



REIAL ACADEMIA DE DOCTORS

Virus, virus entèrics, virus de l'hepatitis A

•

Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari electe

Excm. Sr. Àlbert Bosch i Navarro

Doctor en Ciències Biològiques

A l'acte de la seva recepció, 16 de novembre de 2000, i

discurs de contestació de l'acadèmic de número

Excm. Sr. Pere Costa i Batllori

Doctor en Veterinària

Barcelona

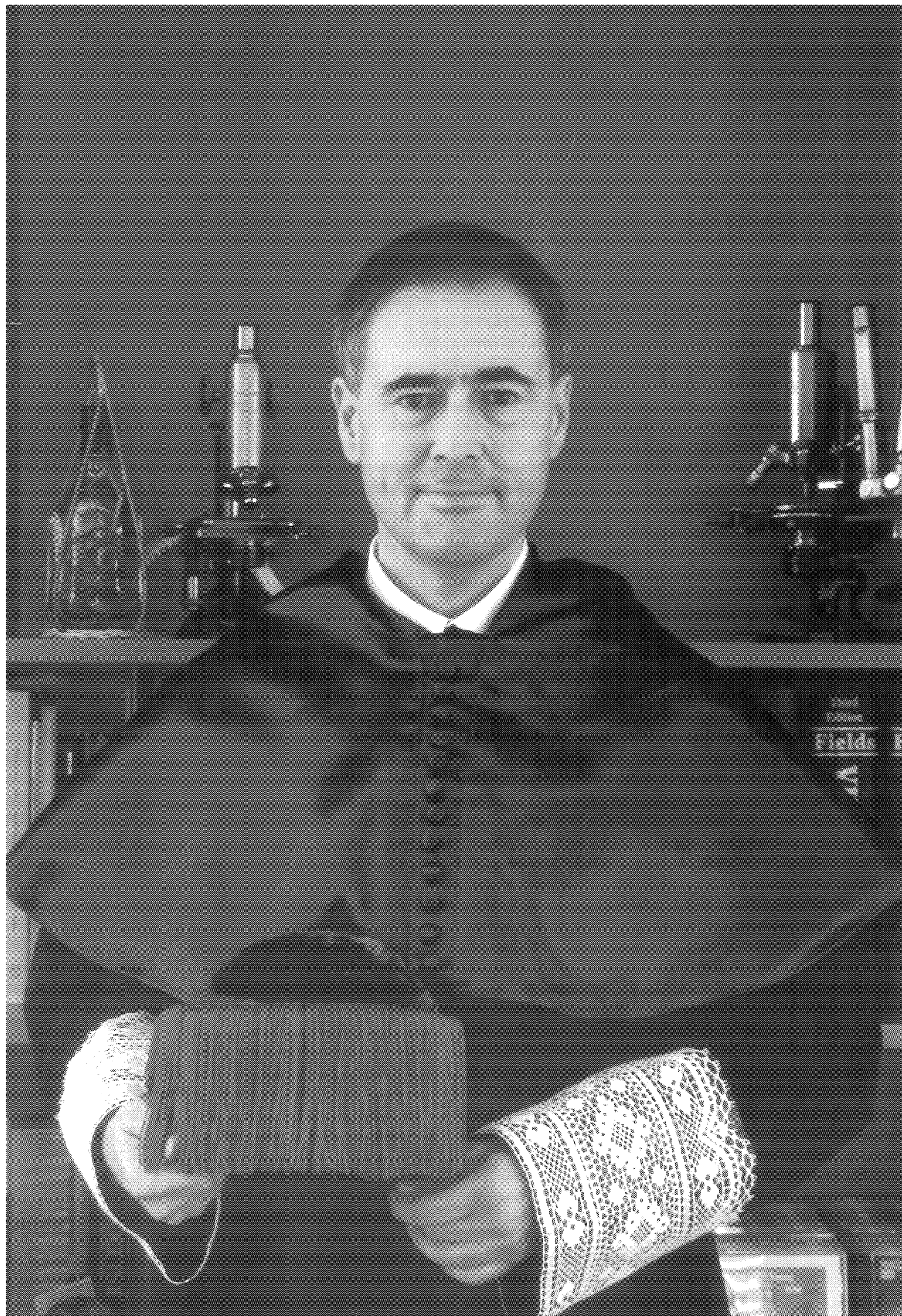
2000

Dr. Albert Bosch i Navarro

Virus, virus entèrics, virus de l'hepatitis A

REAL ACADEMIA DE DOCTORS

-Publicacions-



No sabem del cert quin tipus de microorganisme va originar la vida a la Terra, però tenim una idea bastant exacta del tipus de microorganisme que acabarà amb la vida en el nostre planeta: un virus.

Joshua Lederberg,
Premi Nobel de Medicina i Fisiologia, 1958.

Excel·lentíssim Sr. President,
Honorable Sr. Conseller,
Excel·lentíssims Srs. Acadèmics,
Senyores i Senyors:

Voldria dedicar els primers mots del meu discurs d'ingrés com a acadèmic de número a expressar el meu agraïment a aquesta docta corporació per a acollir-me i demostrar la seva confiança en la meva persona, especialment al seu president, Excel·lentíssim Sr. Dr Josep Casajuana i al Excel·lentíssim Sr. Dr. Pere Costa, per a actuar responenent al meu discurs. És un motiu d'orgull i satisfacció personal que una institució tant prestigiosa com la Reial Acadèmia de Doctors m'obri les portes perquè esdevingui un dels seus membres. Permetin-me que manifesti que els meus mèrits han estat àmpliament sobrevalorats i que tant entre els meus predecessors, com entre els meus contemporanis, es troben molts candidats que mereixerien amb més justícia que jo ser el primer membre doctorat per la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona acollit com a membre numerari per aquesta Reial Acadèmia. Voldria doncs aprofitar aquesta avinentesa per a rendir un modest homenatge als meus antics professors i als meus companys de Facultat. En aquest sentit voldria alhora palesar el meu deute als Drs. Maria Lluïsa Duran-Reynals i al ja desaparegut Frank Lilly de l'Albert

Einstein College of Medicine de Nova York, que van acollir un recent llicenciat totalment inexpert, i el van iniciar en el món de la recerca. És també de justícia que faci públic el meu etern reconeixement als amics i companys del Departament de Microbiologia de la Universitat de Barcelona que m'han fet costat en els moments difícils i que han tingut la paciència d'acceptar-me tal com sóc. Finalment vull agrair a la meua família la comprensió que han tingut per compartir-me amb la meua professió. En aquest darrer capítol d'agraïments vull esmentar el meu deute amb els meus pares que sempre m'ho van donar tot.

A l'hora d'escollir un tema per a aquest discurs protocol·lari que ha de tenir relació amb la meua especialització, no m'ha estat massa difícil el triar un tema de Virologia, i concretament sobre virus entèrics, que han estat el principal objectiu de la nostra recerca durant els darrers vint anys.

LA VIROLOGIA, ELS VIRUS, EL DESENVOLUPAMENT DE LA VIROLOGIA.

Per què m'han fascinat sempre els virus? Doncs perquè es tracta d'uns agents infecciosos molt particulars. La seva natura els separa de qualsevol altra patògen. No tenen una natura cel·lular; la seva organització és completament diferent a qualsevol microorganisme. Un virus mai creix, ni es divideix. Fins i tot es discuteix si es tracta d'éssers vius o no. El cert és que poden acabar amb la vida de qualsevol ésser viu. N'hi han que infecten animals, vegetals, bacteris, fongs, protozous..., és a dir, que s'han trobat virus en tots els hosts potencials on s'han buscat. Es tracta d'un paràsit intracel·lular obligat magníficament adaptat a la seva vida parasitària, que mostra unes estratègies de persistència d'una exquisida i complexa simplicitat.

Els virus han incidit de forma decisiva en la Història de la humanitat. Hi han hagut batalles que s'han guanyat o perdut quan un determinat virus ha infectat un exèrcit i ha respectat l'adversari. Hi ha hagut virus que han minvat les poblacions indígenes de diferents continents. Països sencers han sofert canvis geogràfics, econòmics i religiosos a resultes de terribles infeccions per les que no existia remei.

Un d'aquests virus que han deixat la seva petjada en l'esdevenidor de la humanitat ha estat el de la verola. Els primers signes de l'existència de la verola es remunten als temps de les mòmies egípcies, essent els cas més famós el de la mòmia de Ramsés V amb evidents marques típiques de les lesions de la verola, el qual va morir d'aquesta malaltia als seus trenta i pocs anys en l'any 1158 abans de Jesucrist. S'estima que la verola, per ella sola, va ser capaç de matar durant el segle XX uns 300 milions d'individus, xifra que representa aproximadament tres vegades les morts atribuïdes al global de totes les guerres del mateix segle¹. Durant els segles XVI i XVII, la verola va matar emperadors de Japó i

Birmània, així com reis i reines europeus, alterant les successions dinàstiques naturals².

La conquesta de Mèxic i Perú per part d'uns quants espanyols no hauria estat el mateix sense la decisiva participació de la verola i, en menor mesura, del xarampió. La major part dels conqueridors havien estat exposats prèviament a aquestes infeccions a Europa, on eren endèmiques, i havien per tant desenvolupat una certa immunitat. En canvi, els indígenes eren una població immunològicament "naïf" i per tant completament vulnerables a qualsevol d'aquests virus. La Història ens diu que l'any 1520, els asteques inicialment van derrotar als espanyols. No obstant, el mateix dia en el que els conqueridors es trobaven pràcticament fora del territori mexicà va començar l'epidèmia de verola. Aquesta infecció emergent no només va aniquilar gran part dels guerrers asteques, que van tenir tres milions i mig de morts en els següents dos anys, sinó que els va minvar psicològicament en veure que combatien contra un exercit protegit per un déu superior al que ells adoraven. Conseqüència directa d'aquesta epidèmia de verola va ser la subjugació del poble asteca, que a més es va convertir massivament a la religió d'un déu cristià que era capaç de lliurar-los de les morts i marques de la verola. Per altra banda, la verola va contribuir decisivament a que mai s'unissin uns Estats Units recent independitzats dels anglesos, i relativament lliures de verola, i un Canadà amb una elevada prevalença de la infecció.

A més de col·laborar en l'establiment del cristianisme a l'Amèrica llatina, els virus van també participar en l'expansió del tràfic d'esclaus per totes les Amèriques. El cas va ser que els negres africans eren relativament resistents als efectes de la febre groga que els causava símptomes de mareig, nàusees, mal de cap i vòmits, mentre que la població caucàsica i americana responia amb una greu febre hemorràgica. Els espanyols van importar esclaus africans per a treballar en camps i mines de les colònies

virus de la febre groga, també importat d'Àfrica a bord dels vaixells del tràfic d'esclaus. La febre groga va incidir en l'esdevenir del Nou Mon quan en la revolta dels esclaus negres a principis del segle XIX Napoleó va comprovar que les seves tropes eren aniquilades pel virus transmès pels mosquits. La mortalitat causada per la febre groga a l'exercit napoleònic va induir a l'emperador Francés a canviar els seus plans inicials d'expansió per Amèrica i a negociar la venda de la Louisiana als Estats Units.

El darrer exemple que vull citar de l'alteració del curs de la Història per part dels virus va ser causat per la pandèmia de grip que va assolar el món els anys 1918 i 1919. A la primavera del 1918, l'exercit alemany estava preparant l'atac definitiu a França per a acabar victoriosament la primera Gran Guerra. Els alemanys havien mobilitzat més d'un milió de soldats experimentats i magníficament armats. El mes de Juny però, la Wehrmacht va començar a patir els estralls causats per la més gran epidèmia de tots els temps. Aproximadament uns dos mil soldats de cada divisió alemanya van patir la grip, la qual cosa va permetre que els aliats, que estaven a punt de capitular, poguessin reorganitzar-se i contrarestar l'atac alemany i que finalment aconseguissin la victòria. De fet el nombre de morts que va causar l'epidèmia de grip va ser molt superior al de tota la I Guerra Mundial: entre vint i quaranta milions de persones van morir a causa d'una infecció que va ser letal no només per la població que normalment pateix la grip sinó també per individus adults sans, que es trobaven a la plenitud de la seva vida.

Taula 1. Virus entèrics humans. El terme virus entèric s'aplica genèricament a qualsevol virus de transmissió fecal-oral. No ha de ser confós amb el de *Enterovirus* que constitueixen un gènere dins de la família *Picornaviridae*. S'han descrit centenars de virus diferents que pertanyen als gèneres esmentats en aquesta taula que són excretats en la femta dels individus infectats.

Gènere	Nom vulgar	Simptomatologia
Enterovirus	poliovirus	paràlisi, meningitis, febre
	coxsackievirus A, coxsackievirus B	herpangina, meningitis, febre, processos respiratoris, malaltia de la ma peu i boca, miocarditis, anomalies cardíques, erupcions, pleurodinia, diabetis?
	echovirus	meningitis, febre, processos respiratoris, erupcions, gastroenteritis
Hepatovirus	hepatitis A	hepatitis
Reovirus	reovirus humà	desconeguda
Rotavirus	rotavirus humà	gastroenteritis
Mastadenovirus	adenovirus humà	gastroenteritis, processos respiratoris, conjuntivitis
Calicivirus	calicivirus humà	gastroenteritis
	virus de Norwalk	gastroenteritis, febre
	virus de Sapporo	gastroenteritis
	hepatitis E	hepatitis
Astrovirus	astrovirus humà	gastroenteritis
Parvovirus	parvovirus humà	gastroenteritis
Coronavirus	coronavirus humà	gastroenteritis, processos respiratoris
Torovirus	torovirus humà	gastroenteritis

ELS VIRUS ENTÈRICS.

Qualsevol virus que es pugui trobar en el intestí pertany al grup dels virus entèrics. Fins i tot en el cas que ens

restringim exclusivament als virus humans, la relació és molt amplia (taula 1). Tots aquests virus poden ser distribuïts en tres categories:

- Virus que causen gastroenteritis, entre els quals destaquen els rotavirus, adenovirus, calicivirus i astrovirus.
- Virus que causen hepatitis, que inclouen els agents etiològics de l'hepatitis A i l'hepatitis E.
- Virus que causen altres malalties, com poden ser els enterovirus, que tenen com a exemple més representatiu el virus responsable de la poliomielitis.

LA TRANSMISSIÓ DELS VIRUS ENTÈRICS.

Els epidemiòlegs segueixen la incidència d'una malaltia buscant correlacions entre les dades geogràfiques, estacionals, de distribució d'edats i els possibles models de transmissió. Quan, per exemple, una malaltia està restringida a un àmbit geogràfic això pot suggerir la implicació d'un vector. Un exemple en serien les infeccions transmeses per insectes, pròpies d'un grup de virus, agrupats dins de la categoria d'arbovirus, sense cap significat taxonòmic. Una marcada estacionalitat en la incidència d'una malaltia pot indicar unes vies de transmissió determinades, com pot ser el cas del xarampió o de la varicel·la que augmenten clarament quan els nens van a l'escola i entren en contacte directe. Una distribució d'una infecció per edats sempre ens proporciona indicis per a considerar o desestimar unes o altres vies de transmissió.

