



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Programa de Biología Celular y Molecular

Facultad de Ciencias

**CARACTERIZACIÓN
EPIDEMIOLÓGICA Y MOLECULAR
DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A**

Paula Bardón de Tena

Tesis doctoral

Directoras:

Encarnación Clavijo Frutos

Silvana Teresa Tapia Paniagua

2024

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Paula Bardón de Tena

 <https://orcid.org/0009-0009-6006-742X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña PAULA BARDÓN DE TENA

Estudiante del programa de doctorado BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A

Realizada bajo la tutorización de MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ y dirección de ENCARNACIÓN CLAVIJO FRUTOS Y SILVANA TERESA TAPIA PANIAGUA (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 3 de JUNIO de 2024

Fdo.: PAULA BARDÓN DE TENA Doctorando/a	Fdo.: MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ Tutor/a
Fdo.: ENCARNACIÓN CLAVIJO FRUTOS Y SILVANA TERESA TAPIA PANIAGUA	



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dra. ENCARNACIÓN CLAVIJO FRUTOS, Profesora Titular de Microbiología de la Universidad de Málaga, Dra. SILVANA TERESA TAPIA PANIAGUA, Profesora Titular de Microbiología de la Universidad de Málaga, y Dr. MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Málaga

CERTIFICAN

Que D^a. PAULA BARDÓN DE TENA ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección o tutorización los datos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: **“CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A”** que consideramos tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombra la Universidad de Málaga para optar al grado de doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado.

En Málaga, a 13 de junio de 2024.

Fdo. Encarnación Clavijo Frutos
Directora de tesis

Fdo. Silvana T. Tapia Paniagua
Directora de tesis

Fdo. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez
Tutor de tesis





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A Mami y Andre, mi apoyo incondicional



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincera gratitud a mis directoras, la Dra. Encarnación Clavijo Frutos y la Dra. Silvana Teresa Tapia Paniagua, por su orientación y apoyo a lo largo de este proceso. Sus conocimientos y su dedicación han sido fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez, por la tutorización de este trabajo.

Quisiera agradecer a mi familia y mis amigas el haberme acompañado durante estos años. A mis padres, gracias por ser soporte y por haberme inculcado el valor de la educación. A mis hermanos, por su amor e inspiración infinitos. A Ani, a Muri y a “Las del alma”, por estar siempre. A Agus, por su ejemplo de constancia y entusiasmo y por su apoyo diario.

Por último, quisiera extender mi agradecimiento a la Fundación Unicaja por su colaboración financiera, la cual hizo posible la realización de esta investigación.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

Bardón De Tena P, Tapia Paniagua S, Vico Sevilla J, Clavijo Frutos E, Martínez Manzanares E, Gonzalez-Domenech C. Unusual Surge of Acute Hepatitis A Cases in 2016 and 2017 in Malaga, Southern Spain: Characterization and Relationship with Other Concurrent European Outbreaks. *Journal of Clinical Medicine* 2023;12(20): 6613. (**Anexo 2.1**)

García-Ferreira AJ, Ortega-Alonso A, Cobos-Rodríguez J, Bardón-de-Tena P, Calderón-Cid M, García-García A, García-Escaño MD, Alcántara-Benítez R, Clavijo-Frutos E, García-Cortés M, Andrade RJ. Outbreak of acute hepatitis A in the health area served by the Hospital Universitario Virgen de la Victoria (HUVV): a change in epidemiology. *Rev Esp Enferm Dig* 2018;110(6):380-385. (**Anexo 2.2**)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dra. ENCARNACIÓN CLAVIJO FRUTOS y Dra. SILVANA TERESA TAPIA PANIAGUA, directoras de la tesis doctoral CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLOGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A

CERTIFICAN

Que el artículo científico **Unusual Surge of Acute Hepatitis A Cases in 2016 and 2017 in Malaga, Southern Spain: Characterization and Relationship with Other Concurrent European Outbreaks** publicado en la revista *Journal of Clinical Medicine*, presentado por PAULA BARDÓN DE TENA como aval de dicha tesis, no ha sido utilizado por ninguno de sus coautores en como aval en tesis doctorales anteriores.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado en Málaga a 4 de junio de 2024.

Fdo. Dra. Encarnación Clavijo Frutos
Directora de tesis

Dra. Silvana T. Tapia Paniagua
Directora de tesis



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES.

- **¿Existió relación con los brotes europeos en el incremento de casos de VHA en Málaga en 2016 y 2018?** S.T. Tapia Paniagua, J.A. Vico Sevilla, P. Bardón De Tena, E. Martínez Manzanares, E. Clavijo, C.M. González Domenech. XXV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Granada, 2 al 4 de junio del 2022.
- **Relación entre las secuencias del virus de la hepatitis A procedentes de un brote sucedido en Málaga con brotes europeos durante el periodo 2016-2018.** S. T. Tapia Paniagua, J. A. Vico Sevilla, P. Bardón De Tena, E. Martínez Manzanares, E. Clavijo, C.M. González Domenech. XXXIII Reunión de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínica. Modalidad virtual. 16 al 19 de noviembre de 2021.
- **Development of a methodology for reverse transcription and amplification of small RNA amounts in serum for whole genome sequencing of hepatitis A virus.** Paula Bardon, Silvana Teresa Tapia, Laura Mora, Eduardo Martínez, Encarnacion Clavijo. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2020. *(Publicado en la revista de abstract; congreso anulado por la pandemia COVID19).*
- **Puesta a punto de una metodología para la detección y reversotranscripción de pequeñas cantidades de RNA en suero para secuenciación masiva de quasiespecies de VHA.** S.T. Tapia Paniagua, P. Bardón, L. Moranadas, E. Martínez Manzanares, E. Clavijo. XXII Reunión Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínica (SAMPAC). 14 y 15 de noviembre de 2019. Sevilla.
- **Caracterización molecular de un brote de hepatitis A asociado a hombres que tienen sexo con hombres en la provincia de Málaga.** P. Bardón de Tena, S.T. Tapia Paniagua, L. Mora Navas, A. Infante Urrios, C. García Pérez, G. Santillana Cernuda, E. Clavijo Frutos. XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 23-25 de mayo de 2019. Madrid. ISSN: 0213-005X.
- **Brote de Hepatitis A en Málaga. Un cambio en la epidemiología de la infección.** Paula Bardón de Tena, Silvana Teresa Tapia, Cristina García, Genoveva Santillana Cernuda, Laura Mora Navas, Aurora García, Isabel Viciano Ramos, Eduardo Martínez, Encarnación Clavijo Frutos. XXXI Reunión Anual de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínica (SAMPAC). 15 y 16 de noviembre de 2018. Málaga. ISSN: 2531-2227
- **Situación epidemiológica de la hepatitis A en el distrito Málaga Oeste.** Paula Bardón de Tena, Miguel Calderón Cid, Estefanía Valencia Vera, Blanca O'Donnell Cortés, Alejandro García Ferreira, María Ortega Torres, Encarnación Clavijo Frutos. XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 11 al 13 de mayo de 2017. Málaga.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNnc	Ácido ribonucleico no codificante
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
GGT	Gamma-glutamyl transferasa
GOT	Transaminasa glutámico oxalacética
GPT	Transaminasa glutámico pirúvica
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
Hto	Hematocrito
HUVV	Hospital Universitario Virgen de la Victoria
Ig	Inmunoglobulina
INR	Ratio internacional normalizado
ITS	Infecciones de transmisión sexual
LDH	Lactato deshidrogenasa
NGS	Secuenciación de nueva generación
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR*	Proteína C reactiva
PID	Personas que se inyectan drogas
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
TP	Tiempo de protrombina
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

