepatol. Res.* **42**, 870–878 (2012).
69. Sauleda, S. *et al.* Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). 1–8 (2014) doi:10.1111/trf.12929.
70. Riveiro-Barciela, M. *et al.* Red blood cell transfusion-transmitted acute hepatitis E in an immunocompetent subject in Europe: a case report. *Transfusion* **57**, 244–247 (2017).
71. Marion, O. *et al.* Hepatitis e virus replication in human intestinal cells. *Gut* **69**, 901–910 (2020).

72. Capelli, N. *et al.* Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J. Virol.* **93**, 1–14 (2019).
73. Balayan, M. S. *et al.* Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. *Intervirology* **20**, 23–31 (1983).
74. Bradley, D. W. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* **46**, 442–461 (1990).
75. Belouzard, S. *et al.* Entry and Release of Hepatitis C Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J. Virol.* **91**, 1–15 (2017).
76. Trust, T., Maloy, R. W. & Kommers, S. From 2D thinking to 3D printing: Preservice and in-service teacher teams explore a new technology. *Adv. Next-Generation Teach. Educ. through Digit. Tools Appl.* **496**, 161–178 (2016).
77. Snooks, M. J. *et al.* Vectorial Entry and Release of Hepatitis A Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J. Virol.* **82**, 8733–8742 (2008).
78. Yu, C. *et al.* Pathogenesis of Hepatitis E Virus and Hepatitis C Virus in Chimpanzees: Similarities and Differences. *J. Virol.* **84**, 11264–11278 (2010).
79. Lanford, R. E. *et al.* Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11223–11228 (2011).
80. Choi, Y. H., Zhang, X., Tran, C. & Skinner, B. Expression profiles of host immune response-related genes against HEV genotype 3 and genotype 1 infections in rhesus macaques. *J. Viral Hepat.* **25**, 986–995 (2018).
81. Dong, C. *et al.* Suppression of interferon-alpha signaling

- by hepatitis E virus. *Hepatology* **55**, 1324–1332 (2012).
82. Zhou, X. *et al.* Disparity of basal and therapeutically activated interferon signalling in constraining hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* **23**, 294–304 (2016).
 83. Nan, Y. *et al.* Enhancement of Interferon Induction by ORF3 Product of Hepatitis E Virus. *J. Virol.* **88**, 8696–8705 (2014).
 84. Yin, X. *et al.* Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. *PLoS Pathog.* **13**, 1–21 (2017).
 85. Srivastava, R. *et al.* Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral Immunol.* **20**, 56–65 (2007).
 86. Srivastava, R., Aggarwal, R., Bhagat, M. R., Chowdhury, A. & Naik, S. Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. *J. Viral Hepat.* **15**, 910–916 (2008).
 87. Prabhu, S. B. *et al.* Study of cellular immune response against Hepatitis E virus (HEV). *J. Viral Hepat.* **18**, 587–594 (2011).
 88. Lhomme, S., Legrand-Abravanel, F., Kamar, N. & Izopet, J. Screening, diagnosis and risks associated with Hepatitis E virus infection. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **17**, 403–418 (2019).
 89. Riveiro-Barciela, M. *et al.* Unexpected long-lasting anti-HEV IgM positivity: Is HEV antigen a better serological marker for hepatitis E infection diagnosis? *J. Viral Hepat.* **27**, (2020).

90. Khuroo, M. S., Kamili, S., Dar, M. Y., Moecklii, R. & Jameel, S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet (London, England)* vol. 341 1355 (1993).
91. Lenggenhager, D. & Weber, A. Hepatitis E Virus and the Liver: Clinical Settings and Liver Pathology. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **46**, 393–407 (2017).
92. Pischke, S. *et al.* Hepatitis E in Germany—an Under-Reported Infectious Disease. *Dtsch. Arztebl. Int.* **111**, 577–583 (2014).
93. Buti, M. *et al.* Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Children in the Northeast of Spain. *J. Hepatol.* **15**, 732–734 (2008).
94. Sauleda, S. *et al.* Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). *Transfusion* **55**, 972–979 (2015).
95. Wedemeyer, H., Pischke, S. & Manns, M. P. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* **142**, 1388-1397.e1 (2012).
96. Perez-Gracia, M. T., Garcia, M., Suay, B. & Mateos-Lindemann, M. L. Current Knowledge on Hepatitis E. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **3**, 117–126 (2015).
97. Navaneethan, U., Al Mohajer, M. & Shata, M. Hepatitis E and Pregnancy- Understanding the pathogenesis. *Liver Int.* **28**, 1190–1199 (2009).
98. Khuroo, M. S., Kamili, S. & Khuroo, M. S. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J. Viral Hepat.* **16**, 519–523 (2009).