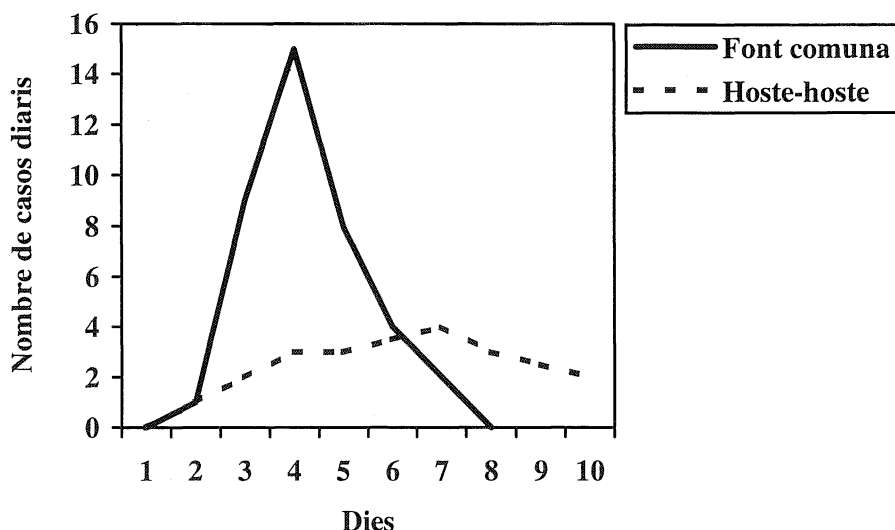


Figura 1. Models epidemiològics. La forma de la corba de l'epidèmia indica el tipus de propagació d'una malaltia. En el cas de les infeccions per virus entèrics, que es donen normalment per la ingestió d'aliments contaminats amb aquests virus, la corba mostra uns augments i disminucions del casos molt marcats, la qual cosa contrasta amb el model de les infeccions que es propaguen persona a persona.

Un determinat patògen, ja sigui entèric, respiratori, urinari, etc., té una forma específica de transmissió, que sempre inclou tres estadis: l'excreció a partir de l'organisme malalt, el viatge o fase extracorpòria i l'entrada al nou hoste susceptible. Amb tot, hi han dos grans models de malalties: les que es propaguen de hoste a hoste i les que tenen una propagació indirecte. La grip és un exemple d'una malaltia que segueix el primer model. La transmissió indirecte d'una infecció pot ser mitjançant vehicles vius, que anomenem en aquest cas vectors, com poden ser entre d'altres mosquits, paparres, polls i fins i tot vertebrats. També poden, no obstant, participar en la transmissió de malalties altres vehicles com els aliments, entre els que cal destacar l'aigua, i les superfícies

inanimades que s'anomenen fomites. En tots aquests darrers casos hi ha una font comuna de la malaltia. En conclusió doncs, hi han dos grans grups d'infeccions: les que es propaguen hoste a hoste i les que deriven d'una font comuna. En el cas dels virus entèrics, aquesta darrera possibilitat és l'habitual. Freqüentment un nombre de persones adquireixen el patògen perquè han ingerit un aliment contaminat, o perquè han estat en contacte amb el vehicle de la transmissió. Com es pot veure en la figura 1, els brots epidèmics que originen a partir d'una font comuna es caracteritzen per un ràpid augment de la incidència de la infecció, seguida d'un també ràpid descens en el nombre de casos.

Els virus entèrics són excretats en la femta dels individus que pateixen llurs infeccions en quantitats que poden ser molt elevades. D'aquesta manera els virus entèrics van a parar a l'ambient, on poden mantenir la seva capacitat infecciosa durant llargs períodes de temps.

La figura 2 il·lustra les diferents possibilitats de transmissió dels virus entèrics. Els virus responsables de les hepatitis entèriques (hepatitis A i E) poden ser transmesos per transfusió d'hemoderivats que continguin els respectius agents etiològics, ja que la virèmia es pot donar abans de l'aparició de la simptomatologia típica d'una hepatitis. Malgrat tot la forma més habitual de transmissió es dona, igual que succeeix en el cas dels virus de les gastroenteritis, per la via fecal-oral. En aquest darrer cas hi intervenen vehicles com l'aigua³, aliments, especialment marisc⁴, o objectes inanimats que hagin estat contaminats amb matèria fecal humana provenint d'un individu amb una infecció per virus entèrics⁵. Per alguns dels virus entèrics la mínima dosi infecciosa pot ser de només 10 partícules⁶, per a la qual cosa és fàcil la prevalença d'infeccions víriques entèriques de transmissió fecal-oral dins de la comunitat, sobre tot si tenim en compte que un malalt de gastroenteritis pot arribar a

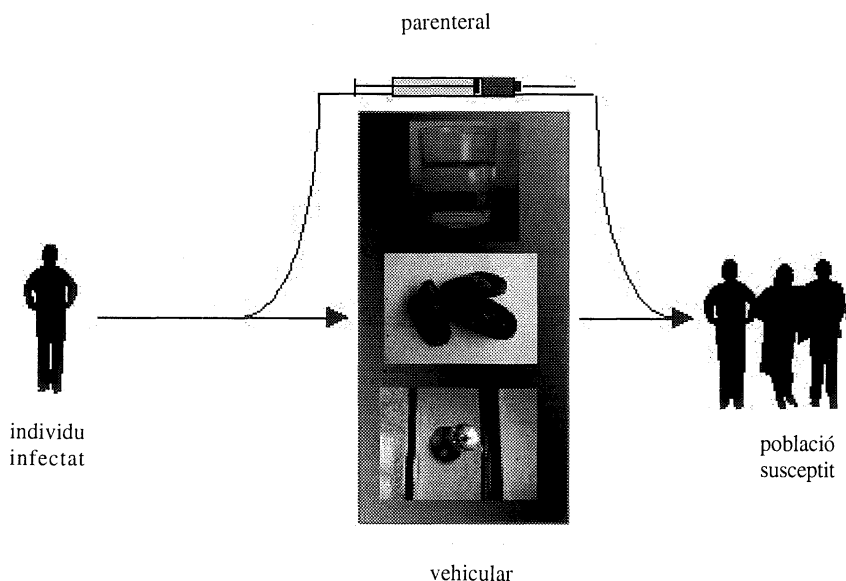


Figura 2. Possibles formes de transmissió dels virus entèrics.

excretar fins a un bilió (és a dir 10^{12}) de partícules infeccioses per cada mil·lilitre de deposició fecal, com és el cas de les diarrees causades per rotavirus. Per la seva banda, la femta d'un malalt d'hepatitis pot arribar a contenir fins a 10^8 virus infecciosos per gram, i també representen la principal font de contagi. La concentració de virus de l'hepatitis A en femta és màxima durant les dues setmanes anteriors a l'aparició de la icterícia, i es manté habitualment durant una setmana més. El període d'excreció vírica pot allargar-se bastant més en edat infantil. Pel cas de l'hepatitis E, es sap que el temps d'excreció del virus pot durar fins a dues setmanes després d'aparèixer la simptomatologia de la malaltia. El contacte personal, ja sigui directe o mitjançant vehicles, té una importància cabdal en la transmissió d'infeccions entèriques, la qual cosa fa que siguin freqüents les infeccions dins l'entorn familiar i en llocs com hospitals, centre d'atenció primària, llars d'infants, casernes militars o restaurants.

Taula 2. Tasses de mortalitat calculades per alguns virus entèrics.

Virus	Tassa de mortalitat (%)
Poliovirus 1	0.90
Coxsackievirus A	0.12 - 0.50
Coxsackievirus B	0.59 - 0.94
Echovirus	0.27 - 0.29
Hepatitis A	0.60
Rotavirus	0.01 - 0.12
Norwalk	0.0001
Adenovirus	0.01

La taula 2 mostra les tasses de mortalitat per alguns virus entèrics, segons dades extretes de la bibliografia^{7,8}

LA POLIOMIELITIS.

La poliomièlitis va ser durant molt temps la malaltia vírica més temuda de la humanitat, i malgrat que amb retard sobre la data inicialment fixada per l'Organització Mundial de la Salut (OMS), està prevista la seva eradicació gràcies a l'acció de vacunes eficients per l'any 2005.

El virus de la poliomièlitis, o poliovirus, pertany al gènere *Enterovirus*, dins de la família dels *Picornaviridae*. Causa una infecció aguda amb un ampli ventall de manifestacions, que inclou símptomes trivials en el 80-90% dels casos, però en el 10-20% dels casos meningitis asèptica i la paràlisi flàccida de diversos músculs que hom anomena poliomièlitis o simplement polio. Existeixen tres serotips del virus de la poliomièlitis, essent el serotip 1 el que més freqüentment ha causat casos aïllats i brots epidèmics de polio.

L'ésser humà és l'únic hoste del virus de la polio que ha demostrat ser molt contagiós. El virus entra per la boca i multiplica primàriament en teixits limfoides del tracte

orofaríngic i intestinal, especialment l' il·leum. Durant aquest període el virus és excretat fecalment en grans quantitats. Després hi ha una dèbil virèmia i d'aquesta forma els virus són transportats a altres punts del sistema del reticle endotelial, on té lloc una ampla multiplicació vírica. Després d'una virèmia secundària hi ha la invasió del sistema nerviós central. La virèmia pot durar varis dies però desapareix quan apareixen els símptomes, ja que per aquest temps l'hoste ja ha desenvolupat una resposta immune humoral. La medul·la òssia i el cervell són els dos únics llocs on hi han patologies greus degudes a la infecció vírica. El període d'incubació en els casos de malaltia greu és d'una a dues setmanes. Apareixen llavors símptomes de febre, fort mal de cap, rigidesa de coll i esquena, forts dolors musculars i alguns cops hiperestèsies o paraestèsies. La simptomatologia pot acabar així en un quadre de meningitis asèptica o pot prosseguir fins a causar una pèrdua selectiva de reflexes i debilitament asimètric o paràlisi muscular. Durant els primers sis mesos és quan hi han els principals símptomes de recuperació de la malaltia, encara que aquests poden seguir apareixent durant els primers dos anys. Després ja no sol haver-hi variació en l'estat del malalt.

Tal com s'ha esmentat anteriorment, l'èxit de la futura eradicació de la polio es deu a l'acció de vacunes que amb eficàcia han fet que la població disposi d'anticossos neutralitzants de la infecció vírica. Dins del camp de la Virologia, les vacunes s'han classificat tradicionalment com "vives" (atenuades) i "mortes" (inactivades). Les vacunes vives estan constituïdes per virus mutants seleccionats en base a seva manca de virulència, que són no obstant capaços de dur a terme el cicle replicatiu en l'hoste, i per tant d'induir una resposta immune molt semblant a la que genera el virus patògen. En contraposició, les vacunes mortes són els mateixos virus patògens que han sofert un procés d'inactivació química o física, sense alterar la seva immunogenicitat. No hi ha per tant cicle replicatiu de virus en aquest cas i per tant la resposta immune induïda no és tant

idèntica a la provocada pels virus patògens. Pel que fa a la poliomielitis, la vacuna inactivada desenvolupada per Jonas Salk a principis dels cinquantes, i sobre tot la vacuna atenuada d'Albert Sabin dels voltants de 1956, han contribuït a un dels més grans èxits de la Medicina. En els darrers anys l'estratègia seguida és el dur a terme campanyes intenses de vacunació en les zones endèmiques per a la infecció. Per exemple, a l'Índia es duen a terme cinc cops per any vacunacions massives en els que es vacunen en un sol dia cent quaranta milions de nens menors de cinc anys.

I QUÈ CALDRÀ FER DESPRÉS DE L'ERADICACIÓ DE LA POLIO?

Les etapes marcades de cara a eradicar la poliomielitis són les següents:

- Any 2000 - 2002: Desaparició total de casos
- Any 2002 – 2003: Restricció del virus patogènic a zones de màxima seguretat
- Any 2005: Certificació de l'eradicació de la malaltia
- Any 2005 – 2010: Finalització de la vacunació anti-polio

El pla proposat per l'OMS per l'eradicació global de la polio recomana doncs que s'aturi la vacunació un cop s'hagi certificat la desaparició de la malaltia. Aquesta decisió, que en principi pot semblar perfectament raonable, ha trobat l'oposició d'alguns viròlegs experts en el camp de la polio⁹. Una de les preocupacions d'aquests científics és el fet de que la vacuna que s'ha estat emprant principalment en els darrers anys i per altra banda la principal responsable del èxit de la seva eradicació, és el preparat atenuat de Sabin. El resultat és que hi ha una excreció massiva dels virus vacunals, que són infecciosos, la qual cosa provoca una contaminació de l'ambient. S'ha comprovat que els virus components de la vacuna de Sabin poden revertir per mutació a la forma salvatge que pot causar la paràlisi flàccida. Per tant, des d'un

punt de vista merament estadístic, és molt possible que quantitats importants del virus patogènic siguin en l'actualitat introduïts a l'ambient en països catalogats com "lliures de polio". Els experts consideren que una autèntica eradicació de la poliomièlitis passa per una total desaparició de la circulació del virus per l'ambient, la qual cosa no és actualment a l'abast. Segons molts viròlegs seria més aconsellable emprar exclusivament la vacuna inactivada de Salk per acabar d'eradicar la polio.

L'estratègia seguida per l'OMS per a l'eradicació de la polio es bastant semblant a la que es va seguir en el cas de la verola. Però el virus de la vacuna que va eliminar la verola, el virus vaccinia, no és una variant del mateix virus causant de la malaltia, sinó un virus pertanyent a la mateixa família i amb una antigenicitat creuada. No hi havia doncs la possibilitat de reversió del virus vaccinia, fins al virus de la verola. La vacuna oral de la polio és un preparat que conté soques mutants atenuades dels tres serotips responsables de la polio. La vacuna inactivada està constituïda pels mateixos virus, després de ser inactivats químicament. En els darrers anys, mentre que el virus de la vacuna de la verola s'ha emprat i es segueix emprant freqüentment en molts laboratoris, el virus de la verola ha estat confinat a dos laboratoris en tot el món fins a la seva final destrucció. En el cas de la poliomièlitis, hi ha centenars de laboratoris que avui en dia estan manipulant soques patogèniques del virus, no sempre en condicions d'infraestructura adients. Per altra banda, només ara en aquests darrers mesos s'ha començat a recollir informació per a confeccionar un inventari actualitzat de les mostres de virus de la polio o material contenint virus infecciosos que hi ha en laboratoris d'arreu el món.

Una altra font de problemes pot ser senzillament un error experimental, com el que no fa massa van reconèixer uns científics que creien estar propagant un virus coxsackie B3, taxonòmicament proper al virus de la polio, i que en realitat estaven cultivant la soca patogènica P2/Lansing del

poliovirus. Aquest error, que no ha tingut transcendència des del punt de vista de la salut pública, podria representar en un altre moment un greu risc sanitari quan la població no estigui vacunada per la polio.

Tampoc podem deixar de pensar en les armes biològiques. En els temps de la guerra freda, el virus de la verola estava confinat en un laboratori de cada país involucrat, a Atlanta i a Moscou. Després de l'eradicació de la polio, el virus estarà a l'abast de qualsevol país interessat en la guerra biològica. El trist consol és que hi han microorganismes que són molt més letals que poliovirus i que per tant resulten més atractius per a aquests sinistres propòsits.

Podem doncs concloure que seria aconsellable prosseguir vacunant a la població amb la vacuna oral fins a que la vacuna inactivada sigui distribuïda massivament a nivell mundial, amb l'increment del cost de la vacunació que això suposa, ja que el preu d'una vacuna inactivada és molt superior al d'una vacuna atenuada.

LES GASTROENTERITIS VÍRIQUES

Segons els "Centers for Disease Control (CDC)" dels Estats Units, es produeixen anualment entre tres i cinc mil milions de casos de diarrees que acaben causant al voltant d'uns cinc milions de morts infantils a causa de la gastroenteritis i que es donen sobre tot en el tercer món¹⁰. Malgrat això, en un país medicament tant avançat com els Estats Units, s'hospitalitzen cada any més de dos-cents mil nens menors de cinc anys. Aquesta hospitalització sòl durar entre quatre i cinc dies, la qual cosa representa un cost anual de mil milions de dòlars. Entre els anys 1973 i 1983, van morir als Estats Units cinc-cents nens per diarrees. També s'ha estimat en el mateix país que la gastroenteritis provoca un

absentisme de dies de classe comptabilitzat en vint-i-cinc dies per cada cent nens¹¹.