1. RESUMEN	21
2. INTRODUCCIÓN.....	25
2.1. RESEÑA HISTÓRICA	27
2.2. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL VHA.....	29
2.3. GENOMA.....	29
2.3.1. Diversidad genética.....	31
2.4. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN	31
2.5. SEROTIPOS DEL VHA	32
2.6. CICLO VITAL DEL VHA.....	33
2.6.1. Entrada en la célula	33
2.6.2. Proteínas y procesamiento virales	34
2.6.3. Síntesis de ARN viral.....	35
2.6.4. Ensamblaje	36
2.6.5. Salida de la célula.....	36
2.7. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN	37
2.8. PATOGENIA	38
2.9. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	40
2.9.1. Signos y síntomas de la hepatitis aguda.....	40
2.9.2. Hallazgos analíticos y radiológicos.....	40
2.9.3. Complicaciones de la hepatitis A aguda	41
2.9.4. Manifestaciones extrahepáticas.....	42
2.10. DIAGNÓSTICO DE LA HEPATITIS A	44
2.10.1. Detección de anticuerpos	44
2.10.2. Detección de antígenos virales	45
2.10.3. Diagnóstico molecular.....	45
2.11. INMUNIDAD.....	46
2.12. EPIDEMIOLOGÍA DEL VHA	48
2.12.1. Vías de transmisión del VHA.....	48
2.12.2. Distribución global de la hepatitis A.....	55
2.12.3. Epidemiología molecular del VHA.....	58
2.12.4. Hepatitis A en Europa	60
2.12.5. Hepatitis A en España	63
2.13. PREVENCIÓN DE LA HEPATITIS A	65
2.13.1. Medidas de prevención.....	65
2.14. MANEJO DE PACIENTES CON HEPATITIS A	69
3. ANTECEDENTES.....	70
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	74
4.1. HIPÓTESIS	76
4.2. OBJETIVOS.....	76
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	78
5.1. COHORTE DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS	80
5.2. ASPECTOS ÉTICOS	81
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	81
5.4. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DEL VHA	81
5.5. EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL.....	82
5.6. SECUENCIACIÓN Y GENOTIPADO	82
5.7. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y COMPARACIÓN CON OTROS BROTES.....	83

EUROPEOS	83
5.8. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA EN PACIENTES COINFECTADOS	83
VHA – VIH	83
5.9. DETECCIÓN DE VHA A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES	86
6. RESULTADOS.....	88
6.1. BROTE DE HEPATITIS A EN MÁLAGA DURANTE EL PERIODO 2016-2017	90
6.2. PROCEDENCIA DE LOS CASOS	90
6.3. DATOS DEMOGRÁFICOS	92
6.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	94
6.5. INGRESO.....	99
6.6. COMPLICACIONES	102
6.7. FACTORES DE RIESGO.....	102
6.8. ANÁLISIS GENOTÍPICO Y FILOGENÉTICO	103
6.9. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA EN PACIENTES COINFECTADOS	107
VHA-VIH.....	107
6.10. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE VHA EN AGUAS RESIDUALES DE LA PROVINCIA DE MÁLAGA.....	111
7. DISCUSIÓN.....	112
7.1. LIMITACIONES.....	133
8. CONCLUSIONES.....	136
9. BIBLIOGRAFÍA.....	140
10. ANEXOS	164
ANEXO 1. MATERIAL COMPLEMENTARIO AL TEXTO.....	166
Anexo A1.1. Relación de centros de Atención Primaria asociados al HUVV.....	166
ANEXO A1.2. Aprobación del Comité de ética.....	167
ANEXO A1.3. Resultados del análisis genotípico realizado con HAV Genotyping tool 1.0.....	168
ANEXO A1.4. Resultados obtenidos de FindModel. Ajustes de máxima probabilidad de 24 modelos diferentes de sustitución de nucleótidos.	169
ANEXO A1.5. Pruebas con diferentes topologías	170
ANEXO 2. ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS.....	172
ANEXO 2.1. Artículo publicado en Journal of Clinical Medicine (JCM).....	172
ANEXO 2.2. Artículo publicado en la Revista Española de Enfermedades Digestivas.....	173

1. RESUMEN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. RESUMEN

El virus de la hepatitis A (VHA) es un virus ARN no envuelto de polaridad positiva perteneciente al género *Hepatovirus* y a la familia *Picornaviridae*. La infección por el VHA puede cursar de forma asintomática o presentar diversas manifestaciones clínicas, que van de una hepatitis leve en niños a cuadros más severos, generalmente en adultos. La principal vía de transmisión es fecal-oral, bien por contacto directo o por consumo de agua o alimentos contaminados. En las últimas décadas, la mejora en las condiciones higiénico-sanitarias ha disminuido la incidencia global de hepatitis A, aunque continúa siendo hiperendémica en diversos países en vías de desarrollo. En regiones de baja endemicidad, en las que la prevalencia de anticuerpos frente al virus es baja, se producen brotes ocasionales fundamentalmente en grupos de riesgo, como es el caso de los hombres que tienen sexo con hombres (HSH). El 2016, el European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) alertó de la aparición de numerosos casos de hepatitis A en HSH asociados a tres cepas: VRD_521_2016, RIVM-HAV16-090 y V16-25801. El brote se prolongó hasta 2017, con 4096 casos registrados, y afectó a 22 países europeos. Otros países no europeos registraron eventos similares en el mismo periodo de tiempo.