99. Faber, M. *et al.* Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. *J. Viral Hepat.* **25**, 752–758 (2018).
100. Guillois, Y. *et al.* High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 351–357 (2016).
101. Said, B. *et al.* Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1738–1744 (2009).
102. Haagsma, E. B. *et al.* Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **14**, 547–553 (2008).
103. Gerolami, R., Moal, V. & Colson, P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *The New England journal of medicine* vol. 358 859–860 (2008).
104. Kamar, N. *et al.* Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **358**, 811–817 (2008).
105. Colson, P., Kaba, M., Moreau, J. & Brouqui, P. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J. Clin. Virol.* **45**, 269–271 (2009).
106. Kenfak-foguena, A. *et al.* Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1074–1078 (2011).
107. Kamar, N., Rostaing, L., Legrand-AbraVanel, F. & Izopet, J. How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? *American journal of transplantation : official journal of the American Society*

- of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* vol. 13 1935–1936 (2013).
108. Kamar, N. *et al.* Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* **140**, 1481–1489 (2011).
 109. Kamar, N. *et al.* Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am. J. Transplant* **8**, 1744–1748 (2008).
 110. Liu, H. & Ma, Y. Hepatitis E virus-associated Guillain – Barre syndrome : Revision of the literature. *Brain Behav.* **10**, 1–10 (2020).
 111. Fousekis, F. S., Mitselos, I. V & Christodoulou, D. K. Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus : An overview. *Clin. Mol. Hepatol.* **26**, 16–23 (2020).
 112. Bendall, R., Ellis, V., Ijaz, S., Ali, R. & Dalton, H. A Comparison of Two Commercially Available Anti-HEV IgG Kits and a Re-Evaluation of Anti-HEV IgG Seroprevalence Data in Developed Countries. *J. Med. Virol.* **85**, 799–805 (2010).
 113. Park, H. K. *et al.* Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays. *BMC Infect. Dis.* **12**, 10–15 (2012).
 114. Pawlotsky, J.-M. Hepatitis E screening for blood donations: an urgent need? *Lancet* **384**, 1729–1730 (2014).
 115. Gupta, E., Pandey, P., Pandey, S., Sharma, M. K. & Sarin, S. K. Role of hepatitis E virus antigen in confirming active

- viral replication in patients with acute viral hepatitis E infection. *J. Clin. Virol.* **58**, 374–377 (2013).
116. Vollmer, T., Knabbe, C. & Dreier, J. Comparison of Real-Time PCR and Antigen Assays for Detection of Hepatitis E Virus in Blood Donors. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2150–2156 (2014).
 117. Baylis, S. A., Hanschmann, K. M., Blümel, J. & Nübling, C. M. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: An initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1234–1239 (2011).
 118. Aggarwal, R. Diagnosis of hepatitis E. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 24–33 (2013).
 119. Abravanel, F., Lhomme, S., Rostaing, L., Kamar, N. & Izopeta, J. Protracted fecal shedding of HEV during ribavirin therapy predicts treatment relapse. *Clin. Infect. Dis.* **60**, 96–99 (2015).
 120. Marion, O. *et al.* Monitoring hepatitis E virus fecal shedding to optimize ribavirin treatment duration in chronically infected transplant patients. **70**, 206–214 (2019).
 121. Graci, J. D. & Cameron, C. E. Therapeutically targeting RNA viruses via lethal mutagenesis. *Future Virol.* **3**, 553–566 (2008).
 122. Crotty, S. *et al.* The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* **6**, 1375–1379 (2000).
 123. Tam, R. C. *et al.* Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J. Hepatol.*