Fins a mitjans dels setanta, només era possible la identificació dels agents etiològics de la gastroenteritis de natura bacteriana i protozoària. El 1972 es va identificar mitjançant microscòpia electrònica el virus de Norwalk, el prototip dels que més endavant es van denominar “petits virus rodons estructurats” o SRSV, de l’anglès “small round structured viruses”, i que constitueixen la causa més freqüent de gastroenteritis en adults. Aquests virus es troben actualment inclosos dins del gènere *Calicivirus*. Dins del mateix gènere *Calicivirus* es troba el virus de Sapporo, que un estudi britànic demostra que excreten el 3% dels nens hospitalitzats per diarrees¹². Un any més tard, el 1973, un cop més la microscòpia electrònica va permetre la detecció de rotavirus, el principal agent etiològic de gastroenteritis infantil que, segons dades americanes, infecta la majoria de la població menor de quatre anys i que causa problemes de deshidratació en el 0.75% dels nens menors de dos anys i la mort anual de cent nens als Estats Units. A nivell mundial, s’estimen en cent quaranta milions el nombre de casos anuals de diarrea per rotavirus i en més de un milió la xifra de mortalitat infantil que causen¹⁰.

Amb el pas del temps s’han anat identificant altres virus responsables de gastroenteritis, entre els quals destaquen els adenovirus entèrics dels serotips 40 i 41, que causen entre un 5 i un 20% de les hospitalitzacions infantils en països desenvolupats¹³. En estudis recents¹⁴, apareixen uns altres virus, els astrovirus, com una de les primeres causes de gastroenteritis infantil, malgrat que no solen revestir gravetat, excepte en nens immunodeprimits. Els enterovirus que produeixen una ampla varietat de malalties de simptomatologia molt diversa, no tenen pràcticament importància com a causants de gastroenteritis.

La figura 3 il·lustra la distribució dels diferents agents causals de gastroenteritis (bacterians, parasitaris i vírics) en països desenvolupats i en vies de desenvolupament.

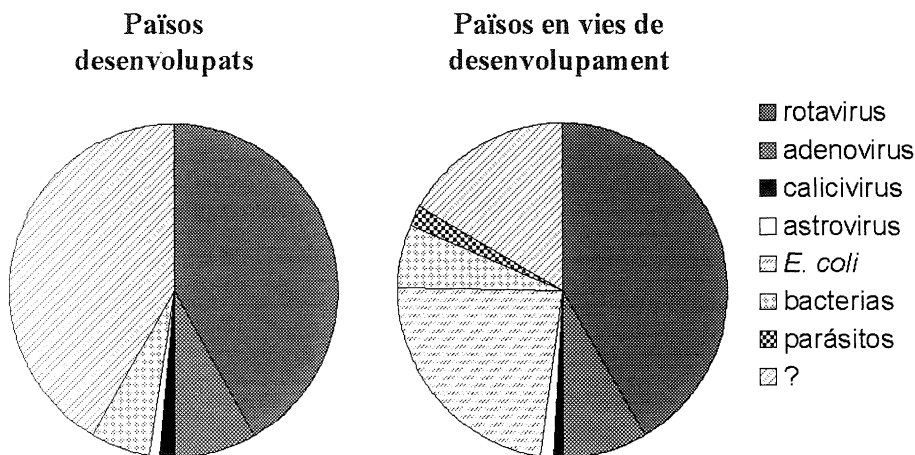


Figura 3. Incidència de gastroenteritis infantil en països desenvolupats i en països en vies de desenvolupament.

LES HEPATITIS

La primera descripció de l'hepatitis es deu a Hipòcrates qui es va referir a l'esmentada malaltia en els següents termes: *"La bilis continguda en el fetge està plena de flemes i sang i, segons jo crec, es vessa fora del fetge; un cop passat això. El pacient desvaria aviat, es torna irritable, parla sense sentit i deixa anar grunys com un gos; els seus ulls enrogeixen i mostren una mirada perduda: el cabell li penja al cap i una febre aguda l'abalteix. Se li pot administrar els mateixos tractaments que als altres pacients, però la majoria moren abans de pocs dies; pocs sobreviuen"*¹⁵.

Dins l'actual sopa de lletres que fa esment als diferents tipus de hepatitis (taula 3), les hepatitis A i E són les de transmissió fecal-oral, i per tant les que estan originades per virus entèrics. L'hepatitis A representa el 47% dels casos d'hepatitis aguda declarats als Estats Units entre 1982 i 1993¹⁶, que tal com es pot veure a la figura 4, no s'allunya gaire del 49% que correspon a la proporció de casos de hepatitis A dins del global d'hepatitis declarats a Catalunya durant el període 1990-1993¹⁷.

Taula 3. Classificació dels denominats virus de les hepatitis. Entre parèntesi s'indica l'any de la seva primera descripció. RNA: àcid ribonucleic; DNA: àcid desoxiribonucleic.

Virus	Genoma	Família	Transmissió
Hepatitis A (1975)	RNA	<i>Picornaviridae</i>	Fecal-oral
Hepatitis B (1970)	DNA	<i>Hepadnaviridae</i>	Sanguínia
Hepatitis C (1989)	RNA	<i>Flaviviridae</i>	Sanguínia
Hepatitis D (1978)	RNA	<i>Deltaviridae</i>	Sanguínia
Hepatitis E (1990)	RNA	<i>Caliciviridae</i> o nova família	Fecal-oral
Hepatitis F (1994)	DNA	existència discutible	Sanguínia
Hepatitis G (1995)	RNA	<i>Flaviviridae</i>	Sanguínia
Hepatitis TT (1999)	DNA	Circinoviridae (proposat)	Sanguínia

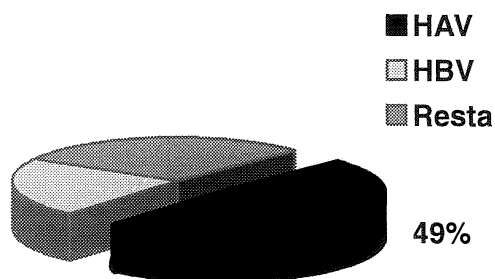


Figura 4. Proporció de casos d'hepatitis A a Catalunya, respecte a l'hepatitis B i al resta de les hepatitis (dades de Domínguez et al., 1995).

Taula 4. Distribució d'hepatitis A a Catalunya per edats (dades de Domínguez et al., 1995).

Grups d'edat (anys)	Distribució (%)
< 10	19.9
10 - 19	28.4
20 - 29	32.4
30 - 39	12.8
> 40	6.5

El virus de l'hepatitis A (HAV) és un virus hepatotrópic del gènere *Hepatovirus*, dins de la família *Picornaviridae*. L'hepatitis A és una infecció endèmica a moltes parts del món, essent la seva prevalença particularment notable en la zona mediterrània. Estudis epidemiològics rutinaris de la Organització Mundial de la Salut (OMS) indiquen que el 80% de la població del sud de Europa (que inclou Espanya, Portugal, Itàlia i Grècia) major de vint anys és seropositiva per

l'HAV, dada que contrasta amb el 3% dels països escandinaus. A la taula 4, es pot observar la distribució d'hepatitis A per edats a Catalunya. Malgrat que no s'ha descrit mai casos de cronicitat per l'hepatitis A i que hom tendeix a minimitzar el seu risc, un de cada vint pacients afectats mor degut a la infecció, essent aquesta freqüència segons un recent estudi desenvolupat a la Polinèsia francesa set cops més gran en la població infantil. Només als Estats Units, els costos anuals dels casos d'hepatitis A es xifren en cent cinc milions de dòlars. A França s'estima que el cost d'una hepatitis A sense complicacions és del voltant de quatre-cents cinquanta euros, amb un nombre de casos declarats anualment de entre trenta mil i cinquanta mil. Les hepatitis A fulminants representen una despesa de seixanta mil euros cadascuna, de les quals se'n declaren cada any, en el mateix país, entre cinquanta i seixanta. A Itàlia, després d'uns quants anys de remissió, la incidència d'hepatitis A ha tornat a augmentar dramàticament: només a la regió de Bari, que rep un allau d'immigrants albanesos s'han declarat enguany quatre mil sis-cents trenta cinc casos. Precisament a Albània, es va declarar el desembre de 1998 un brot d'hepatitis A en la zona limitant amb el Kosovo, que va afectar vuit-cents individus i que va provocar la mort de cinc infants, la qual cosa representa una taxa de mortalitat del 0.6%, xifra que es pot considerar normal per aquesta malaltia. D'aquest brot de grans proporcions es poden extreure dues conclusions: en primer lloc, i important, l'hepatitis A no és una infecció trivial, i en segon lloc, la mortalitat associada a aquesta malaltia no ha d'afectar forçosament zones remotes, sinó que també incideix en l'àmbit europeu.

L'altre virus d'hepatitis de transmissió fecal-oral és el virus de l'hepatitis E (HEV). Aquest virus és principal agent etiològic de les denominades hepatitis no-A, no-B de transmissió entèrica. Basant-nos en les seves propietats físico-químiques i biològiques s'ha classificat provisionalment el virus de l'hepatitis E dins de la família *Caliciviridae*, malgrat que la seva organització genòmica difereix considerablement

de la dels altres calicivirus, per la qual cosa és factible que en un futur constitueixi una nova família. En països occidentals, pràcticament no es descriuen casos d'hepatitis E, i quan n'apareixen, solen estar relacionats amb persones que han viatjat a zones endèmiques per a aquesta malaltia.

Avui en dia hi ha al mercat dues vacunes per a l'hepatitis A, efectives malgrat que de preu molt elevat. No hi han productes per a una immunoprofilaxi per a l'hepatitis E. En qualsevol cas, una bona mesura preventiva per aquests dos tipus d'hepatitis és el control de la seva presència a l'ambient.

EL VIRUS DE L'HEPATITIS A.

El virus de l'hepatitis A o HAV és un virus hepatotrópic de la família *Picornaviridae* de transmissió essencialment fecal-oral i que després d'estar durant bastants anys inclòs dins del gènere *Enterovirus*, ha passat a constituir un nou gènere anomenat *Hepatovirus*¹⁸.

El període d'incubació després de ingerir aigua o aliments contaminats amb l'HAV oscil·la entre dues i vuit setmanes. Després d'aquest temps, una gran part de la població infectada desenvolupa símptomes subclínics. L'excreció del virus té lloc principalment abans de l'aparició de la simptomatologia típica de la malaltia¹⁹.

El genoma de l'HAV consta d'una única cadena de RNA de sentit positiu de 7.478 nucleòtids que presenta un coeficient de sedimentació de 35 S i una densitat de flotació de 1.64 g/cm³ ²⁰. S'han identificat en la càpside del virus tres polipèptids estructurals: VP1 (300 AA), VP2 (222 AA) y VP3 (246 AA). Segons la seqüència de nucleòtids podria existir un quart polipèptid, malgrat que no s'ha identificat mai en el virió²¹.

L'estratègia per a aconseguir una eradicació eficient eradicació d'una malaltia infecciosa de transmissió fecal-oral

ha de basar-se en dos estratègies bàsiques: en primer lloc, un control rutinari de l'agent infeccios en l'entorn ambiental i, sempre que sigui possible, eliminar-hi la seva presència, i en segon lloc, desenvolupar una vacuna eficaç en front del virus per a protegir a la població davant la infecció.

Contrastant amb la complexitat serotípica de molts altres virus, l'HAV està considerat un virus amb molt poca variabilitat antigènica²². Només existeix un sol serotip d'aquest virus. Fins a la data actual només s'han descrit un nombre limitat d'epítops, un epítop immunodominant, que és de tipus conformacional, i uns quants epítops lineals, de menor entitat, en les proteïnes VP1 i VP3²³. Per tot això l'hepatitis A és una malaltia amb possibilitats d'eradicació amb una vacuna adient. Existeixen dos vacunes en el mercat per l'hepatitis A, que tenen un cost molt elevat al estar ambdues constituïdes per virus inactivats, i per tant requereixen un nombre important de partícules, la qual cosa en el cas d'un virus de replicació *in vitro* tant problemàtica com l'HAV, és una tasca àrdua i costosa. Concretament pel cas d'Espanya, el preu aproximat de la vacunació és de 205 euros²⁴. De fet, qualsevol estudi que involucri l'HAV topa amb l'escassa o nul·la capacitat replicativa del virus sobre cultius cel·lulars²⁵, malgrat que hi han algunes soques del virus que han estat adaptades a créixer *in vitro*²⁶. Aquest és el motiu de que sigui tant cara la producció de vacunes i també de la carència de dades sobre la biologia del virus en comparació amb altres virus de la mateixa família.

SISTEMES DE DIAGNÒSTIC PEL VIRUS DE L'HEPATITIS A.

Tots els intents d'identificar i caracteritzar l'HAV van ser infructuosos durant molt temps a causa de la carència d'una tècnica que permetés la detecció i quantificació de virus. Fins a finals dels anys seixanta no es va aconseguir la transmissió del virus a micos. Cal tenir en compte que fins llavors calia emprar voluntaris humans per a qualsevol estudi amb l'HAV.

L'any 1973 es va determinar mitjançant microscòpia immunoelèctronica les característiques físico-químiques dels virions de l'HAV²⁷. Després d'aconseguir la propagació del virus en cultius cel·lulars, malgrat que sense que es manifestes cap efecte citopàtic en els cultius infectats, van aparèixer mètodes de detecció del virus basats en el radioimmunoassaig i l'ELISA (assaig immunoenzimàtic). Cap d'aquestes dues tècniques són aplicables per a la detecció del virus en mostres ambientals ja que ambdues requereixen un mínim de 10^5 a 10^6 partícules, la qual cosa les fa inviables per a estudis sobre la presència de l'HAV en el medi ambient. L'ús de soques víriques que es propagaven persistentment *in vitro* va permetre l'aparició de complexos sistemes de diagnòstic específics per la detecció de partícules infeccioses com el radioimmunofocus assaig o RIFA²⁸, que van proporcionar la possibilitat de dur a terme per primer cop estudis de persistència ambiental de l'HAV²⁹. La posterior aparició de les abans esmentades soques citopatogèniques ha facilitat aquest tipus de treballs sobre l'estabilitat de l'HAV. No obstant, les soques silvestres del virus segueixen sense ser propagables en cultius, la qual cosa implica la necessitat de desenvolupar tècniques moleculars per a la detecció del virus en mostres ambientals.

Per a poder detectar l'HAV salvatge en qualsevol tipus de mostra, i sobre tot en mostres ambientals o d'aliments, es van posar a punt tècniques basades en la hibridació molecular emprant diferents tipus de sondes, i diferents tipus de marcatge. D'una banda s'ha usat una sonda de DNA complementari (cDNA) a la totalitat del genoma de l'HAV³⁰, i de l'altra un fragment de 2078 parells de bases corresponents a l'extrem 5' no codificant (5' NCR) del cDNA de l'HAV³¹, que es tracta d'una regió altament conservada, amb una identitat de nucleòtids superior al 89%. En un principi aquestes sondes es marcaven amb un isòtop radioactiu de fòsfor (^{32}P) mitjançant el procediment de "nick translation", o amb marcadors freds, com la biotina o la digoxigenina, en aquest cas per "random primer". Les tècniques d'hibridació han

permès detectar el virus en mostres ambientals, però s'han vist superades per l'aparició de sistemes de diagnòstic, també moleculars, amb una sensibilitat superior com són les tècniques basades en l'amplificació genòmica.

L'aparició de les tècniques d'amplificació selectiva d'àcids nucleics mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa o PCR³² ofereix nivells de sensibilitat exquisits per a la detecció vírica i al mateix temps de gran especificitat. Malgrat que les polimerases que s'usen, la de *Thermus aquaticus* (Taq) i altres, no poden emprar RNA com a motlle, la tècnica és adaptable a la detecció de virus amb genoma de RNA, com és el cas de l'HAV, mitjançant una retrotranscripció *in vitro* prèvia a l'amplificació. Aquesta tècnica es coneix habitualment com a RT-PCR.