El objetivo de este trabajo fue describir los casos de hepatitis A diagnosticados en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga entre marzo de 2016 y diciembre de 2017. Para ello, se recopilaron datos clínicos y epidemiológicos de los 184 casos. La mayoría de ellos eran españoles (81,0%), hombres (84,8%) y HSH (72,3%), con una mediana de edad de 33 años que presentaron síntomas leves. A partir de 25 muestras de suero, se amplificó y secuenció la región VP1/P2A del virus, y se realizó un análisis filogenético, incluyendo las cepas de VHA de los otros brotes europeos. Todas las secuencias pertenecían al genotipo IA, y 20 estaban relacionadas filogenéticamente con VRD_521_2016, descrita por primera vez en el Reino Unido. En 2021, se estudió la prevalencia de VHA en aguas de desecho de la provincia de Málaga, no detectándose ARN viral en ninguna de las muestras. En conclusión, los casos de VHA registrados en Málaga en 2016 y 2017 estaban relacionados filogenéticamente con VRD_521_2016, una de las tres cepas del VHA implicadas en el brote europeo. Las características clínico-epidemiológicas fueron similares a las declaradas en el resto de Europa. La diseminación mundial de las cepas implicadas pone de manifiesto la existencia de redes internacionales que facilitan la expansión del virus en este colectivo, y el papel de los viajes en la diseminación del mismo. La epidemiología molecular permite detectar el origen de los brotes y establecer relaciones entre cepas de diferentes puntos geográficos, aportando información sobre la transmisión, y permitiendo adoptar estrategias de control dirigidas. La vacuna frente al VHA es segura y eficaz, y su administración a grupos de riesgo, como los HSH, se recomienda en la mayoría de países europeos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. INTRODUCCIÓN

2.1. RESEÑA HISTÓRICA

La hepatitis A es una enfermedad conocida desde la antigüedad que ha afectado al hombre probablemente desde que este empezó a vivir en grupos suficientemente numerosos como para mantener la transmisión del virus ¹. Las primeras descripciones de ictericia contagiosa proceden de la antigua China ². También era conocida por los griegos y romanos ³. En el texto *De internis affectionibus*, que data del siglo V a.C. y con frecuencia es atribuido a Hipócrates, aparece mencionada como “el cuarto tipo de ictericia”. Sin embargo, debe recordarse que, aunque los síntomas mencionados son similares a los observados en la actualidad, existen otras enfermedades con manifestaciones clínicas similares ², por lo que no se puede asegurar que se encontraran ante el mismo agente etiológico. En 1855 comenzó a denominarse “ictericia catarral”, ya que los patólogos Bamberger y Virchow creían que estaba causada por el bloqueo del conducto del colédoco por un tapón de moco espesado ². Los primeros brotes que casi con total seguridad fueron debidos al virus de la hepatitis A (VHA) se presentaron en Europa entre los siglos XVII y XVIII. En una revisión histórica realizada por Cockayne en 1912, se acepta como primera referencia de ictericia catarral transmitida de forma epidémica la ocurrida en Menorca en 1745. El texto recalca la amplia distribución geográfica de la enfermedad, y recoge brotes registrados durante los siglos XVIII y XIX en diversos países, como los ocurridos en Italia en 1793 o en Alemania entre 1807 y 1808. En 1852 se registraron numerosos casos en Birmingham, afectando fundamentalmente a niños. En 1863 tuvo lugar en Rotterdam una extensa epidemia con al menos 300 casos, que dio lugar a pequeños brotes en diversos puntos de Holanda en los años sucesivos ³. Debido a la elevada frecuencia de brotes entre militares, en el siglo XIX comenzó a denominarse “ictericia de campaña” ⁴.

En 1908, Mc Donald apuntó por primera vez que la enfermedad estaba causada por un virus ⁵. Poco después Cockayne, propone que las manifestaciones esporádicas o catarrales y epidémicas de la ictericia son la misma enfermedad, producida por un organismo aún desconocido ³. En 1923 Blumer analizó un gran número de epidemias de hepatitis, contando por entonces con evidencia suficiente para concluir que la hepatitis infecciosa era la forma epidémica de la ictericia catarral. Además, apuntó su predilección por los adultos jóvenes y los niños, y su incidencia máxima en otoño e invierno ^{4,6}. Unos años más tarde, Findlay, Dunlop y Brown publicaron en la Real Sociedad de Medicina Tropical e Higiene el artículo titulado “Observaciones sobre la ictericia catarral epidémica”, en el que concluían que esta última probablemente estaría provocada por un “virus ultra-microscópico únicamente patógeno para el hombre” similar a la varicela, el herpes zoster, la rubeola o el virus del dengue ⁵.

La naturaleza infecciosa de la enfermedad fue probada en la década de 1940 mediante estudios de inoculación en voluntarios sanos ¹. Entre ellos destaca el llevado a cabo por Havens ⁷, en el que se demostró que el VHA podía detectarse en las heces o en sangre durante la infección aguda, que la infección podía contagiarse experimentalmente tanto por vía oral como parenteral, y que se seguía de inmunidad a largo plazo, pudiendo prevenirse mediante la administración previa de inmunoglobulina (IG) humana normal. Trabajos posteriores de este mismo autor le llevaron a concluir en 1959 que la hepatitis infecciosa epidémica era una entidad independiente, y su agente etiológico fue denominado virus de la hepatitis A. Esta enfermedad era claramente distinta de la hepatitis sérica, que se denominó hepatitis B, y a su agente causal, virus de la hepatitis B. Entre ambos virus no existía inmunidad cruzada. La hepatitis A tenía un periodo de incubación de 15 a 40 días, y se asociaba a un agente filtrable y relativamente resistente que permanecía infectivo después de calentarlo a 56°C durante 30 min y resistente al dietiléter ⁴.

Durante ese mismo periodo, los experimentos llevados a cabo por Krugman en la Escuela de Willowbrook de Nueva York permitieron conocer mejor la historia natural de la infección ⁸. El análisis de 500 casos de hepatitis infecciosa en niños institucionalizados, que incluía tanto sujetos infectados accidentalmente como voluntarios sanos inoculados artificialmente, aportó más información acerca de los periodos de incubación, infectividad y viremia. Además, se estudió la correlación entre la infección en sus diferentes fases y la afectación de parámetros analíticos relacionados con la función hepática, apuntando la utilidad de determinar las transaminasas en el diagnóstico de pacientes anictéricos y asintomáticos. Krugman y colaboradores aportaron en los años subsiguientes la evidencia definitiva acerca de la existencia de dos tipos de hepatitis, a las que denominaron inicialmente MS-1 (hepatitis infecciosa, actualmente hepatitis A) y MS-2 (hepatitis sérica, la cual se conoce hoy como hepatitis B). Para establecer esta diferencia fue fundamental el hallazgo previo por parte de Blumberg y colaboradores del entonces denominado “Antígeno Australia”, posteriormente identificado como la proteína de superficie del VHB o HBsAg (antígeno de superficie del VHB) ⁹.