- 30**, 376–382 (1999).
124. Sintchak, M. D. & Nimmesgern, E. The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology* **47**, 163–184 (2000).
 125. Perales, C., Quer, J., Gregori, J., Esteban, J. I. & Domingo, E. Resistance of Hepatitis C Virus to Inhibitors: Complexity and Clinical Implications. *Viruses* **7**, 5746–5766 (2015).
 126. Debing, Y. *et al.* Hepatitis E virus mutations associated with ribavirin treatment failure result in altered viral fitness and ribavirin sensitivity. *J. Hepatol.* **65**, 499–508 (2016).
 127. Lhomme, S. *et al.* Mutation in the Hepatitis E Virus Polymerase and Outcome of Ribavirin Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 1608–1614 (2016).
 128. Debing, Y. *et al.* A mutation in the hepatitis e virus RNA polymerase promotes its replication and associates with ribavirin treatment failure in organ transplant recipients. *Gastroenterology* **147**, 1008-1011.e7 (2014).
 129. Todt, D. *et al.* In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. 1733–1743 (2016) doi:10.1136/gutjnl-2015-311000.
 130. Pawlotsky, J. M. *et al.* EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C. *J. Hepatol.* **69**, 461–511 (2018).
 131. Hézode, C. *et al.* Triple therapy in treatment-experienced patients with HCV-cirrhosis in a multicentre cohort of the French Early Access Programme (ANRS CO20-CUPIC) - NCT01514890. *J. Hepatol.* **59**, 434–441 (2013).

132. Cornberg, M. *et al.* Sofosbuvir monotherapy fails to achieve HEV RNA elimination in patients with chronic hepatitis E - The HepNet SofE pilot study. *Journal of hepatology* vol. 73 696–699 (2020).
133. Arankalle, V. A., Paranjape, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Walimbe, A. M. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). *J. Gen. Virol.* **80 (Pt 7)**, 1691–1700 (1999).
134. Lhomme, S. *et al.* Influence of Polyproline Region and Macro Domain Genetic Heterogeneity on HEV Persistence in Immunocompromised Patients. *J. Infect. Dis.* **209**, 300–303 (2014).
135. Domingo, E. & Schuster, P. Quasispecies theory has come of age, and regular updates of the concept of mutation. Introduction. *Current topics in microbiology and immunology* vol. 392 ix–xi (2016).
136. Domingo, E. & Perales, C. Quasispecies and virus. *Eur. Biophys. J.* **47**, 443–457 (2018).
137. Domingo, E. Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin. Diagn. Virol.* **10**, 97–101 (1998).
138. Domingo, E. & Holland, J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 151–178 (1997).
139. Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Andino, R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**, 344–348 (2006).
140. Domingo, E. & Schuster, P. What Is a Quasispecies?

- Historical Origins and Current Scope. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **392**, 1–22 (2016).
141. Quer, J. *et al.* Deep sequencing in the management of hepatitis virus infections. *Virus Res.* **239**, 115–125 (2017).
142. Smith, D. B., Purdy, M. A. & Simmonds, P. Genetic Variability and the Classification of Hepatitis E Virus. *J. Virol.* **87**, 4161–4169 (2013).
143. Gouttenoire, J., Szkolnicka, D. & Moradpour, D. Treatment of chronic hepatitis E with ribavirin: lessons from deep sequencing. *Gut* **65**, 1583–1584 (2016).
144. Jardi, R. *et al.* Clinical significance of two forms of IgM antibody to hepatitis delta virus. *Hepatology* **14**, 25–28 (1991).
145. Baylis, S. A. *et al.* World health organization international standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 729–735 (2013).
146. R Team, C. & Team, R. *R: A Language And Environment For Statistical Computing.* (2012).
147. Nakai, W. *et al.* A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **6**, 33935 (2016).
148. Tkach, M. & Théry, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**, 1226–1232 (2016).
149. Gregori, J. *et al.* Viral quasispecies complexity measures. *Virology* **493**, 227–237 (2016).
150. Nagashima, S. *et al.* Characterization of the Quasi-

- Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J. Virol.* **91**, 1–16 (2017).
151. Montpellier, C. *et al.* Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology* **154**, 211–223.e8 (2018).
 152. Liu, Z., Zhang, X., Yu, Q. & He, J. J. Exosome-associated hepatitis C virus in cell cultures and patient plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **455**, 218–222 (2014).
 153. Ramakrishnaiah, V. *et al.* Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 13109 LP – 13113 (2013).
 154. Fujiwara, S. *et al.* Chronic hepatitis E: A review of the literature. *J. Viral Hepat.* **21**, 78–89 (2014).
 155. Dalton, H. R. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepatol.* **68**, 1256–1271 (2018).
 156. Krawczynski, K., Meng, X.-J. & Rybczynska, J. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. *Virus Res.* **161**, 78–83 (2011).
 157. Myint, K. S. A. *et al.* Hepatitis E antibody kinetics in Nepalese patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**, 938–941 (2006).
 158. Jardi, R. *et al.* Clinical significance of two forms of IgM antibody to hepatitis delta virus. *Hepatology* **14**, 25–28 (1991).
 159. Tsuda, F. *et al.* Low molecular weight (7s) immunoglobulin M antibody against hepatitis B core antigen in the serum for differentiating acute from