En qualsevol sistema de diagnòstic basat en la PCR o la RT-PCR cal dur a terme una confirmació ulterior del resultat de l'amplificació. Aquesta confirmació es pot assolir amb una hibridació amb una sonda específica (hibridació Southern blot), una amplificació posterior amb "primers" (iniciadors) interns (nested-PCR) o una anàlisi de restricció (RFLP).

Òbviament, pel cas d'un virus no propagable en cultius cel·lulars com l'HAV, l'aparició d'aquestes tècniques ha permès un avenç molt important en la posta a punt dels seus sistemes de detecció. Malgrat tot, de cara a la seva aplicació en mostres clíniques, ambientals o d'aliments, ha estat necessari el desenvolupament de sistemes de preparació de la mostra, donada l'abundant presència en aquests tipus de mostres de substàncies inhibidores dels enzims que participen en la tècnica de la RT-PCR³³.

Un punt crític en la PCR és l'elecció de "primers" adients. Depenent de l'objectiu final de la tècnica, el diagnòstic genèric de la presència del virus o el genotipat del mateix, cal escollir respectivament zones molt conservades o bé zones hipervariables del genoma. Pel cas del diagnòstic genèric de

l'HAV hi han diversos "primers" descrits, donat que es tracta d'un genoma molt conservat³⁴. Per a la determinació dels set genotips descrits de l'HAV s'usen generalment "primers" corresponents a la unió dels gens 1D y 2A, que malgrat tot presenten una identitat de seqüència superior al 74%³⁵. En el nostre laboratori s'han dissenyat, després d'exhaustiva consulta de bancs de dades genètiques, "primers" per a la detecció genèrica de l'HAV en mostres clíniques, ambientals i d'aliments que corresponen a zones conservades del 5' NCR³⁶.

CONTROL AMBIENTAL DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE L'HEPATITIS A.

S'han descrit varis brots d'infeccions víriques de transmissió fecal-oral en diferents països. No obstant, exceptuant un brot que es va produir l'any 1988 a Shanghai per ingestió de marisc contaminat, i que va afectar prop de tres-centes mil persones³⁷, cap cas ha tingut el ressò de l'epidèmia, també d'hepatitis, que va tenir lloc a Nova Delhi entre desembre de 1955 i gener de 1956. L'origen d'aquesta epidèmia va ser una contaminació del riu Junma, la font d'abastament de la planta potabilitzadora d'aigües de consum domèstic. L'esmentada contaminació va tenir lloc unes sis setmanes abans de l'aparició del brot i va durar una setmana. Durant el període de la contaminació, es van prendre mesures preventives, com tractament de les aigües amb elevades dosis d'alúmina i clor, per a evitar l'aparició de malalties infeccioses. A pesar d'aquests esforços, malgrat que no van aparèixer brots d'origen bacterià, i també algunes malalties víriques, no es va poder impedir l'epidèmia d'hepatitis. Durant el període d'aquesta epidèmia, varis especialistes en el camp dels virus entèrics es van desplaçar cap a Nova Delhi per a dur a terme estudis virològics de les mostres d'aigua contaminada. A rel de tot això, el govern hindú va crear l'Institut Nacional d'Investigacions d'Enginyeria i Medi Ambient de Nagpur, sota la direcció del Professor V. Chalapati Rao. Quasi de forma immediata va aparèixer el

grup de Virologia Ambiental del Baylor College of Medicine, a Houston, dirigit pel Professor Joseph L. Melnick. Es pot doncs afirmar que va néixer una nova disciplina, la Virologia Ambiental, a finals dels anys cinquanta.

Els virus entèrics humans són introduïts a l'ambient amb la femta dels individus infectats. La presència de virus en l'ambient provoca problemes degut a tres factors: 1) a la contaminació per aigües residuals d'aigües superficials, que poden ser emprades pel consum domèstic, 2) a l'elevada capacitat de supervivència dels virus en l'ambient, 3) al reduït nombre de partícules víriques que cal per a iniciar un procés infecció, i 4) que els virus poden causar un gran ventall de malalties que no presenten cap simptomatologia definida³⁸.

El control rutinari de la presència de virus en l'ambient es practica en contades ocasions, la qual cosa impedeix que es disposin de dades que es podrien considerar com a nivells basals d'aquest tipus de contaminants. Aquests nivells es podrien comparar amb els que es troben quan es declaren brots epidèmics en la població. Tant mateix, el fet que ja s'estiguin duent a terme controls virològics rutinaris fa que sigui més ràpida la capacitat de reacció davant situacions d'epidèmies i que l'obtenció de dades sigui més immediata. Un cop s'ha detectat un brot causat per virus entèrics, és important determinar-ne la font, que pot ser aigua, aliments, etc., per tal de frenar la seva expansió tant aviat com sigui possible.

CONTROL DE LA QUALITAT VIROLÒGICA DE LES AIGÜES.

El control de l'aigua de consum és especialment important en països en vies de desenvolupament, on pot no existir una total i constant garantia de la qualitat del subministrament. La detecció de qualsevol virus entèric en aigua potable, sigui quin sigui la seva virulència, proporciona

una inequívoca indicació del risc de que la mateixa aigua contingui un altre virus de major potencial patogènic.

L'anàlisi virològica de mostres d'aigua potable comporta normalment un procés de concentració, ja que la seva càrrega vírica pot ser molt baixa, fins i tot pot haver-hi nivells d'un virus per cada mil litres d'aigua. Malgrat tot aquests valors són suficients per a causar una infecció. L'elecció de la metodologia adient a emprar per a la concentració d'un nombre reduït de virus en un volum gran d'aigua depèn de diferents factors, per exemple del propi volum de la mostra a analitzar. El volum de la mostra ve condicionat pel potencial nivell de virus present en la mateixa, que per la seva banda depèn d'altres paràmetres, com poden ser el tipus d'aigua: potable, residual, etc., si es tracta d'una aigua depurada o no, l'input de virus sospitat, la prevalença d'infeccions víriques entre la població, l'estació anual en la que ens trobem, i el consum d'aigua per càpita. A la taula 5 es troben esmentats els sistemes de concentració vírica més habituals per a ser utilitzats per a la detecció de virus presents en grans volums d'aigua. Cap metodologia és òptima per a tots els virus o qualsevol tipus de mostra.

Per a la concentració de l'HAV a partir de volums importants d'aigua (mostres d'uns mil litres), les metodologies que proporcionen una millor recuperació són les basades en l'adsorció i elució sobre filtres carregats negativa³⁹ o positivament⁴⁰. Entre aquestes dues possibilitats, els filtres electropositius són indubtablement la millor elecció, ja que no requereixen cap preacondicionament de la mostra, mentre que en el cas d'emprar filtres electronegatius cal una acidificació prèvia de la mostra.

Una alternativa atractiva és l'ús de pols de vidre carregada positivament, que també permet dur a terme la concentració sense cap procés previ⁴¹.

Taula 5. Sistemes de concentració de virus aplicables a grans volums d'aigua.

Mètodes basats en l'adsorció i desadsorció
Filtres electronegatius
Filtres electropositius
Pols de vidre
Fibra de vidre
Hidròxid d'alumini
Mètodes basats en la precipitació de proteïnes
Flocul·lació orgànica
Precipitació amb sulfat amònic
Precipitació amb polietilènglicol
Mètodes basats en l'ultrafiltració
Ultrafiltració tangencial

ESTUDI D'UN BROU D'HEPATITIS A DE TRANSMISSIÓ HÍDRICA.

Es va detectar un brot d'hepatitis infecciosa en el campament militar Arapiles 62, situat a Castellciutat (La Seu d'Urgell, Lleida), que va durar des de setembre de 1987 fins a finals de març de 1988. Durant aquest període es van diagnosticar 21 casos d'hepatitis. La màxima incidència de l'infecció es va registrar entre novembre de 1987 i gener de 1988. També es van detectar entre la població militar casos de gastroenteritis, que es caracteritzaven per episodis aguts de diarrea i dolors abdominals, alguns cops acompanyats de febre.

El campament d'Arapiles tenia la seva pròpia planta potabilitzadora d'aigua, procedent del riu Valira. Es controlaven diàriament els nivells de clor de l'aigua i es realitzaven anàlisis periòdiques de la qualitat bacteriològica de l'aigua. El 4 de febrer de 1988, es va procedir a la presa de mostres d'aigua del dipòsit de captació d'aigua del riu Valira i

de l'aigua de l'aixeta del campament. Les dades fisicoquímiques obtingudes del riu Valira van indicar que es tractava d'una aigua que podia ser apta pel consum domèstic després d'una correcta potabilització. La cloració de l'aigua durant el dia del mostreig es va fer de forma que els nivells de clor lliure evolucionessin al llarg del dia des de 0 a 0.2 mg/l, mentre que el clor total era de 0.3 mg/l. Aquests valors es van escollir per a reproduir una situació de cloració insuficient, que probablement havia estat la causant del brot infecciós.

Els estudis bacteriològics del riu Valira van evidenciar una contaminació fecal d'origen humà. Els estudis amb les mostres d'aigua potable van demostrar que nivells de clor lliure de 0.2 mg/l eren capaçs d'eliminar les bacteries presents en les esmentades mostres, per la qual cosa aquestes mostres eren segons la legislació vigent, basada en criteris bacteriològics, aptes pel consum domèstic. Mitjançant estudis d'hibridació molecular es va trobar un 80% de positivitat per HAV en el riu Valira i un 100% en l'aigua de l'aixeta. També es van detectar en les mateixes mostres altres virus entèrics com rotavirus i enterovirus. Els virus van ser detectats en aigua potable malgrat la presència en las mostres analitzades de 0.3 mg/l de clor total⁴². Els controls rutinaris d'indicadors bacterians duts a terme en el campament donaven consistentment resultats negatius, la qual cosa va fer que l'aigua fos considerada com a apte pel consum. En el nostre estudi es van detectar virus entèrics patògens en mostres que contenien 0.2 mg/l de clor lliure i que segons criteris bacteriològics no representaven cap risc sanitari. El riu Valira era doncs l'origen de la contaminació de l'aigua potable responsable del brot d'hepatitis A. El riu Valira rep abocaments contaminants d'Andorra, que en època de vacances pot pràcticament duplicar la seva població habitual. La cloració de l'aigua de l'aixeta va ser insuficient per a garantir una total eliminació dels patògens vírics.

ESTUDIS DE LA PERSISTÈNCIA DEL HAV EN AIGÜES I SUPERFÍCIES CONTAMINADES.

Un aspecte crucial de la presència de contaminants en l'ambient és la seva capacitat per a persistir-hi. Un patògen representa un major risc si és capaç de mantenir la seva capacitat infecciosa en uns nivells determinats i durant un període de temps relativament llarg. L'HAV destaca precisament per la seva capacitat de persistir durant temps molt llargs amb uns elevats títols infecciosos.

El nostre grup de recerca ha avaluat la supervivència natural de l'HAV i altres virus entèrics en aigües. També s'han dut a terme estudis de l'inactivació dels mateixos virus en aigües en presència de diferents nivells de clor lliure i ions de coure i argent generats electrolíticament⁴³. En general, els virus que millor sobreviuen en les aigües en condicions naturals són l'HAV i els rotavirus i el que sistemàticament presenta menys estabilitat és el poliovirus. En condicions de desinfecció amb clor lliure i ions coure:argent es manté en general el mateix patró⁴⁴.

Per a avaluar el paper dels fomites en la transmissió de malalties entèriques com l'hepatitis A, es van fer estudis de contaminació experimental amb virus entèrics de diversos materials porosos i no porosos que es troben habitualment en ambients domèstics, i es va controlar la supervivència d'aquests virus al llarg del temps. Es van mantenir aquestes superfícies contaminades en condicions controlades de temperatura i humitat relativa. Els resultats obtinguts en aquests estudis (figura 5) indiquen que la majoria dels virus estudiats són capaços de persistir durant períodes molt llargs dessecats sobre superfícies inertes, essent l'HAV especialment resistent a la dessecació⁴⁵.

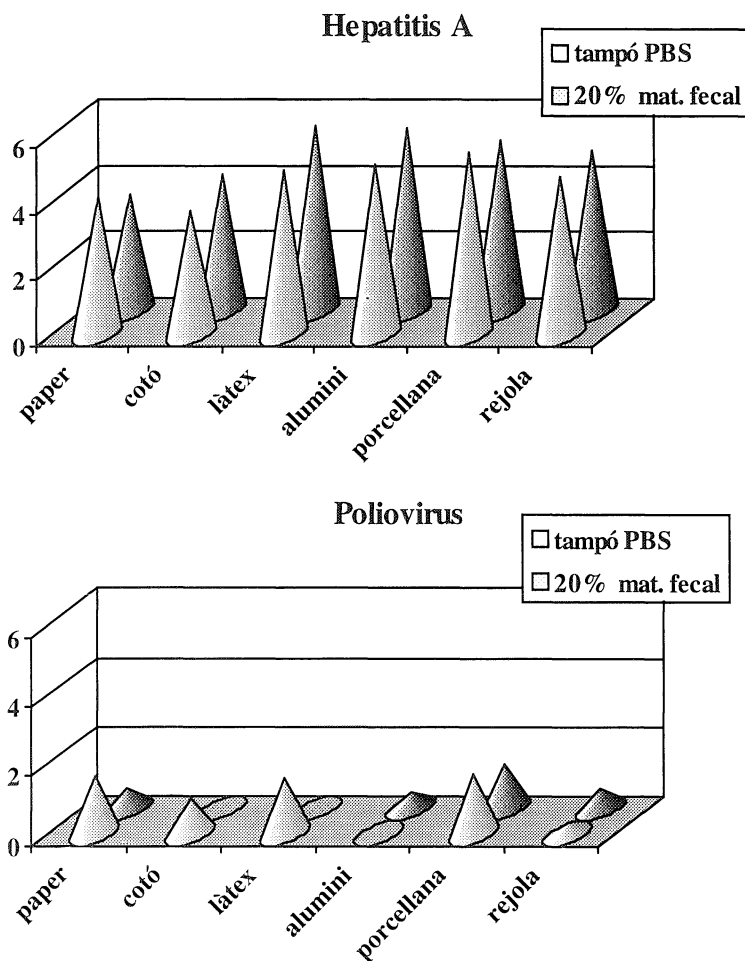


Figura 5. Persistència de l'HAV i poliovirus dessecats sobre diferents tipus de superfícies en presència i absència de matèria fecal. Els valors s'expressen en forma del logaritme del nombre de virus infecciosos que es recuperen després de set dies a una temperatura de 20 °C i una humitat relativa del 85%, considerant una deposició inicial de 10^6 virus.

El virus de la poliomièlitis no demostra ni de lluny ser tant resistent i mostra en les mateixes condicions una inactivació molt més elevada. Hem pogut evidenciar un clar

efecte de la temperatura sobre la persistència dels virus dessecats, però no així de la humitat relativa.