Sin embargo, el virus responsable de la hepatitis A no fue identificado hasta 1973, cuando Feinstone y colaboradores descubrieron mediante microscopía electrónica unas pequeñas partículas redondas de 27 nm en las heces de voluntarios infectados experimentalmente que se encontraban en la fase aguda de la enfermedad ¹⁰. Estos mismos autores demostraron una respuesta serológica específica frente a estas partículas cuando se enfrentaban a sueros de pacientes convalecientes, y la ausencia de respuesta cuando los sueros procedían de pacientes sanos. Tampoco existía respuesta de anticuerpos en sueros de pacientes con hepatitis B. Todo ello parecía indicar que se encontraban ante el agente etiológico de la hepatitis A. Un año

más tarde, Locarnini y su equipo confirmaron en pacientes infectados espontáneamente las observaciones realizadas por Feinstone ¹¹. Estos relevantes hallazgos aportaron una clara diferencia tanto morfológica como serológica entre el VHA y el VHB.

2.2. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL VHA

El virus de la hepatitis A es un virus pequeño no envuelto de unos 27 a 32 nm de diámetro y de simetría icosaédrica. Su genoma está constituido por una sola hebra de ARN de polaridad positiva. Pertenece a la familia *Picornaviridae*, la cual engloba también a los géneros *Enterovirus*, *Parechovirus* y *Rinovirus* del ser humano. Aunque comparten la estructura general y su organización genómica, el virus de la hepatitis A tiene sin embargo una homología limitada en cuanto a la secuencia de nucleótidos y ciertas características peculiares que motivan su clasificación en un género propio, *Hepatovirus* ¹. Esta clasificación ha sido actualizada recientemente, dada la necesidad de incluir en este género virus descubiertos en mamíferos estrechamente relacionados con el virus de la hepatitis A humano ¹²⁻¹⁵, el cual pasa a denominarse taxonómicamente *Hepatovirus A* ¹⁶.

A diferencia de otros picornavirus, el VHA requiere un largo periodo de adaptación para crecer en cultivo celular, se replica lentamente y rara vez produce efecto citopático. La inactivación del VHA requiere calentar los alimentos a más de 85°C durante 1 minuto, y la desinfección de superficies precisa de 1 minuto en contacto con una dilución 1:100 de hipoclorito de sodio ¹⁷. El VHA es estable en el ambiente durante al menos un mes y más resistente a la inactivación por cloro o calor que los poliovirus. Esta resistencia facilita la transmisión y explica las epidemias de hepatitis A acontecidas a lo largo de la historia ¹⁸.

2.3. GENOMA

El genoma del VHA está constituido por una cadena lineal de ARN de polaridad positiva. Tiene una longitud de 7.478 nucleótidos (cepa HM175) y un peso molecular de alrededor $2,25 \times 10^6$ Da ². Posee un único marco de lectura (ORF) flanqueado por dos regiones no traducidas (UTR) en 5' y 3'. La extensa región 5' UTR es la más conservada del genoma ¹. No posee una estructura de caperuza, sino que, como es típico en picornavirus, tiene una pequeña proteína unida de forma covalente denominada VPg, la cual actúa como cebador en la síntesis de ARN durante la replicación ¹⁹. 5'UTR comienza con UU, como ocurre en todos los picornavirus. Esta región se pliega para formar una estructura secundaria altamente ordenada que contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que dirige el inicio de la traducción en cualquiera de los dos codones AUG en posiciones 735-737 y 741-743. El

codón AUG inicia un único marco de lectura abierto (ORF) de 6.681 nucleótidos, que se divide en tres partes (P1, P2 y P3). Este ORF se traduce en una poliproteína de 2.227 aminoácidos ² que es procesada por la proteasa viral en proteínas estructurales y no estructurales. Cerca del extremo 5' de la secuencia que codifica para RdRp se encuentra un elemento de replicación en cis (cre) que actúa como molde durante la iniciación en la síntesis de hebras de RNA positivas. El genoma del VHA termina con una pequeña región no codificante 3' de 63 nucleótidos seguida de una cola de poliA ²⁰.

A pesar de presentar una organización característica de picornavirus, el genoma del VHA posee algunas características que lo hacen único. En primer lugar, su IRES es diferente al del resto, constituye el modelo del tipo III, y es altamente ineficiente en la dirección de la traducción. En segundo lugar, su estructura cre difiere de la del resto por su tamaño relativamente largo y la longitud de su lazo superior. En tercer lugar, el VHA codifica para una sola proteasa, mientras que el resto de picornavirus cuentan con proteasas virales adicionales, como las encargadas de la escisión del factor celular eIF4G, necesario para la traducción de proteínas celulares. Cuando esta escisión tiene lugar, se produce el llamado shut-off o apagado de las proteínas celulares, en el que la maquinaria celular queda disponible casi exclusivamente para la síntesis de proteínas virales ¹⁹. El VHA precisa del factor eIF4G intacto para iniciar la traducción ^{21,22}, y carece de proteasas capaces de su escisión, por lo que es incapaz de inducir el apagado de proteínas celulares. Esto constituye una desventaja que el VHA compensa variando su composición de codones respecto a los del hospedador: los codones muy abundantes en el genoma celular son escasos en el virus, los intermedios en el hospedador son abundantes en el genoma del VHA y los codones poco frecuentes en el hospedador son también raros en el virus. Esta peculiar composición no se observa en el resto de picornavirus, y juega un papel crucial en la cinética de la traducción de la región que codifica para la cápside y en el plegamiento de la misma, lo cual resulta en una lenta producción de cápsides altamente cohesionadas ¹⁹. Esta estabilidad de la cápside es fundamental en virus que se transmiten vía fecal-oral ²³. Su particular composición del genoma se ve reflejada también en el bajo contenido en GC y GC3, siendo del 37% y 26% respectivamente, cuando teóricamente debería ser del 50% ^{23,24}. Además, presenta una baja proporción del dinucleótido CpG. Los receptores tipo Toll (TLRs) del hospedador reconocen patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs), como son los dinucleótidos CpG, desencadenando un amplio abanico de repuestas de la inmunidad innata. El bajo contenido en CpG del VHA constituye un mecanismo para evadir la defensa antiviral del hospedador ¹⁹.