- persistent hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **87**, 159–164 (1984).
160. Huang, S. *et al.* Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One* **5**, e13560 (2010).
161. Zhao, C. & Wang, Y. Laboratory Diagnosis of HEV Infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* **948**, 191–209 (2016).
162. Germer, J. J. *et al.* Hepatitis e virus (HEV) detection and quantification by a real-time reverse transcription-PCR assay calibrated to the world health organization standard for HEV RNA. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 1478–1487 (2017).
163. Abravanel, F. *et al.* Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 897–902 (2012).
164. Al-Sadeq, D. W., Majdalawieh, A. F., Mesleh, A. G., Abdalla, O. M. & Nasrallah, G. K. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J. Med. Microbiol.* **67**, 466–480 (2018).
165. Webb, G. W. & Dalton, H. R. Hepatitis E: an underestimated emerging threat. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **6**, 2049936119837162 (2019).
166. Li, P. *et al.* The global epidemiology of hepatitis E virus infection: a systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* 0–1 (2020) doi:10.1111/liv.14468.
167. Dalton, H. R., Bendall, R., Ijaz, S. & Banks, M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet. Infect. Dis.* **8**, 698–709 (2008).
168. Zhang, F. *et al.* Detection of HEV Antigen as A Novel

- Marker for the Diagnosis of Hepatitis E. *J. Med. Virol.* **78**, 1441–1448 (2006).
169. Mishra, S., Borkakoti, J., Kumar, S. & Kar, P. Role of HEV antigen detection in HEV-related acute viral hepatitis and acute liver failure. *J. Med. Virol.* **88**, 2179–2185 (2016).
170. Geng, Y. *et al.* Detection and assessment of infectivity of hepatitis e virus in urine. *J. Hepatol.* **64**, 37–43 (2016).
171. Trémeaux, P. *et al.* Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection. *J. Clin. Virol.* **79**, 1–5 (2016).
172. Zhao, C. *et al.* Evaluation of an antigen-capture EIA for the diagnosis of hepatitis e virus infection. *J. Viral Hepat.* **22**, 957–963 (2015).
173. Behrendt, P. *et al.* Hepatitis e Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate between Acute and Chronic HEV Infection. *J. Infect. Dis.* **214**, 361–368 (2016).
174. Kuhns, M. C. *et al.* Improved detection of early acute, late acute, and occult Hepatitis B infections by an increased sensitivity HBsAg assay. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **118**, 41–45 (2019).
175. Lee, J. M. & Ahn, S. H. Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice. *World J. Gastroenterol.* **17**, 283–289 (2011).
176. Chenik, M., Chebli, K. & Blondel, D. Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism. *J. Virol.* **69**, 707–712 (1995).
177. Kobayashi, T., Watanabe, M., Kamitani, W., Tomonaga, K.

- & Ikuta, K. Translation initiation of a bicistronic mRNA of Borna disease virus: a 16-kDa phosphoprotein is initiated at an internal start codon. *Virology* **277**, 296–305 (2000).
178. Firth, A. E. & Brierley, I. Non-canonical translation in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **93**, 1385–1409 (2012).
179. Takahashi, M. *et al.* Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1112–1125 (2010).
180. Feng, Z. *et al.* A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* **496**, 367–371 (2013).
181. Zhou, X. *et al.* Hepatitis E virus infects neurons and brains. *J. Infect. Dis.* **215**, 1197–1206 (2017).
182. Drave, S. A. *et al.* Extra-hepatic replication and infection of hepatitis E virus in neuronal-derived cells. *J. Viral Hepat.* **23**, 512–521 (2016).
183. Shi, R. *et al.* Evidence of Hepatitis E virus breaking through the blood–brain barrier and replicating in the central nervous system. *J. Viral Hepat.* **23**, 930–939 (2016).
184. Feng, Z., Hirai-Yuki, A., McKnight, K. L. & Lemon, S. M. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annu. Rev. Virol.* **1**, 539–560 (2014).
185. Hirai-Yuki, A., Hensley, L., Whitmire, J. K. & Lemon, S. M. Biliary secretion of quasi-enveloped human hepatitis A virus. *MBio* **7**, 1–11 (2016).