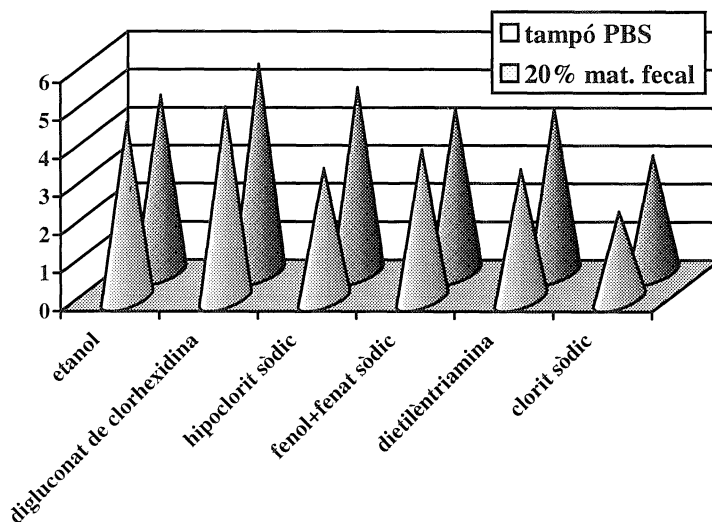


Figura 6. Eficàcia de diferents formulacions de desinfectants per a eliminar la infectivitat del virus de l'hepatitis A dessecat sobre fomites en presència i absència de matèria fecal. Els valors s'expressen en forma del logaritme del nombre de virus infecciosos que es recuperen després d'un temps de contacte amb el desinfectant de 10 minuts, considerant una deposició inicial de 10^6 virus.

S'han dut també a terme estudis de desinfecció de fomites contaminats amb virus entèrics, entre ells l'HAV, amb desinfectants comercials com alcohol, lleixiu i altres freqüentment emprats en entorns domèstics i industrials. En

general els nivells de desinfecció assolits són bastant pobres (figura 6).

Aquests estudis es van dur a terme en paral·lel en assaigs en suspensió i directament sobre superfícies contaminades. Un altre conclusió d'aquests estudis comparatius va ser que els experiments fets en suspensió donen una avaluació equivocada de la veritable eficiència dels desinfectants per a eliminar virus dessecats sobre superfícies ambientals⁴⁶.

EL VIRUS DE L'HEPATITIS A EN SEDIMENTS MARINS.

Els virus entèrics humans entren a l'ambient marí per la descàrrega d'aigües superficials tractades i sense tractar. Donat que els tractaments rutinaris d'aquestes aigües no garanteixen una total eliminació dels patògens vírics, els virus entèrics són introduïts de manera constant en les aigües marines costaneres⁴⁷. En diversos treballs hem comprovat que els virus presents en les aigües residuals s'associen molt ràpidament al material particulat i que d'aquesta forma són capaços de persistir molt millor en l'ambient marí⁴⁸.

Es van dur a terme estudis destinats a avaluar l'impacte en els sediments marins davant la ciutat de Barcelona dels abocaments dels llots d'una planta depuradora d'aigües residuals. Un emissari submarí aboca els esmentats llots a quatre quilòmetres de la línia de costa. Les mostres de sediment marí van ser preses amb una draga especial de caixa (box corer) a bord del vaixell oceanogràfic Garcia del Cid. Es van detectar virus entèrics humans en mostres preses a cinc quilòmetres mar endins i a una profunditat de 82 m⁴⁹. Mitjançant hibridació molecular, es va comprovar la presència de l'HAV en el 17% de les mostres de sediment marí. En les mateixes mostres es van també analitzar els nivells d'enterovirus i rotavirus (taula 6).

Taula 6. Virus entèrics humans detectats en sediments marins situats a una fondària d'entre deu i vuitanta metres i a una distància de la costa d'entre mig i cinc quilòmetres. Es mostren els percentatges de positivitat de cada virus.

Mostres analitzades	Hepatitis A	Rotavirus	Enterovirus
43	17%	60%	55%

EL VIRUS DE L'HEPATITIS HUMÀ EN MARISC.

En condicions hidrogràfiques favorables els bivalves poden arribar a filtrar volums importants d'aigua i retenir en els seus teixits comestibles els contaminants presents en aquesta aigua. En estudis de contaminació experimental, hem comprovat que entre el 4 i el 56% dels virus presents en l'aigua s'acumulen en teixits de marisc en només sis hores⁵⁰. S'han descrit moltes malalties víriques com a conseqüència del consum de marisc contaminat per virus. Són remarcables nombrosos brots de gastroenteritis i d'hepatitis⁵¹. En aquest sentit cal destacar com el més gran que es recorda el brot causat pel consum de tellerines que el 1988 va originar a Shanghai prop de tres-cents mil casos d'hepatitis A⁵². Molt recentment s'han donat al voltant de dos-cents casos d'hepatitis A en el País Valencià a causa de tellerines importades congelades del Perú⁵³.

El consum anual de marisc a la Mediterrània és del voltant d'unes dotze mil tones anuals. Malauradament, la normativa vigent de la Unió Europea ja no obliga a la depuració del marisc prèviament al seu consum⁵⁴. Un altre motiu de preocupació derivat del consum de marisc és que habitualment són consumits crus o molt poc cuinats. En estudis amb musclos contaminats experimentalment amb virus, hem comprovat que entre el 0.41% i el 1.78% dels virus inicialment presents es detectaven en musclos fets al vapor en el moment de la obertura de les valves, i cinc minuts més tard encara s'hi detectaven entre el 0.32% i el 0.14% dels virus que

s'hi havien afegit⁵⁰. L'eficàcia dels sistemes habituals de depuració del marisc no eliminen completament els patògens vírics presents en el teixit dels bivalves⁵⁰. Malgrat tot això, el risc d'infecció és molt menor si es consumeix el marisc depurat i cuinat⁵⁵. El nivell de risc derivat del consum d'uns seixanta grams de marisc cru contaminat amb virus causants de gastroenteritis es calcula del 54%. El risc derivat del consum del mateix marisc fet al vapor és d'entre 1.6% i 2%. Si el marisc és prèviament depurat durant 96 hores, el risc d'infecció cau a valors de 11.5% per marisc cru i entre 0.04% i 0.06% per marisc fet al vapor. Per tant malgrat que per llei ja no és obligatori depurar el marisc, el cert és que la depuració pot reduir de forma important el risc d'adquirir una infecció vírica per consum de marisc.

Entre abril de 1988 i març de 1989, es van dur a terme estudis sobre la presència de virus entèrics humans en mostres d'aigües residuals i de mar de Sant Carles de la Ràpita, així com mostres de musclos provenint de la mateixa zona. Es van aïllar, respectivament, rotavirus, els principals agents de gastroenteritis infantil arreu del món, i el virus de l'hepatitis A en el 33% i 25% de les mostres d'aigua residual, i en el 30% i 20% de les mostres d'aigua de mar. En les mostres de teixit de musclos, es va detectar la presència de rotavirus i virus de l'hepatitis A en el 50% i 36%, respectivament, de les mostres analitzades.

La normativa vigent a nivell europeu sobre marisc i zones de marisqueig està basada exclusivament en paràmetres bacterians^{50,56, 57}. En els nostres estudis no vàrem trobar cap correlació entre els indicadors bacterians i els virus. Es van detectar virus patògens humans en zones marines que, sempre segons els criteris bacterians de qualitat d'aigües, poden ser considerades com impol·lutes i adients pel cultiu de marisc⁵⁸. En aquestes mateixes aigües s'ha detectat, a més d'enterovirus i rotavirus, el virus de l'hepatitis A.

Els coliforms i els estreptococs⁵⁶ han estat considerats com a indicadors adients de la qualitat de mostres de marisc. Després de distribuir mostres de musclos en dos grups segons si tenien en els seus teixits valors superiors o inferiors a 300 coliforms fecals per cada cent grams de teixit, nivells límits estipulats a la normativa, es va procedir a la detecció de virus entèrics humans en les mateixes mostres. Es van detectar aquests patògens vírics en mostres de musclos, independentment dels nivells dels microorganismes indicadors bacterians (taula 7). Malgrat que les proporcions relatives de cada virus variaven lleugerament en cada grup de musclos, es van aïllar rotavirus i virus de l'hepatitis A en teixits de marisc contenint nivells d'indicadors bacterians per sota dels límits fixats en l'actual legislació, i que per tant, sempre segons aquesta mateixa legislació, són considerats com a aptes pel consum públic.

Taula 7. Virus entèrics humans detectats en musclos agrupats segons els nivells de coliforms fecals detectats en els seus teixits.

Grup de marisc	Enterovirus	Rotavirus	Hepatitis A	Virus en general
No. coliforms >300/100g	57 %	71 %	40 %	86 %
No. Coliforms <300/100g	0	56 %	40 %	78 %

ESTUDI DEL BROT D'HEPATITIS A CAUSAT A LA COMUNITAT VALENCIANA PEL CONSUM DE TELLERINES CONGELADES.

En la setmana número trenta-nou de 1999, es va observar un augment en la declaració de casos d'hepatitis A en l'Àrea de Salut 13 de la Comunitat Valenciana, notificant-se un total de 10 casos en l'esmentada setmana. Entre les setmanes

trenta-set i cinquanta-dos del mateix any, es van declarar 107 casos, la qual cosa representa el 85,6% del total de casos declarats durant tot l'any 1999 en la mateixa Àrea de Salut.

A partir de la setmana quaranta-un es va també observar in increment en la incidència d'hepatitis A en l'Àrea de Salut 10, limítrofa amb l'anterior, comptabilitzant-se des de la setmana quaranta-un fins a la cinquanta-un, un total de 56 casos, que representen el 91,8% del nombre anual de casos declarats en la mateixa Àrea.

En l'Àrea de Salut 7 es va començar a notar augment de casos d'hepatitis A a partir de la setmana quaranta-dos, i es van declarar des d'aquesta setmana fins a la quaranta-sis 11 casos, que representa el 91.7% de la incidència anual. Per altra banda, es va observar en l'Àrea de Salut 6 un degoteig no habitual de casos d'hepatitis A, enregistrant-se entre la setmana trenta-nou i la cinquanta-un un total de 15 casos relacionats amb el brot d'hepatitis A, la qual cosa representa el 29% de la incidència anual.

Totes les Àrees de Salut afectades pertanyen a la província de València i totalitzen una població de 593.375 habitants, la qual cosa suposa el 14,8% de la població total de la Comunitat Valenciana. Es pot veure a la figura 7 la distribució temporal del total de casos declarats durant l'any 1999, en la que s'observa l'augment de la notificació setmanal de casos a partir de la setmana trenta-nou, amb una incidència màxima entre les setmanes quaranta-dos i quaranta-sis, en les quals es concentren quasi bé el 50% de la totalitat de casos notificats al llarg de tot l'any.

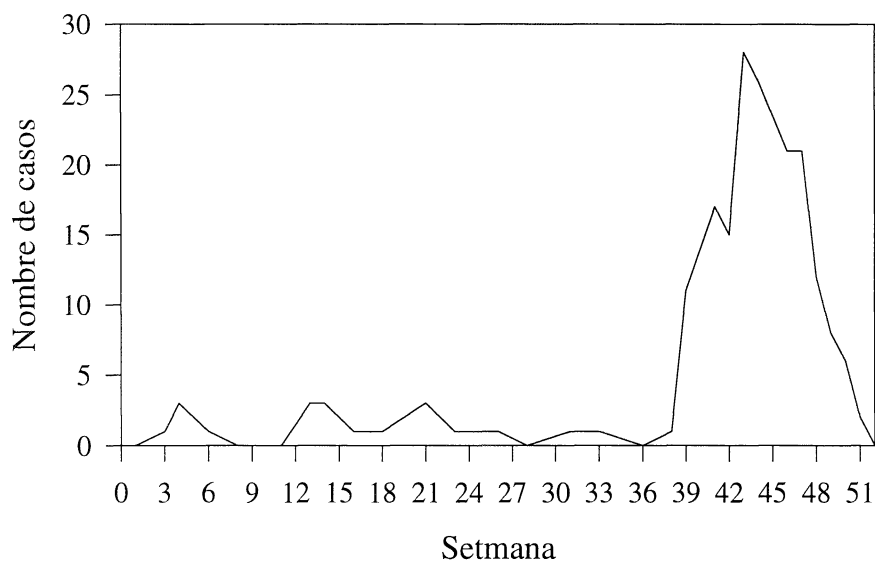


Figura 7. Incidència anual d'hepatitis A a les Àrees de Salut afectades pel brot.

Taula 8. Associació de l'hepatitis A amb l'exposició a diferents aliments i begudes,

Factor	OR ^a	IC ^b 95%	P ^c
Verdures	1.07	0.68 -1.69	0.42
Crustacis	0.79	0.45 -1.38	0.22
Musclos	0.85	0.50 -1.43	0.29
Tellerines	3.89	2.36 - 6.41	0.000
Navalles	1.90	0.49 - 7.97	0.23
Aigua de xarxa	0.86	0.53- 1.39	0.29
Aigua no controlada	0.64	0.35 - 1.17	0.07
Aigua envasada	1.07	0.67 - 1.71	0.42

^a OR: Odds ratio

^b IC: Interval de confiança

^c p: Valor de la p

Per tal de determinar les possibles causes del brot d'hepatitis A, es van dur a terme un total de 389 enquestes epidemiològiques que corresponen a 188 casos i a 201 controls. S'han inclòs com a factors de risc a estudiar l'assistència a llars d'infants o escoles, el contacte familiar, el contacte sexual, les avaries de la xarxa pública d'abastament d'aigües, el consum d'aigua embotellada o de fonts no controlades, el consum d'aliments com verdures crues, tellerines, musclos, cloïsses, ostres i crustacis. L'anàlisi de l'associació entre els diferents factors de risc estudiats va donar una sola associació positiva entre el consum de tellerines, tellines com se les coneix a València, importades congelades del Perú i l'aparició de la malaltia hepàtica (taula 8).

Es va utilitzar la tècnica d'amplificació per RT-PCR com a sistema de diagnòstic de l'HAV en mostres de tellerines recollides en llars i restaurants relacionats amb casos d'hepatitis d'aquest brot. Es va detectar l'HAV en el 75% de les mostres de tellerines analitzades⁵⁹ (taula 9). També es van detectar enterovirus i rotavirus, respectivament, en el 55% i el 60% de les mostres analitzades. En canvi no es va trobar ni astrovirus, ni el virus de Norwalk, ni el virus de l'hepatitis E, que també es van buscar en les mostres de tellerines.

Es van dur a terme estudis d'epidemiologia molecular d'aïllaments de l'HAV procedents de les mostres de marisc i també de mostres clíniques, sèrums i femtes, de pacients amb hepatitis A. Aquests estudis van evidenciar la existència de si més no sis variants de l'HAV, que diferien entre elles en petites deleccions en la zona rica en pirimidines de l'extrem 5' del genoma víric. Aquestes variants pertanyien totes a un mateix genotip de l'HAV, IB, que és originari, malgrat que no exclusiu, d'Amèrica del Sud⁶⁰.

Taula 9. Detecció de l'HAV en tellerines procedents de llars i restaurants involucrats en casos d'hepatitis A.

PROCEDÈNCIA	POS/ TOT ^a	% ^b
Alzira	4/6	67
Utiel	1/1	100
Pontón	1/1	100
Requena	3/3	100
Mislata	2/2	100
Castelló	0/1	0
Xàtiva	4/6	67
TOTAL	15/20	75

^a POS/TOT: Nombre de mostres positives respecte del nombre total de mostres analitzades

^b %: Percentatge de positivitat

Actualment es disposa de sistemes de diagnòstic amb prou sensibilitat com per a detectar i caracteritzar els patògens vírics presents en aliments, com poden ser aigües o marisc. És inqüestionablement erroni el emprar indicadors bacterians per a controlar la presència de virus en les esmentades mostres. Caldria per tant establir una legislació que restringís el nivell de virus entèrics en aigua i marisc, que evitaria bastants brots de gastroenteritis i hepatitis causats per aquests virus.

En el cas del brot d'hepatitis A de València es van prendre una sèrie de mesures profilàctiques, com la immobilització d'unes 200 tones de les tellerines importades del Perú, i immunitzacions passives i actives de la població en contacte amb casos d'hepatitis. Gràcies a aquestes mesures va poder ser controlat el brot d'hepatitis A i donar-se per acabat abans de la fi de l'any 1999.