Las distintas regiones del genoma presentan diferencias en cuanto a su variabilidad. VP3 C-terminal está relativamente conservada, mientras que la unión VP1/2A es más variable y

puede ser utilizada para distinguir una cepa de otra. En base a la variabilidad de esta región se establecen los diferentes genotipos. VP1 N-terminal presenta una variabilidad intermedia entre las dos regiones citadas ²⁵.

2.3.1. Diversidad genética

En 1992, un primer estudio de Robertson ²⁶ analizó 152 cepas recogidas a partir de muestras clínicas de todo el mundo. Dadas las similitudes a nivel de genoma entre poliovirus y VHA, las diferentes cepas de VHA se clasificaron comparando la unión VP1/2A, criterio que había sido utilizado anteriormente para la clasificación de cepas de poliovirus ²⁷. El análisis de las variaciones en un fragmento de 168 nucleótidos perteneciente a esa región dio como resultado siete genotipos del virus. Un genotipo se definía como un grupo de virus que compartían >85% de identidad en la secuencia estudiada. Las cepas procedentes de muestrashumanas se agrupaban en los genotipos I, II, III y IV, mientras que los genotipos V, VI y VII incluían cepas procedentes de primates no humanos. El genotipo I abarcaba el 80% de las cepas humanas estudiadas, y se subdividía en dos subgenotipos (IA y IB), que diferían un 7,5% en la posición de sus bases. El subgenotipo IA comprendía el 67% de las cepas estudiadas y presentaba una distribución mundial. El resto de cepas humanas se agrupaban en su mayoría en el genotipo III, el cual se subdividió también en los subgenotipos IIIA y IIIB. Sin embargo, en el trabajo de Robertson, áreas geográficas hiperendémicas de hepatitis A se encontraban infrarepresentadas. Además, el método tradicional de genotipado no detectaba variantes antigénicas del virus aisladas posteriormente. Con el objetivo de profundizar en esta variabilidad genética, Costa-Mattioli llevó a cabo estudios de filogenia analizando la región VP1 completa, constituida por 900 nucleótidos ²⁵. Este nuevo análisis filogenético reveló la existencia de cinco grupos genotípicos distintos, todos ellos basados en altos niveles de *bootstrap*. La menor variación observada se daba entre los genotipos II y VII propuestos inicialmente por Robertson, por lo que se propuso una nueva clasificación en la que estos últimos fueron considerados el mismo genotipo o dos subgenotipos del mismo. Finalmente, el denominado inicialmente genotipo VII fue reclasificado dentro del genotipo II como subgenotipo IIB ²⁸.

2.4. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

En relación al inusual ciclo de vida del VHA, es importante señalar que existen dos formas infectivas del virus: los viriones desnudos, no envueltos, que son eliminados en las heces de los individuos infectados, siendo los responsables de la transmisión de un hospedador a otro; y los viriones cuasi envueltos (eHAV), secretados de forma no lítica desde las células infectadas como pequeñas vesículas extracelulares, responsables de la diseminación en el hospedador. Los viriones desnudos son pequeños, con un diámetro de unos 27 nm, y poseen

una cápside proteica icosaédrica que empaqueta el genoma de ARN ²⁹. Son muy estables, lo cual facilita la diseminación epidémica y la transmisión a hospedadores naive ³⁰. Los viriones cuasi envueltos (eHAV) se encuentran en la sangre de los individuos infectados y en el sobrenadante de los cultivos celulares. Comparten características con los virus envueltos convencionales, ya que están compuestos por la cápside que contiene el ARN, rodeada de una vesícula membranosa. Ésta carece de proteínas virales en su superficie, lo cual protege al virión de ser neutralizado por los anticuerpos del individuo ³¹. Esto constituye una característica inusual propia del VHA descubierta recientemente, y que parece ocupar un papel destacado en la transmisión célula-célula y en la diseminación hepática del virus ^{1,19}.

2.5. SEROTIPOS DEL VHA

A pesar de la heterogenicidad a nivel de nucleótidos entre las diferentes cepas, todos los hepatovirus pertenecen a un único serotipo debido a que la estructura antigénica de la cápside está altamente conservada ¹. Los individuos infectados por el virus están protegidos de la reinfección independientemente del origen geográfico de la cepa ¹⁷. No ocurriría lo mismo en cepas recuperadas de primates no humanos (genotipos IV, V y VI), en las que podría haber diferencias antigénicas significativas, pues se han encontrado sustituciones aminoacídicas en VP1 y VP3 similares a las encontradas en mutantes que escapaban a la neutralización generados en cultivo celular a partir de cepas humanas del virus ³².

La estructura antigénica del virus es relativamente simple. El sitio dominante de neutralización está compuesto por un número restringido de epítomos solapantes en VP1 y VP3, posiblemente con una menor contribución de VP2, que se combinan formando un único dominio antigénico al que se dirigen los anticuerpos neutralizantes frente al virus ^{2,17}.

Las restricciones a nivel estructural de la cápside parecen limitar la emergencia de nuevos serotipos del VHA. Sin embargo, a pesar de su estabilidad antigénica, el VHA se presenta, tanto *in vivo* como en cultivo celular, en forma de variantes no idénticas genéticamente relacionadas denominadas cuasiespecies³³. La replicación del VHA tiene lugar mayoritariamente durante el periodo de incubación de la enfermedad. Una baja concentración de anticuerpos podría favorecer la selección de mutantes de escape a la vacuna. La reducción del número de dosis de la vacuna frente al VHA podría tener consecuencias en la evolución del mismo, facilitando la emergencia de variantes antigénicas. En un estudio llevado a cabo en Barcelona, se detectaron casos en pacientes HSH vacunados, lo cual abre la puerta al estudio de una posible evolución del VHA bajo presión inmunológica³⁴. Los títulos de IgM detectados en pacientes vacunados y no vacunados fueron similares. Sin embargo, aunque no se conoce el mecanismo por el cual estas cepas escapan a la vacuna, la alta variabilidad observada entre las cepas procedentes de pacientes HSH podría haberse visto favorecida por

el incumplimiento de las pautas de vacunación, o por una respuesta inmunitaria deficiente frente a la vacuna, como ocurre en pacientes VIH positivos ³⁵. La diversidad genética y antigénica de estos aislados hace pensar en la posibilidad de que puedan emerger nuevos serotipos ³⁶. El análisis mediante secuenciación masiva de muestras de pacientes infectados vacunados frente a no vacunados mostró una variabilidad aminoacídica entre cuasiespecies extremadamente baja. A pesar de este elevado grado de conservación, algunas regiones presentaron claras diferencias en cuanto a su variabilidad entre vacunados y no vacunados. La región VP3 mostraba mayor variabilidad en no vacunados, mientras que VP1 presentó más variabilidad en los pacientes vacunados, lo cual apunta a una posible selección positiva de estas variantes bajo presión inmunológica.

Recientemente se han encontrado en focas ¹² y pequeños mamíferos ³⁷ varios virus estrechamente relacionados con el VHA, que comparten con él características biológicas únicas, lo cual indica la posibilidad de la aparición de nuevos serotipos a partir de un origen zoonótico.

2.6. CICLO VITAL DEL VHA

2.6.1. Entrada en la célula

El ciclo vital del VHA se inicia con la ingestión de partículas desnudas del virus. El VHA infecta el hepatocito, pero no se conoce cómo los viriones desnudos alcanzan el hígado desde el intestino. Existen dos hipótesis sobre cómo el VHA atraviesa la barrera intestinal hacia la sangre: replicándose en el epitelio intestinal, o mediante transcitosis a través de las células M intestinales. Para este último mecanismo, los viriones desnudos cubiertos de moléculas de IgA sufrirían una transcitosis inversa mediada por la unión entre el receptor polimérico de inmunoglobulinas y la IgA. Esta última contribuiría también a la entrada del virus al hepatocito mediante la unión al receptor de la asialoglicoproteína. Sin embargo, de ser cierto este modelo, seguiría sin conocerse el origen de la IgA anti-VHA específica en pacientes inmunológicamente *naive* ¹⁹.

Los eVHA carecen de proteínas virales de superficie, y se desconoce el mecanismo por el cual penetran en las células. Estudios iniciales apuntaban a que TIM-1 (HAVCR1), una glicoproteína de membrana humana cuya función natural se desconoce, podría actuar como receptor del VHA, al igual que ocurre en muchos virus envueltos convencionales ^{38,39}. Sin embargo, trabajos posteriores con cristalografía de rayos X mostraron la inexistencia de un “cañón” que rodee el eje quintuple de simetría en el que encajaría el receptor ²⁹. Das y colaboradores revisaron el papel de TIM1 en la entrada del virus a las células, demostrando

que este no era un receptor esencial para la entrada del VHA en células, ni tampoco para la replicación o la patogenicidad, aunque sí contribuiría a la diseminación de eHAV⁴⁰.

Un estudio reciente demuestra que tanto los eVHA como los viriones desnudos entran en la célula mediante una endocitosis dependiente de clatrina y dinamina, facilitada por la integrina $\beta 1$, y son transportados en endosomas tempranos y tardíos⁴¹. Sin embargo, existen diferencias en el proceso de ambos fenotipos. Los viriones desnudos penetran de forma rápida y son transportados hasta endosomas tardíos, donde se iniciarían la decapsidación. Los eVHA penetran de forma más lenta, generándose un compartimento endosómico en el que la cápside está sujeta a la neutralización por anticuerpos durante un periodo de unas seis a ocho horas. Posteriormente son transportados hasta los lisosomas donde su pseudoenvuelta es degradada enzimáticamente en un proceso dependiente de la proteína accesoria de ESCRT, ALIX⁴¹. Los gangliósidos actuarían como receptores esenciales tanto en los endosomas tardíos como en los lisosomas, favoreciendo la liberación de las cápsides virales al citoplasma donde podría producirse la decapsidación por un mecanismo que aún se desconoce⁴².

Se ha descrito otra vía de transmisión célula-célula en el VHA, basada en la transferencia de genomas de ARN sin cápside en exosomas, mediada por los receptores lipídicos HAVCR1 y NPC1⁴³.

El fallo en cualquiera de los pasos del ciclo infeccioso puede llevar a que el proceso sea abortado. Por ello, contar con diversas vías de entrada puede ser muy ventajoso para garantizar la replicación y la transmisión, especialmente en el VHA cuya traducción es muy lenta¹⁹.

2.6.2. Proteínas y procesamiento virales

El ciclo de replicación comienza con la traducción de la poliproteína, que ocurre bajo el control del IRES en 5'UTR. La escisión de la poliproteína por la proteasa 3C se produce de forma cotraduccional. Se generan inicialmente tres polipéptidos intermedios, P1, P2 y P3, cuyo procesamiento dará lugar a 10 proteínas virales maduras. A partir de P1 se generarán cuatro proteínas estructurales que forman la cápside, VP1pX, VP2, VP3 y VP4 (numeradas atendiendo a su peso molecular)¹. Puede detectarse también una proteína VP0, que es la precursora de VP4 y VP2, sobre todo a partir de cultivos celulares en los que se pueden acumular viriones inmaduros (proviriones) en grandes cantidades². Las partículas virales presentes en los exosomas son inmaduras, y contienen la proteína VP1-pX, mientras que los viriones desnudos presentes en las heces contienen la proteína procesada VP1³¹. P2 y P3 son procesados en seis proteínas no estructurales esenciales para la amplificación del genoma:

2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{pro} (una cistein proteasa), y 3D^{pol} (una RNA polimerasa RNA dependiente)
1,2.

Las tres grandes proteínas de la cápside, VP1, VP2 y VP3, se pliegan adoptando una conformación de barril β , con los extremos N-terminal hacia el interior y los residuos C-terminal orientados al exterior. La proteína VP4, más pequeña, se localiza en el interior y no se visualiza correctamente en los modelos cristalográficos. Esto puede ser debido a que es flexible, o porque contacta con la única molécula de RNA genómico que no posee simetría icosaédrica estricta. Cinco copias de la proteína estructural VP1 rodean el eje quintuple de la estructura icosaédrica. Tres copias de VP2 y VP3 se alternan en los ejes triples, y dos copias de VP2 se apoyan en los ejes dobles ⁴⁴.

La conformación adoptada por VP2 en el VHA es significativamente diferente a la de otros picornavirus, como el virus de la polio. Su plegamiento es similar al observado en virus primitivos picornavirus-like que infectan insectos. Esta característica podría contribuir a la elevada resistencia del VHA frente al calor y a la inactivación por ácido ^{45,46}.