CONTROL DEL VIRUS DE L'HEPATITIS A EN HEMODERIVATS.

L'actual normativa europea sobre hemoderivats determina que l'HAV sigui considerat com a virus rellevant en aquest tipus de productes. Per aquest motiu ha estat necessari el desenvolupament de mètodes per la detecció del virus en hemoderivats. Donat que aquests mètodes estan basats en la RT-PCR, és necessari la posta a punt de sistemes d'extracció d'àcids nucleics que eliminin les substàncies inhibidores de la reacció de la transcriptasa inversa i/o de la Taq DNA polimerasa. La confirmació de la positivitat que s'obté amb aquesta metodologia es pot dur a terme per hibridació molecular amb un sistema de lectura automatitzada. En aquest sentit, el nostre grup ha desenvolupat un sistema colorimètric de detecció molecular de virus emprant un lector de plaques d'ELISA⁶¹. La prova està basada en la combinació d'una RT-PCR i la unió covalent dels amplimers generats en aquest RT-PCR a pous de plaques de tipus "microtiter". El format de placa de microtiter y el caràcter no radioactiu del sistema fan que aquesta metodologia sigui d'ús senzill, adaptable a laboratoris no especialitzats i aplicable a un gran nombre de mostres. D'aquesta forma, es pot realitzar una prospecció de "pools" de productes a gran escala.

Per altra banda, cal també dur a terme estudis de validació de la eliminació de l'HAV en el procés d'obtenció de diferents hemoderivats, la qual cosa es realitza dins del marc d'una llarga col·laboració amb l'empresa Instituto Grifols. Tractant-se d'un virus tant resistent com l'HAV, és lògic que no sigui fàcil la seva eliminació i els resultats que es generen són molt dispars⁶². Per exemple, s'aconsegueix una reducció acceptable del virus quan es sotmeten els hemoderivats a filtracions per filtres del tipus "viresolve", o després de tractaments amb heptà a 60 °C durant 20 hores o amb NaOH, 0.5 M durant 1 hora. En canvi, determinats tractaments d'alta pressió (400 MPa) han demostrat ser infructuosos. S'estan

actualment avaluant altres sistemes d'obtenció de derivats sanguinis en quan a la seva capacitat per a eliminar la presència de l'HAV, ja que és d'importància cabdal el poder garantir la seguretat de l'administració d'aquests productes.

VACUNES PER L'HEPATITIS A: ESTRATÈGIES I TIPUS.

Fins no fa massa la immunització passiva amb gammaglobulines representava pràcticament totes les possibilitats en quan a sistemes de prevenció de l'hepatitis A. Recentment, es disposa de dues vacunes comercials del tipus inactivat. No obstant, aquestes vacunes són d'elevat cost, ja que estan constituïdes per virus inactivats, i per tant requereixen un nombre molt important de partícules, la qual cosa és tècnicament difícil i molt costosa pel cas de l'HAV. És doncs impensable que les actuals vacunes de l'hepatitis A puguin ser administrades en països en vies de desenvolupament, que és precisament on són més necessàries les campanyes massives de vacunació.

A partir de l'extraordinari èxit de la vacuna atenuada de Sabin per a la poliomielitis, es va pensar fer servir la mateixa aproximació per l'hepatitis A i desenvolupar una vacuna atenuada. Malgrat les possibles similituds entre els dos virus, ambdós pertanyent a la família *Picornaviridae*, i algun estudis que s'han realitzat amb voluntaris humans⁶³, és encara lluny el dia que es pugui emprar una vacuna viva per a l'hepatitis A.

L'ÚS DE PÈPTIDS SINTÈTICS COM A IMMUNÒGENS.

De resultes de l'extraordinari desenvolupament sofert en el camp de la seqüenciació, tant de proteïnes com d'àcids nucleics, així com del creixent nombre d'epítops vírics descrits han aparegut les vacunes sintètiques. L'estratègia de l'ús de pèptids sintètics com a immunògens està basada en produir

pèptids curts, corresponents als determinants antigènics inductors d'una resposta neutralitzant. La utilització de pèptids sintètics que contenen en la seva seqüència un o més determinants antigènics de les proteïnes de la càpside de l'HAV podria ser una alternativa molt vàlida per a la preparació de vacunes per a l'hepatitis A. Hi ha diversos treballs en els que es descriu l'ús satisfactori d'aquesta aproximació, aplicada a diferents tipus de virus⁶⁴.

Pel que fa al cas de l'hepatitis A, es van utilitzar els perfils d'hidrofobicitat de les proteïnes VP1, VP2 i VP3, així com els seus nivells de iodació per a predir les regions més exposades dels polipèptids de la càpside de l'HAV. D'aquesta manera es van seleccionar fragments polipeptídics que potencialment podien contenir epítops del virus. Els pèptids escollits van ser: HAV-VP1 (11-25), HAV-VP2 (96-107), HAV-VP3 (61-78) i HAV-VP3 (110-121). Aquests pèptids van ser obtinguts pel Grup de Pèptids del Centre d'Investigació i Desenvolupament de CSIC mitjançant síntesi en fase sòlida⁶⁵.

Un problema inherent a l'ús de pèptids sintètics és el seu escàs potencial immunogènic, la qual cosa obliga a la utilització de transportadors i/o adjuvants⁶⁴. En aquest sentit, només l'albumina ha estat autoritzada per a ús amb humans. En el nostre cas, els pèptids sintètics van ser administrats a ratolins en diferents tipus de preparacions: lliures, encapsulats en liposomes, acoblats a un transportador com és el KLH i sota la forma de pèptids ramificats (múltiple antigen peptide, MAP). Els pèptids que es van administrar amb liposomes, KLH i com a MAP van ser capaços d'originar una resposta anti-HAV capaç de neutralitzar la infectivitat del virus⁶⁶. De tots els pèptids sintètics avaluats pel nostre grup, l'HAV-VP3 (110-121) va resultar ser el més immunogènic^{67,68}. D'entre les tres seqüències peptídiques emprades, una d'elles (la de la VP1) havia estat ja descrita com a portadora d'un epítop de l'HAV⁶⁹; les altres dues eren totalment originals.

L'US DE PROTEÏNES RECOMBINANTS COM A IMMUNÒGENS.

Una important avantatge de l'ús de sistemes biològics d'expressió gènica és que aquests poden no només produir el producte desitjat a gran escala, la qual cosa en el cas de l'HAV és ja un avenç important, sino també que en alguns casos es poden donar les modificacions i configuracions estructurals dels polipèptids, que molts cops són imprescindibles per a preservar la seva potencial capacitat immunogènica.

Normalment els productes recombinants s'obtenen pel clonatge del genoma víric complet, o alternativament de gens seleccionats, en sistemes vírics, procariotes o eucariotes, i la posterior purificació de les proteïnes resultants de l'expressió. En el cas òptim de que es cloni el genoma sencer, que sigui correctament expressat, i per tant que hi hagi la producció de totes les proteïnes estructurals del virus pel qual es busca la vacuna, es pot aconseguir que es formin les denominades partícules "virus-like".

Hi ha a la literatura científica molt poques descripcions de la formació de partícules "virus-like" en sistemes procariotes. En els nostres estudis ens vam proposar intentar-ho per l'HAV, ja que es tracta d'un virió nu relativament senzill, no ser necessaris processos de glicosil·lació de proteïnes ni interaccions amb la membrana cel·lular, i haver-se descrit a *E.coli* la capacitat de miristoil·lar⁷⁰.

S'han aconseguit dues construccions plasmídiques amb potencial interès⁷¹. Per una banda, s'ha clonat la totalitat de la pauta oberta de lectura de l'HAV en el vector d'expressió pBTac2. El plasmidi recombinant resultant va ser denominat pTHAVF. Adicionalment, s'ha clonat també en el mateix vector la regió P1 del genoma del mateix virus. Aquest plasmidi recombinant va ser denominat pTHAVP1D'aquesta forma es van poder obtenir una sèrie de productes relacionats amb l'HAV que van ser estudiats per microscòpia electrònica i

caracteritzats immunològicament amb una col·lecció d'anticossos policlonals i monoclonals. Ultraestructuralment, s'observen en els dos casos l'aparició de grans cossos d'inclusió (c.i.), Aquests c.i. són reconeguts per Western blot amb un anticòs policlonal contra les proteïnes desnaturalitzades del virus, posant de manifest la presència de proteïnes d'aproximadament 106 kDa i 100 kDa, per les construccions pTHAVP1 i pTHAVF respectivament. Els c.i. han estat purificats i administrats a animals d'experimentació, obtenint-se anticossos capaços de reconèixer l'HAV. A més, els dos tipus de c.i. són reconeguts per la tècnica d'immunodot amb un anticòs policlonal obtingut amb virus sencers. Per altra banda, s'ha pogut detectar en la fracció soluble material estructurat corresponent a l'HAV. Mitjançant Western blot, s'han detectat les proteïnes de la càpside del virus en extractes cel·lulars immunoprecipitats amb anticossos monoclonals que reconeixen específicament material estructural de l'HAV. Tots aquests resultats demostren que les proteïnes expressades a *E.coli* són proteolíticament processades fins a produir estructures de l'HAV.

UN NOU EPÍTOP LINIAL DEL VIRUS DE L'HEPATITIS A.

Les dades obtingudes en el nostre laboratori amb el pèptid sintètic corresponent a la seqüència 110-121 de la proteïna VP3, suggerien que l'esmentada seqüència contenia un nou epítip de l'HAV, fins llavors inèdit. Aquesta possibilitat ha estat investigada en profunditat mitjançant proves de neutralització de la infectivitat del virus, del reconeixement del pèptid sintètic per sèrums de malalts convalescents de l'hepatitis A, i de competència entre aquests darrers sèrums i anticossos generats pel pèptid sintètic a l'hora de reconèixer el propi virus. A més, quan es produeix una substitució de l'arginina, la glicina o l'àcid aspàrtic en les posicions 112, 113 i 114 respectivament per altres aminoàcids es perd la capacitat de reconeixement dels pèptids sintètics per part de sèrums de malalts convalescents d'hepatitis A.

Tots els resultats esmentats confirmen la presència en la seqüència 110-121 de la proteïna VP3 d'un nou epítóp lineal de l'HAV⁷², i un potencial epítóp T d'aquest virus⁷³. A més, els anticossos generats amb el pèptid VP3(110-121) s'uneixen al virió sencer i neutralitzen la seva infectivitat. Aquests mateixos anticossos anti-VP3(110-121) presenten competències amb sèrums convalescents d'hepatitis A i anticossos monoclonals anti-HAV.

PAPER DE LA SEQÜÈNCIA RGD (ARGININA-GLICINA-ASPÀRTIC) DE LA PROTEÏNA VP3 EN LA INFECTIVITAT DEL VIRUS DE L'HEPATITIS A.

La seqüència RGD (arginina-glicina-aspartic) juga un paper preponderant en l'absorció d'altres picornavirus a les cèl·lules hoste^{74,75}. No obstant, altres autors han descartat que l'esmentada seqüència intervingui en l'adherència de l'HAV a cèl·lules de ronyó de mico⁷⁶. Estem duent a terme estudis sobre les interrelacions de la dita seqüència amb cèl·lules més relacionades amb la biologia de l'HAV, com són cèl·lules entèriques humanes o eritròcits, ja que s'ha descrit que l'HAV és capaç de provocar hemaglutinació⁷⁷.

Per tal d'avaluar el paper de la seqüència RGD en l'adsorció del virus a la línia cel·lular CaCo-2, originària d'un carcinoma de còlon humà, es van dur a terme bloqueigs de la unió del virus als receptors de les esmentades cèl·lules fent competir el virus amb pèptids sintètics corresponents a la seqüència 110-121 de la proteïna VP3 de la càpside del virió. També es van fer estudis amb anticossos específics generats amb aquest mateix pèptid, que reaccionen amb la seqüència RGD del virió, de cara a comprovar si es podia d'aquesta forma bloquejar la infecció. Tots els resultats que hem obtingut en aquests estudis indiquen que la seqüència RGD no intervé en l'absorció de l'HAV a cèl·lules intestinals humanes.

Per avaluar el paper de la seqüència RGD en l'hemadsorció de l'HAV, es van efectuar bloqueigs de la unió del virus a glòbuls rojos, mitjançant competència del virus amb pèptids sintètics corresponents a la seqüència 110-121 de la proteïna VP3 de la càpside del virió. Es van també emprar anticossos específics contra el mateix pèptid sintètic que reaccionen amb la seqüència RGD del virió, i es va comprovar si eren capaços de bloquejar així l'hemadsorció. Les dades que hem anat recullint fins a hores d'ara suggereixen que efectivament la seqüència RGD de la proteïna VP3 juga un paper important en la interacció de l'HAV amb el/els receptor/s dels eritròcits humans.

CONCLUSIONS FINALS.

Els virus entèrics causen moltes infeccions que pel fet de ser freqüents i conegudes molts cops no reben l'atenció que caldria. Dins del context de les infeccions víriques de transmissió fecal-oral destaquen les gastroenteritis i les hepatitis. Mentre que les primeres són la causa més important de mortalitat infantil en el món, l'hepatitis A és una malaltia amb uns nivells de mortalitat i de complicacions relacionades gens menyspreables. A més es tracta d'una infecció encara amb elevada prevalença en zones com la Mediterrània.

Les mesures preventives per les infeccions entèriques es basen en la determinació de les potencials fonts de contagi, és a dir, dur a terme un control essencialment d'aigües, aliments, fomites, i hemoderivats per a la qual cosa calen sistemes de diagnòstic aplicable a aquests tipus de mostres. L'altre mesura profilàctica es basa en immunitzar a la població susceptible d'entrar en contacte amb el patògen, i per tant és menester disposar de vacunes eficaces en front de qualsevol variant del virus, si es dona el cas, i amb un cost que permeti la seva administració a gran escala en zones econòmicament deprimides. Un altre possibilitat, aquest específicament

adreçada a l'hepatitis A, seria dissenyar teràpies de baix cost, aplicables a nivell preventiu o de xoc, basades en bloquejar la virèmia de l'HAV per l'administració de productes contenint l'epítop que s'ha descrit a la proteïna VP3.

Un agent infecció, del qual se'n ha descrit només un serotip, i pel que no hi han reservòris animals és un bon candidat per a ser eradicat amb productes eficients per una teràpia, ja sigui preventiva o de xoc. L'obstacle més important per assolir aquest objectiu és l'elevada persistència del virus fora del seu únic hoste: l'home.

-
- 1 Henderson, D.A. (1996). *Microbe Hunters, Past and Present*, Bloomington
 - 2 Hopkins, D. (1989). *Smallpox in History*, Chicago
 - 3 Bosch, A. (1998). *Internatl. Microbiol.* 1, 191
 - 4 Bosch, A. et al. (1994). *Lancet* 344, 1024
 - 5 Sattar, S.A. et al. (1986). *J.Hyg.Camb.* 96, 277
 - 6 Ward, R.L. et al. (1986). *J. Infect. Dis.* 154, 871
 - 7 Assaad, F.& Borecka, I (1977). *Bull. World Health Organ.* 55, 445
 - 8 Craun, G.F. (1991). *Wat. Sci. Tech.* 24, 17
 - 9 Dove, A.W. & Racaniello, V.R. (1997). *Science* 277, 779
 - 10 Centers for Disease Control and Prevention (1990). *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 39, 1
 - 11 Bern, C. et al. (1992). *WHO Bull.* 70, 705
 - 12 Ellis, M.E. et al.(1984). *Micr. Arch.Dis. Child* 59, 848
 - 13 Uhnoo I, et al. (1984). *J. Clin. Microbiol.* 20, 365
 - 14 Herrmann J.E. et al. (1991). *New Engl. J. Med.* 324, 1757
 - 15 Hipocrates de Kos, Ca 359 aC
 - 16 Fields, B.N et al. (1996). *Fields Virology*, Philadelphia
 - 17 Domínguez, A. et al. (1995). *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica* 13, 50
 - 18 Murphy, F.A. et al. (1995). *Arch. Virol. /Suppl.* 10, Wien New York
 - 19 Cliver, D. (1985). *Public Health Rev.* 13, 235
 - 20 Cohen, J.I. et al. (1987). *J. Virol.* 61,50
 - 21 Lemon, S.M. & Ping, L.-H. (1989). *Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Detection*. pp193, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 - 22 Lemon, S.M. (1985). *New Eng. J. Med.* 313, 1059
 - 23 Hughes, J.V. et al. (1984). *J. Virol.* 52, 465
 - 24 Arnal, J.M. et al. (1997). *Pharmaeconomics* 12, 361
 - 25 Provost, P.J. & Hilleman, M.R. (1979). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 160, 213
 - 26 Cromeans, T., Sobsey, M.D. & Fields, H.A. (1987). *J. Med. Virol.* 22, 45
 - 27 Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z. & Purcell, R.H. (1973). *Science* 182, 1026
 - 28 Lemon, S.M., Binn, L.N. & Marchwicki, R.H. (1983). *J. Clin. Microbiol.* 17, 834
 - 29 Sobsey, M.D. et al. (1988). *Viral Hepatitis and Liver Disease* pp 121, New York
 - 30 Cohen, J.I., et al. (1987). *J. Virol.* 61, 3055
 - 31 Diez, J.M. (1993). *Tesis Doctoral*, Universidad de Barcelona
 - 32 Saiki, R.K., et al. (1985). *Science* 330, 1350
 - 33 Gajardo, R. et al. (1995). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3460
 - 34 Jansen, R.W., Siegl, G. & Lemon, S.M. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2867

-
- 35 Cohen, J.I., et al. (1987). *J. Virol.* 61, 50
- 36 Bosch, A. et al. (2000). *Wat. Sci. Tech.* (En premsa)
- 37 Hu, M., Kang, L. & Yao, G. (1991). *Falk Symposium* 54, 361
- 38 Rao, V.C. & Melnick, J.L. (1986). *American Society for Microbiology*, Washington DC.
- 39 Gerba, C.P. et al. (1978). *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 540
- 40 Sobsey, M.D. & Glass, J.S.(1980). *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 201
- 41 Gajardo, R. et al. (1991). *J. Virol. Methods*, 31, 345
- 42 Bosch, A., et al. (1991). *J. Amer. Water Works Assoc.* 83, 80
- 43 Bosch, A., Díez, J.M. & Abad, F.X. (1993). *Wat. Sci. Tech.* 27, 351
- 44 Abad, F.X., et al. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2377-2383.
- 45 Abad, F.X., Pintó, R.M. & Bosch, A. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3704
- 46 Abad, F.X., Pintó, R.M. & Bosch, A. (1997). *FEMS Microbiol. Letters* 156, 107
- 47 Rao, V.C & Melnick, J.L. (1986). *Environmental Virology*, Washington, D.C.
- 48 Sobsey, M.D. et al. (1988). *Viral Hepatitis and Liver Disease* pp 121, New York
- 49 Bosch, A., et al. (1988). *Can. J. Microbiol.* 34, 921
- 50 Abad, F.X. et al. (1997). *J. Food Prot.* 60, 677
- 51 Mele, A. et al. (1989). *Amer. J. Epidemiol.* 130, 540
- 52 Hu, M., Kang, L. & Yao, G. (1991). *Falk Symposium* 54, 361
- 53 Bosch et al. (2000). *Wat, Sci, Tech.* (En premsa).
- 54 Anònim. (1993). *B.O.E.* 74, 9301
- 55 Bosch, A. et al. (1994). *Lancet* 344,1024
- 56 Anònim. (1985). *B.O.E.* 137, 17298
- 57 Anònim (1991). *J. Europ. Comm.* 91/492/EEC.
- 58 Jofre, J. et al. (1993). *Contamination of the environment by viruses and methods of control. Wiener Mittellungen, Band 112.* pp 105
- 59 Bosch, A, et al. (2000). *Wat. Sci. Tech.* (En premsa)
- 60 Robertson, B.H. (1992). *J. Gen. Virol.* 73, 1365
- 61 Bosch, A. et al (1996). *Mol. Cell. Probes* 10, 81
- 62 Abad, F.X., Pintó, R.M. & Bosch, A. (2000). *Res. Signpost* (En premsa)
- 63 D'Hondt, E. (1992). *Vaccine* 10, s48
- 64 Brown, F. (1989). *Vaccine Biotechnology.* pp 173, J.L. Academic Press, New York.
- 65 Haro I, et al. (1995). *Microbiol. Immunol.* 39, 485
- 66 González-Dankaart, J.F. (1999). *Tesis Doctoral*, Universidad de Barcelona
- 67 Gajardo, R. (1992). *Tesis Doctoral*, Universidad de Barcelona
- 68 Haro, I., Rieg, F. & Bosch, A. (1994). *Cur. Topics Peptide Prot. Res.* 1: 135
- 69 Emini, E.A.et al. (1985). *J. Virol.* 55, 836

-
- 70 Issartel, J-P. et al. (1991). *Nature* 351, 759
- 71 Bosch, A. et al. (1997). *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Torino, pp 27
- 72 Bosch, A. et al. (1998). *J. Med. Virol.* 54, 95
- 73 Píntó, R.M. et al. (1998). *FEBS Letters*. 438: 106
- 74 Novella, I. et al. (1993). *FEBS Letters* 330, 253
- 75 Fox, G. et al. (1989). *J. Gen. Virol.* 70, 625
- 76 Stapleton, J.T., Frederick, J. & Meyer, B. (1991). *J. Infect. Dis.* 164, 1098
- 77 Eckels, K.H. et al. (1989). *J. Clin. Microbiol.* 27, 1375

DISCURS DE CONTESTACIÓ
PER L'ACADÈMIC NUMERARI

EXCM. SR. DR. PERE COSTA i BATLLORI

Excel·lentíssim Sr. President,
Honorable Sr. Conseller,
Excel·lentíssims Srs. Acadèmics,
Senyores i Senyors:

En la nostra Reial acadèmia de doctors estan representades, a través dels seus acadèmics numeraris un bon nombre de professions universitàries , unes amb una alta representació, altres, més o menys minoritàries i algunes amb nul o molt escàs nombre d'acadèmics. Aquest era el cas dels biòlegs que avui, amb evident encert, han entrat en el camí de la normalitat.

Com a conseqüència d'aquesta multiprofessionalitat acadèmica sura en el nostre ambient una recomanació, no escrita, però real, que es refereix a la conveniència que el nou acadèmic exposi el "seu" tema especializat amb plena i total llibertat i tranquil·litat, ja que compta amb la comprensió de tots els assistents, i que l'acadèmic a qui correspon la contestació procuri tenir en compte en el seu discurs la veritat humanística i tecnològica del substrat de la nostra entitat.

En la sessió d'avui aquesta recomanació sobra, doncs tots els aquí presents hem entès perfectament l'aportació

excel·lent del professor Bosch, la importància dels virus en la història de la humanitat i en la sanitat, el paper dels virus entèrics en la patologia de la que ens podem convertir en patidors i l'àmbit de les seves valuoses investigacions.

Els virus són, encara avui enigma, ja que no es poden definir amb els criteris de sentit comú amb que es defineixen els animals o les plantes. Això és degut a la seva íntima naturalesa que s'ha denominat de parasitisme a nivell genètic, concepte en el que, més o menys, insistirem endavant.

Per incidir més en el tema ens agradaria deixar volar la nostra ment i posar sobre la taula, per exemple, que els virus presenten una història evolutiva pròpia en relació als components dels regnes animal i vegetal, marcada per la seva transferència d'hoste a hoste, que poden sobreviure a la mort de la cèl·lula parasitada i es poden moure entre hostes ben diferenciats, des d'una planta a un animal, que constitueixen un sistema genètic és similar al de totes les cèl·lules, que estan sotmesos a canvis evolutius, de tal manera que un virus pot convertir-se en "una altra cosa" mitjançant canvis genètics, (queda a l'aire la pregunta inversa: és possible que "alguna cosa" es converteixi en un virus?) i que l'evolució vírica presenta dos grans camins evolutius: l'evolució regressiva a partir de cèl·lules independents o bé per la transferència de cèl·lula a cèl·lula.

Tot un món d'incògnites i de possibilitats d'experimentació.

Com a acadèmic responsable del discurs de contestació voldria, conseqüentment, posar de manifest una idea que, també, tots els aquí presents tenim en aquest moment en la nostra ment: que el món de la virologia és atractiu i fascinant, que ens obra un munt de preguntes i d'inquietuds, que és enormement complex, que voldríem que el Dr. Bosch digues més coses de les moltes que sap sobre el tema, però

Kronos és inexorable i l'acadèmic responent ha de complir amb el seu paper.

Permeteu-me, doncs, que faci especial èmfasi en la primera part de la magnífica intervenció del Dr. Bosch, en la que per la meua formació professional em trobo més segur i deixi de banda, amb tot el respecte del no especialista, la seva contundent aportació sobre els virus entèrics, la importància dels quals no és necessari que posi de manifest.

Jo voldria, inicialment, referir-me a tres aspectes per a mi importants i indirectament relacionats amb l'aportació del Dr. Bosch, que es refereixen al paper cada dia més influent de la virologia en les nostres vides.

A) Jo sóc veterinari i en el transcurs dels anys 1950 a 1955, en la Facultat de Veterinària de Saragossa en em vaig veure obligat a traslladar-me per poder desenvolupar la meua vocació professional, teníem com a obra màxima de la patologia animal a la "*Patologia y terapéutica especiales de los animales domésticos*" de Hutyra, Marek i Manniger, era l'edició de 1953. He buscat el text en la meua biblioteca i he recordat que les malalties víriques conegudes eren: *Febris catarrhalis infectiosa canum* (brom del gos), *Influenza equorum* (influenza dels cavalls), *Pestis surums* (pesta porquina), *Morbus Aujeszky* (malaltia d'Aujeszky), *Pestis avium* (pesta aviar), *Variola* (verola), *Exantema vesiculosum coitale* (exantema vesiculós), *Aphae epizoticae* (mal de peu), *Lyssa* (ràbia), *Anaemia infectiosa equorum* (anèmia infecciosa dels cavalls) i *Meningo encephalomyelitis enzootica* (meningo encefalomyelitis).

Si trèiem les malalties dels cavalls, avui d'una importància relativa i limitada, el coneixement de la virologia Veteronària era irrisori i el seu diagnòstic es basava en el quadre clínic, l'epizootologia i l'estudi citològic en els teixits infectats d'unes alteracions específiques localitzades denominades inclusions intracel·lulars o corpuscles

d'inclusió, per cert, invisibles amb els medis de què disposàvem i, posteriorment, en estudis serològics que revelaven l'especificitat antigènica de les proteïnes víriques i permetien probes diagnòstiques vàlides. El tractament era inexistent i la prevenció molt difícil amb existència d'unes poques vacunes, algunes vegades amb més contraindicacions que efectes favorables.

Avui la patologia preocupant de totes les espècies animals, siguin productives (aus, porcs, vaques i vedells, ovelles i corders) com de les denominades de companyia, està immersa en adenovirus, citomegalovirus, parvovirus, rotavirus, reovirus, coronavirus, virus herpes, paramyxovirus, picornavirus, ortomixovirus, poxvirus, astrovirus, calicivirus, arbovirus, togavirus, retrovirus, oncornavirus, etc., i han passat a segon terme gran part de les malalties bacterianes que en aquell temps estudiàvem a fons i que ocupaven la major part de l'Hutyra gràcies, majoritàriament, al paper decisiu dels antibiòtics i quimioteràpics en el seu tractament. La prevenció vaccinal és avui segura i amb pocs efectes secundaris si bé s'està treballant cada dia més en l'extinció de les malalties víriques mitjançant mides de política sanitària basades en l'erradicació de tot focus que es presenti dins una zona concreta i determinada (país o, en el nostre cas, Unió Europea).

Tant en medicina humana com veterinària i vegetal els virus representen avui el principal perill sanitari i per tant, tots els estudis que sobre els mateixos es facin són de transcendental interès.

B) Un altre aspecte, que crec important, és el de la relació entre els virus i l'avui controvertida i discutida enginyeria genètica.

Recordem, repetint conceptes perfectament exposats pel Dr. Bosch, que els virus no formen part de cap regne, que no poden viure independents i que són paràsits obligats de tots els ésser vius, això és, no són autònoms. Anotem que són formats per un únic àcid nucleic (DNA o RNA) sense que mai coexisteixin els dos en la seva estructura.

Recordem també que els àcids nucleics contenen la informació genètica. Una volta els virus han penetrat a una cèl·lula d'un ser viu fan ús de l'estructura d'aquella per replicar-se (reproduir-se) mil i mils de vegades.

Ara bé, en els anys setanta, els investigadors varen introduir gens (DNA) de determinades cèl·lules a soques bacterianes d'*Escheríchia coli*, que és un germen present quasi constantment en els animals vius. La nova cèl·lula bacteriana, una vegada aplicada aquesta tècnica (denominada de l'ADN recombinat) és capaç de sintetitzar proteïnes, hormones, vitamines, etc.

I aquí els virus tenen un paper important, doncs al moment que entren en una cèl·lula hi aporten el seu material genètic (els seus àcids nucleics), el qual es replica (es reproduïx) milers i milers de vegades. Així es desenvolupen fenòmens de transducció que permeten introduir gens nous a les cèl·lules que no els tenien.

Les tècniques d'enginyeria genètica permeten una recombinació de gens, molt més eficaç de la que es dona en la naturalesa, i es poden construir éssers vius que continguin àcids nucleics procedents d'organismes genèticament molt diferents com poden ser un bacteri i un animal.

Les aplicacions d'aquesta tècnica permeten no sols la producció de proteïnes, hormones i vitamines anteriorment indicades sinó també d'antibiòtics, vaccins, la millora de la qualitat nutritiva dels aliments, l'obtenció de plantes més resistents als paràsits, la creació de microorganismes capaços

de degradar substàncies tòxiques o deixalles i, fins i tot, manipular el DNA abans del naixement de l'ésser viu.

C) Un últim aspecte a senyalar es refereix a que alguns virus, entre ells els retrovirus i els bacteriòfags, no sempre es multipliquen després d'entrar a la cèl·lula hoste sinó que s'insereixen al cromosoma cel·lular i es dupliquen amb ell.

La presència d'un àcid nucleic estrany en una cèl·lula pot estimular la producció d'una proteïna, denominada interferó, que inhibeix d'una manera no específica la multiplicació d'altres virus que posteriorment poden parasitar a la cèl·lula. El tema és de gran interès en llua davant les malalties víriques.

El camp de la virologia és, doncs ampli, valuós pel futur de l'home i la presència d'un expert dins de la nostra Acadèmia es feia, sens dubte imprescindible.

Un dels objectius de la resposta a la conferència del nou acadèmic és la de resaltar la seva personalitat humana i professional.

Aquí dec dir que les meves dificultats han estat grans degut a l'extraordinària modèstia del Dr. Albert Bosch, però una vegada conegut a fons el seu currículum les meves dificultats han continuat ja que és extraordinàriament difícil resumir-lo dins del temps que l'acte ens ha concedit.

El Dr. Bosch, nascut a Barcelona el 1951, és Llicenciat en Ciències, secció de Ciències Biològiques, modalitat de Biologia Fonamental i Zoologia, al 1975 per la Universitat de Barcelona i Doctor en Ciències Biològiques per la Facultat de Biologia de la mateixa Universitat l'any 1979, essent Premi Extraordinari de dita Facultat.

És Catedràtic de Microbiologia des de 1997.