La proteasa 3C (3C^{pro}) es la única proteinasa viral ¹. Desempeña una acción dual fundamental en el ciclo vital del VHA. Con la excepción de la escisión entre VP4-VP2 y la escisión tardía en VP1pX detectada en las partículas desnudas del VHA, todo procesamiento de la poliproteína es mediado por 3C^{pro} o sus precursores. Además, se une a los elementos reguladores de la estructura 5'-UTR, controlando la síntesis del ARN viral ^{1,47}

2.6.3. Síntesis de ARN viral

El mecanismo por el cual se produce la síntesis de ARN en el VHA no ha sido investigado en profundidad. Sin embargo, se cree que podría ocurrir de manera similar a la de picornavirus mejor estudiados. La replicación del RNA tiene lugar de manera lenta, y como en todos los virus RNA de polaridad positiva, dentro del citoplasma, en estrecha asociación con las membranas. La sobreexpresión de 2BC o 2C lleva a extensos reordenamientos de las membranas intracelulares derivadas del retículo endoplásmico ⁴⁸, lo cual parece reflejar el rol de estas proteínas no estructurales en establecer un microambiente membranoso óptimo para la síntesis de RNA. Ésta ocurre probablemente dentro de una red tubo-vesicular que ha sido observada muy próxima al retículo endoplásmico mediante microscopía electrónica ⁴⁹. La hebra de polaridad positiva se transcribe a una hebra negativa, dando como resultado una molécula de ARN bicatenario que sirve como molde para la formación de múltiples hebras de sentido positivo nuevas en una serie de reacciones catalizadas por 3D^{pol}. Estudios en poliovirus, pertenecientes también a la familia *Picornaviridae*, sugieren que la síntesis de ARN se produce gracias a una forma uridilada de VPg (VPg-pUpU) producida en una

reacción en la que *cre* actúa como cebador ^{20,50}. La replicación tiene lugar de forma no conservativa, en la que las hebras positivas nuevas son mucho más numerosas que las hebras negativas¹. Trabajos más recientes han demostrado que componentes celulares del hospedador, como los transportadores ABC o las proteínas de unión FK506, tienen un papel importante en la replicación del virus ⁵¹. Dada la relevancia en la patogenia del VHA, cabe destacar que la replicación no es citopática, y la salida de los viriones nuevos de la célula se produce de forma no lítica ¹.

2.6.4. Ensamblaje

El ensamblaje del VHA tiene lugar en varios pasos. La acción de la proteasa 3C da lugar a los tres precursores proteicos relacionados con la cápside, VP0, VP3 y VP1pX (también denominado VP1-P2). Estos constituyen un monómero, y se ensamblan después en subunidades pentaméricas. El papel del precursor VP1-2A en el ensamblaje es específico del VHA, y se ha demostrado que la extensión 2A es esencial para el procesamiento y ensamblaje adecuados de la subunidad pentamérica. A continuación, 12 copias del pentámero se asocian, bien con ARN viral, formando proviriones; o sin ARN viral, para formar cápsides vacías o procápsides. La unión de las 12 copias del pentámero es un proceso dependiente de VP4 ¹. Tras el ensamblaje, 2A se elimina de VP1 por proteasas celulares, y en la fase final de la maduración VP0 se escinde para dar lugar a VP2 y VP4. La secuencia de eventos que llevan al empaquetamiento del RNA no se conoce bien, pero la escisión de VP0 no se produce hasta que el ARN vírico se encuentra en la partícula y, por tanto, las procápsides son incapaces de escindir VP0. Sin embargo, estas procápsides del VHA son bastante estables y parecen tener la misma estructura antigénica que los viriones maduros ².

2.6.5. Salida de la célula

Los viriones cuasi-envueltos (eVHA) son liberados de manera no lítica desde las células infectadas en forma de pequeñas vesículas extracelulares. La membrana proporcionada por la célula del hospedador protege a la cápside de los anticuerpos neutralizantes. Atendiendo a su tamaño y densidad, estas vesículas de eVHA se parecen a los exosomas, pequeñas vesículas extracelulares implicadas en la comunicación intercelular. Las cápsides de VHA son captadas por complejos endosomales necesarios para el transporte (ESCRT) mediante la interacción de la proteína VP2 de la cápside viral con ALIX (PDCD6IP), una proteína accesoria de ESCRT-III ⁵². Se produce la evolución a endosomas tardíos, que constituyen el cuerpo multivesicular (MVB). El MVB, con las vesículas intraluminales que contienen las cápsides, se aproximan a la membrana plasmática, donde la fusión de la membrana del MVB con la membrana plasmática da como resultado la liberación de las vesículas intraluminales en forma de eHAV ¹.

El hepatocito es el único tipo celular conocido en el que se produce la replicación del VHA *in vivo*. Los hepatocitos son células muy polarizadas de origen epitelial con diferentes membranas apical y basolateral. La membrana basolateral está en contacto con el espacio de Disse, lugar de intercambio entre el hepatocito y la sangre que circula por los sinusoides hepáticos; mientras que la membrana apical, más pequeña, limita con el lumen de los canalículos biliares. Los ácidos biliares son secretados por el hepatocito desde la membrana apical, y circulan por los canalículos hasta los conductos biliares mayores para acabar alcanzando el intestino. Las estrechas uniones establecidas entre los hepatocitos colindantes forman una barrera entre sangre y bilis que previene de la difusión de los ácidos biliares y otros solutos mayores ³⁰.

La liberación de eVHA se produce tanto desde la membrana basolateral hacia el sinusoides hepático, como desde la membrana apical hacia el tracto biliar. Los eVHA liberados a lo largo de la membrana apical se desprenden de sus membranas por la acción detergente de las sales biliares durante su paso por los conductos biliares, y son eliminados en las heces en forma de viriones desnudos ¹.

2.7. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN

El VHA penetra por la vía fecal-oral. El VHA es altamente resistente, y pueden encontrarse títulos elevados de microorganismos infectivos en el tránsito a través del estómago y el intestino a pesar de las duras condiciones, como el pH ácido gástrico ^{29,53}. No se conoce con certeza si se replica en primer lugar en el tracto gastrointestinal. En última instancia, el virus es enviado al hígado, se replica en el hepatocito y se secreta por los conductos biliares en la bilis, volviendo al tracto gastrointestinal. Finalmente, el VHA se excreta en las heces, donde su concentración es máxima, o se transfiere de vuelta al hígado mediante un ciclo enterohepático hasta su neutralización ⁵⁴. Antes de la aparición de los síntomas, se producen olas de viremia y eliminación fecal de gran cantidad de virus. El mayor riesgo de transmisión se produce durante la fase prodrómica, previa a los síntomas y las manifestaciones bioquímicas, justo antes de que se produzca el daño hepático. Las heces son la fuente primaria de transmisión del VHA debido a su elevada carga viral ⁵⁴. La infectividad de las heces abarca un periodo desde 21 días antes a 8 días después del inicio de la ictericia. Las mayores concentraciones se dan en el periodo de dos semanas antes de la aparición de la ictericia o de la elevación de las enzimas hepáticas, seguido de un rápido descenso tras estos cambios ¹⁰. Las concentraciones de virus en suero son dos o tres unidades \log_{10} menores que en heces ⁵⁵. El virus también se elimina en saliva, pero a concentraciones más bajas ⁵⁶.