Els seus treballs d'investigació i la seva experiència professional es poden resumir, i això és una manera de dir, perquè la possibilitat de fer-ho en aquest acte és impossible, en:

- Investigació sobre virus oncogènics ARNS (anys 1975 a 1977), i concretament sobre les relacions entre els virus oncogènics i els seus respectius hostes en el desenvolupament de la leucèmia murina, els mecanismes d'oncogènesi per carcinògens químics i radiacions X i les relacions hoste-complex viral en la leucèmia murina espontània i induïda (tesi doctoral).
- Immunitat i immunomodulació (any 1977 fins avui) i concretament l'efecte immunomodulador de lisats i polisacàrids d'origen bacterià, sobre la leucèmia espontània i induïda i sobre tumors trasplantables en ratolins i resposta immune induïda per polipèptids sintètics i proteïnes recombinants de la càpside de virus de l'hepatitis A.
- Virologia ambiental (any 1979 fins avui) en relació a la contaminació vírica, bacteriana i parasitària d'aigües potables, superficials i sediments marins, presència de virus entèrics en marisc, supervivència de virus entèrics humans en l'ambient, desinfecció de virus en aigua, marisc i superfícies contaminades, indicadors de la presència de virus en l'ambient i sistemes de detecció de virus entèrics humans.
- Virus de peixos (anys 1985 a 1994) amb investigacions sobre la infecció eritrocítica vírica del llobarro i detecció de virus causants de malalties en peixos.
- Altres aspectes de virologia (any 1985 fins avui) amb estudis sobre els efectes de productes antivirus sobre el virus de la varicel·la zòster, desenvolupament de tècniques per l'estudi ultraestructural d'infeccions

víriques en monocapes cel·lulars i per immunomicroscopia electrònica, replicació in vitro de rotavirus i virus de l'hepatitis A, serotipad d'astrovirus i SRSV, i expressió de proteïnes de virus de la ràbia mitjançant baculovirus recombinants.

Tota aquesta labor ha estat desenvolupada al Departament de Biologia i de Microbiologia de la Universitat de Barcelona, al Departament de Patologia i al de Genètica de l'Albert Einstein College of Medicine de Nova York, al Departament de Ciències Ambientals i Enginyeria de la Universitat de Carolina del Nord (USA), al Departament de Microbiologia i Immunologia de la Universitat de Arizona (USA), Departament de Virologia Mèdica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Pretòria (Sudàfrica), Departament de Virologia del Institute of Child Health de Londres, Hospital for Sick Children i Medical Research Institute de la Universitat d'Alexandria a Egipte, entre d'altres.

El Dr. Bosch és Investigador i responsable del Grup de Recerca Consolidat de Virus Entèrics de la Generalitat de Catalunya, grup virtual de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. És també membre fundador del Centre Especial de Recerca del Centre de Desenvolupament del Medicament, grup associat al Centre de Referència de Tecnologia d'Aliments (CERTA) de la Generalitat de Catalunya.

És col·laborador i avaluador de nou revistes tècniques internacionals d'elit i de reconegut prestigi.

És membre d'onze societats científiques, més de la meitat internacionals.

Col·labora de manera continuada en les activitats de trenta institucions estrangeres que treballen en temes de la seva especialitat i que, com podeu suposar, no ens és

possible relacionar per manca d'espai. Ha rebut al seu centre de treball a vint-i-dos investigadors estrangers, ben coneguts internacionalment i que malauradament tampoc podem relacionar per la mateixa causa.

La direcció de sis tesis doctorals, una d'elles Premi Extraordinari, són un clar exponent de la seva dedicació docent, a més de la tasca investigadora.

En el seu extens currículum hi figuren un centenar de publicacions internacionals i més d'un centenar de comunicacions a congressos, la majoria també internacionals.

I cal acabar amb una felicitació doble, un desig i un prec, la primera felicitació al Dr. Albert Bosch per la seva immillorable i valuosa aportació a l'acte acadèmic del seu ingrés com a membre numerari, la segona, que en realitat és una autofelicitació, va dirigida a tots els components de l'Acadèmia pel gran encert que aquesta ha tingut a proposar l'ingrés del ja Acadèmic, i el desig i el prec van dirigits també al Dr. Bosch: que durant molts anys pugui seguir aquest brillant camí que, degut a la seva joventut, esperem que sigui llarg i fructífer i que col·labori, en la mida que la seva dedicació a la investigació li permeti, en les activitats de la des d'ara la seva Acadèmia.

Moltes gràcies.

ÍNDIX

LA VIROLOGIA, ELS VIRUS, EL DESENVOLUPAMENT DE LA VIROLOGIA.....	9
ELS VIRUS ENTÈRICS.....	12
LA TRANSMISSIÓ DELS VIRUS ENTÈRICS.....	13
LA POLIOMIELITIS.....	17
I QUÈ CALDRÀ FER DESPRÉS DE L'ERADICACIÓ DE LA POLIO?.....	19
LES GASTROENTERITIS VÍRIQUES.....	21
LES HEPATITIS.....	23
EL VIRUS DE L'HEPATITIS A.....	27
SISTEMES DE DIAGNÒSTIC PEL VIRUS DE L'HEPATITIS A.....	28
CONTROL AMBIENTAL DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE L'HEPATITIS A.....	31
CONTROL DE LA QUALITAT VIROLÒGICA DE LES AIGÜES.....	32
ESTUDI D'UN BROU D'HEPATITIS A DE TRANSMISSIÓ HÍDRICA.....	34

ESTUDIS DE LA PERSISTÈNCIA DEL HAV EN AIGÜES I SUPERFÍCIES CONTAMINADES.....	36
EL VIRUS DE L'HEPATITIS A EN SEDIMENTS MARINS...	39
EL VIRUS DE L'HEPATITIS HUMÀ EN MARISC.	40
ESTUDI DEL BROT D'HEPATITIS A CAUSAT A LA COMUNITAT VALENCIANA PEL CONSUM DE TELLERINES CONGELADES.	42
CONTROL DEL VIRUS DE L'HEPATITIS A EN HEMODERIVATS.....	47
VACUNES PER L'HEPATITIS A: ESTRATÈGIES I TIPUS....	48
L'ÚS DE PÈPTIDS SINTÈTICS COM A IMMUNÒGENS.....	48
L'US DE PROTEÏNES RECOMBINANTS COM A IMMUNÒGENS.	50
UN NOU EPÍTOP LINIAL DEL VIRUS DE L'HEPATITIS A.	51
PAPER DE LA SEQÜÈNCIA RGD (ARGININA-GLICINA- ASPÀRTIC) DE LA PROTEÏNA VP3 EN LA INFECTIVITAT DEL VIRUS DE L'HEPATITIS A.....	52
CONCLUSIONS FINALS.	53
DISCURS DE CONTESTACIÓ	59

NOVES PUBLICACIONS DE LA REIAL ACADEMIA DE DOCTORS

Directori 1991.

Los tejidos tradicionales en las poblaciones pirenaicas (Discurs de promoció a acadèmic numerari de l'Excm.Sr. Eduardo de Aysa Satué, Doctor en Ciències Econòmiques, i contestació per l'Excm.Sr. Josep Antoni Plana i Castellví, Doctor en Geografia i Història), 1992.

La tradición jurídica catalana (Conferència magistral del acadèmic de número Excm.Sr. Josep Joan Pintó i Ruiz, Doctor en Dret, en la Solemne Sessió d'apertura de curs 1992-93, que fou presidida per SS.MM. el Rei Joan Carles I i la Reina Sofia), 1992.

La identidad étnica (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Angel Aguirre Baztan, Doctor en Filosofia i Lletres, i contestació per l'Excm.Sr. Josep M. Pou d'Avilés, Doctor en Dret), 1993.

Els laboratoris d'assaig i el mercat interior; Importància i nova concepció (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Pere Miró i Plans, Doctor en Ciències Químiques, i contestació per l'Excm.Sr. Josep M^a Simón i Tor, Doctor en Medicina i Cirurgia), 1993.

Contribución al estudio de las Bacteriemias (Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent Il.lm.Sr. Miquel Marí i Tur, Doctor en Farmàcia, i contestació per l'Excm.Sr. Manuel Subirana i Cantarell, Doctor en Medicina i Cirurgia), 1993.

Realitat i futur del tractament de la hipertròfia benigna de pròstata (Discurs de promoció a acadèmic numerari de l'Excm.Sr. Joaquim Gironella i Coll, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'Excm.Sr. Albert Casellas i Condom, Doctor en Medicina i Cirurgia i President del Col.legi de Metges de Girona), 1994.

La seguridad jurídica en nuestro tiempo. ¿Mito o realidad? (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. José Méndez Pérez, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm.Sr. Angel Aguirre Baztán, Doctor en Filosofia i Lletres), 1994.

La transició demogràfica a Catalunya i a Balears (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Tomàs Vidal i Bendito, Doctor en Filosofia i Lletres, i contestació per l'Excm.Sr. Josep Ferrer i Bernard, Doctor en Psicologia), 1994.

L'art d'ensenyar i d'aprendre (Discurs de promoció a acadèmic numerari de l'Excm.Sr. Pau Umbert i Millet, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'Excm.Sr. Agustín Luna Serrano, Doctor en Dret), 1995.

Sessió necrològica en record de l'Excm.Sr. Lluís Dolcet i Buxeres, Doctor en Medicina i Cirurgia i Degà emèrit de la Reial Acadèmia de Doctors, que morí el 21 de gener de 1994. Enaltíren la seva personalitat els acadèmics de número Excms.Srs.Drs. Ricard García Vallès, Josep M^a Simón i Tor i Albert Casellas i Condom. 1995.

La Unió Europea com a creació del geni polític d'Europa (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Jordi Garcia-Petit i Pàmies, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm.Sr. Josep Lloret i Brull, Doctor en Ciències Econòmiques), 1995.

La explosión innovadora de los mercados financieros (Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent Il.lm.Sr. Emilio Soldevilla García, Doctor en Ciències Econòmiques i Empresariales, i contestació per l'Excm.Sr. José Méndez Pérez, Doctor en Dret), 1995.

La cultura com a part integrant de l'Olimpisme (Discurs d'ingrés com acadèmic d'honor de l'Excm.Sr. Joan Antoni Samaranch i Torelló, Marquès de Samaranch, i contestació per l'Excm.Sr. Jaume Gil i Aluja, Doctor en Ciències Econòmiques), 1995.

Medicina i Tecnologia en el context històric (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Felip Albert Cid i Rafael, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'Excm.Sr. Angel Aguirre Baztán, Doctor en Filosofia i Lletres) 1995.

Els sòlids platònics (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numerària Excma.Sra. Pilar Bayer i Isant, Doctora en Matemàtiques, i contestació per l'Excm.Sr. Ricard Garcia i Vallès, Doctor en Dret) 1996.

La normalització en Bioquímica Clínica (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Xavier Fuentes i Arderiu, Doctor en Farmàcia, i contestació per l'Excm.Sr. Tomàs Vidal i Bendito, Doctor en Geografia) 1996.

L'entropia en dos finals de segle (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. David Jou i Mirabent, Doctor en Ciències Físiques, i contestació per l'Excm.Sr. Pere Miró i Plans, Doctor en Ciències Químiques) 1996.

Vida i música (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Carles Ballús i Pascual, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'Excm.Sr. Josep M^è Espadaler i Medina, Doctor en Medicina i Cirurgia) 1996.

La diferencia entre los pueblos (Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent Il.lm.Sr. Sebastià Trias Mercant, Doctor en Filosofia i Lletres, i contestació per l'Excm.Sr. Angel Aguirre Baztán, Doctor en Filosofia i Lletres) 1996.

L'aventura del pensament teològic (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Josep Gil i Ribas, Doctor en Teologia, i contestació per l'Excm.Sr. David Jou i Mirabent, Doctor en Ciències Físiques) 1996.

El derecho del siglo XXI (Discurs d'ingrés com acadèmic d'honor de l'Excm.Sr.Dr. Rafael Caldera, President de Venezuela, i contestació per l'Excm.Sr. Angel Aguirre Baztán, Doctor en Filosofia i Lletres) 1996.

L'ordre dels sistemes desordenats (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Josep M^è Costa i Torres, Doctor en Ciències Químiques, i contestació per l'Excm.Sr. Joan Bassegoda i Nonell, Doctor Arquitecte) 1997.

Un clam per a l'ocupació (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Isidre Fainé i Casas, Doctor en Ciències Econòmiques, i contestació per l'Excm.Sr. Joan Bassegoda i Nonell, Doctor Arquitecte) 1997.

Rosalía de Castro y Jacinto Verdaguer, visión comparada (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Jaime Manuel de Castro Fernández, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm.Sr. Pau Umbert i Millet, Doctor en Medicina i Cirurgia) 1998.

La nueva estrategia internacional para el desarrollo (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Santiago Ripol i Carulla, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm.Sr. Joaquim Gironella i Coll, Doctor en Medicina i Cirurgia) 1998.

El aura de los números (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Eugenio Oñate Ibáñez de Navarra, Doctor Enginyer de Camins, Canals i Ports, i contestació per l'Excm.Sr. David Jou i Mirabent, Doctor en Ciències Físiques) 1998.

Nova recerca en Ciències de la Salut a Catalunya (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numeraria Excm.Sra. Anna M^a Carmona i Cornet, Doctora en Farmàcia, i contestació per l'Excm.Sr. Ricard Garcia i Vallès, Doctor en Dret) 1998.

Dilemes dinàmics en l'àmbit social (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Albert Biayna i Mulet, Doctor en Ciències Econòmiques, i contestació per l'Excm.Sr. Josep Ma. Costa i Torres, Doctor en Ciències Químiques) 1999.

Mercats i competència: Efectes de liberalització i la desregulació sobre l'eficàcia econòmica i el benestar (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Amadeu Petitbó i Juan, Doctor en Ciències Econòmiques, i contestació per l'Excm.Sr. Jaime M. de Castro Fernández, Doctor en Dret) 1999.

Epidemias de asma en Barcelona por inhalación de polvo de soja (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numeraria Excm.Sra. M^a José Rodrigo Anoro, Doctora en Medicina, i contestació per l'Excm.Sr. Josep Llori i Brull, Doctor en Ciències Econòmiques) 1999.

Hacia una evaluación de la actividad cotidiana y su contexto: ¿Presente o futuro para la metodología? (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numeraria Excm.Sra. Maria Teresa Anguera Argilaga, Doctora en Filosofia i Lletres (Psicologia) i contestació per l'Excm.Sr. Josep A. Plana i Castellví, Doctor en Geografia i Història) 1999.

Directori 2000.

Antonio de Capmany: el primer historiador moderno del Derecho Mercantil (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Xabier Añoveros Trias de Bes, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm.Sr. Santiago Dexeus i Trias de Bes, Doctor en Medicina i Cirurgia) 2000.

La medicina de la calidad de vida (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm.Sr. Luís Rojas Marcos, Doctor en Psicologia, i contestació per l'Excm.Sr. Angel Aguirre Baztán, Doctor en Psicologia) 2000.

Pour une science touristique: la tourismologie (Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent, Il.lm.Sr. Jean-Michel Hoerner, Doctor en Lletres i President de la Universitat de Perpinyà, i contestació per l'Excm.Sr. Jaume Gil-Aluja, Doctor en Ciències Econòmiques) 2000.

La Reial Acadèmia, bo i respectant com
a criteri d'autor les opinions exposades en
les seves publicacions, no se'n fa
responsable ni solidària.

® Reial Acadèmia de Doctors
Disseny: Anna Bosch i Baltasar
Impressió: Imprenta Baltasar 1861
Tels. 93 346 91 52 - 93 346 92 06
Tiratge 350 exemplars

Dipòsit Legal: B-49.194-2000

REIAL ACADÈMIA DE DOCTORS
—Publicacions—