Transcurrido el periodo de incubación, de 15 a 50 días (media de 30 días), los pacientes desarrollan síntomas de hepatitis aguda, con elevados niveles de aspartato y alanino aminotransferasas (AST y ALT). Coincidiendo con las manifestaciones clínicas, los anticuerpos anti-VHA IgM y, posteriormente, IgG aparecen en suero y en saliva, acompañados de una marcada reducción de la carga del virus en sangre y heces ⁵⁴. Aunque los anticuerpos anti-VHA IgM son detectables hasta 6 meses después de la infección, la IgG es la que persiste, confiriendo inmunidad de por vida ⁵⁷.

La eliminación de VHA puede ser más prolongada en lactantes y niños que en adultos. Se ha detectado ARN del VHA en heces de recién nacidos hasta 6 meses tras la infección. En niños mayores y adultos, se ha demostrado excreción de virus en heces entre 1 y 3 meses tras la enfermedad clínica ^{58,59}. Aunque no se produzca excreción crónica, sí se ha detectado virus en heces en recidivas de la enfermedad ⁶⁰.

2.8. PATOGENIA

La patogenia del VHA y los mecanismos que subyacen al daño hepático no son del todo conocidos. El VHA no produce efecto citopático directo en los cultivos celulares, por lo que parece poco probable que la citólisis viral sea el mecanismo responsable del daño hepático durante la infección por el VHA. Además, la carga viral máxima en heces suele preceder a la aparición de la enfermedad, por tanto, la replicación viral por sí misma no parece causar daño celular ¹. Los hallazgos histológicos en biopsias hepáticas de pacientes y animales de experimentación demuestran una fuerte relación temporal entre el infiltrado de células del sistema inmune y la enfermedad, lo cual sugiere que los mecanismos mediados por estas células son determinantes para el daño hepático. Los linfocitos T citotóxicos específicos del virus han sido considerados de manera general los principales implicados en la inmunopatología del VHA. Sin embargo, la evidencia reciente sugiere la implicación de mecanismos adicionales ⁶¹.

Linfocitos T citotóxicos virus-específicos

Durante la infección por el VHA se produce una activación de los linfocitos T CD8+, generando linfocitos T CD8+ específicos del virus. Estos se diferencian en linfocitos T citotóxicos efectores que eliminan de manera específica las células infectadas por el virus, contribuyendo al daño hepático en la hepatitis A aguda. La mayor actividad citolítica parece producirse durante la fase temprana de la convalecencia. Sin embargo, es posible que una porción significativa de células citolíticas se acumule en el hígado durante el pico de enfermedad ⁶².

Linfocitos T no específicos del virus

En pacientes con hepatitis A, niveles elevados de IL-15 en suero activan linfocitos T CD8+ no específicos del virus, los cuales son capaces de lisar tanto los hepatocitos infectados como los no infectados.

Factores genéticos del hospedador implicados en la severidad de la infección.

Diversos factores genéticos del hospedador han mostrado relación con la severidad de la hepatitis A. Se han detectado niveles elevados de IL-18 en macrófagos y hepatocitos de pacientes con deficiencia en la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) con hepatitis fulminante. Debido a la ausencia de una actividad neutralizante frente a IL-18, ésta activa de forma excesiva e incontrolada a las células NK, que median en la lisis de hepatocitos tanto infectados como no infectados⁶³. Un estudio realizado en niños con hepatitis A severa identificó una inserción de 6 aminoácidos en TIM-1 como un factor genético asociado a la severidad de la hepatitis A. En pacientes con hepatitis severa las células NKT parecen estar activadas por el VHA mediante una vía dependiente de TIM-1. Una forma más larga de TIM-1 presentaría una mayor afinidad de unión a las partículas de VHA, por tanto, las células NKT que portan esta forma de TIM-1 tendrían una mayor actividad citotóxica sobre las células infectadas por VHA⁶⁴.

Papel emergente de la apoptosis intrínseca

Estudios llevados a cabo en modelos murinos^{30,65}. La señalización mediada por proteínas de señalización antiviral mitocondriales (MAVS) da como resultado una apoptosis de los hepatocitos infectados por VHA. Estos datos implican que la escisión de MAVS por la proteasa del VHA no solo favorece la replicación del virus, sino que también protege frente al daño hepático. Sin embargo, son necesarios más estudios para afirmar que estas observaciones ocurren en la infección por el VHA en humanos⁶¹.

Factores del virus

Probablemente tengan un papel modelador en el proceso de la enfermedad. Por ejemplo, los intermediarios de la proteasa del virus, 3ABC y 3CD, se adhieren a los factores celulares MAVS y TRIF respectivamente, amortiguando la respuesta innata a la infección⁶¹. El VHA circula en sangre en forma de viriones cuasi-envueltos que no son reconocidos por los anticuerpos circulantes, pero pueden activar células dendríticas que producen interferón tipo 1⁶⁶.

2.9. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

2.9.1. Signos y síntomas de la hepatitis aguda

Las manifestaciones clínicas de la hepatitis A van desde una infección asintomática al fallo hepático agudo. La hepatitis A no progresa a hepatitis crónica. El desarrollo de una hepatitis sintomática está asociado a la edad del paciente. Relativamente pocos niños menores de 6 años (<30%) manifiestan síntomas de hepatitis, mientras que la mayoría de adultos (>70%) desarrollan síntomas que persisten de 2 a 8 semanas ⁶⁷. La aparición de síntomas es a menudo abrupta, con fiebre (18-75%), malestar (52-91%), náuseas o vómitos (26-87%), molestias abdominales (37%-65%), seguidos de orinas oscuras (28-94%) e ictericia. El prurito, la diarrea, las artralgias o el rash cutáneo se desarrollan con menor frecuencia. Cuando el paciente precisa de atención médica, por lo general la fiebre ha desaparecido. La exploración física revela con frecuencia hepatomegalia (78%) e ictericia (40%-80%)⁶⁸.

2.9.2. Hallazgos analíticos y radiológicos

La analítica de pacientes con hepatitis A suele mostrar valores elevados de aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), bilirrubina total (BT), fosfatasa alcalina y la gammaglutamil transpeptidasa (GGT) ⁶⁹, pero únicamente la determinación de ALT es específica de hepatitis ⁷⁰.

El pico medio de bilirrubina total suele situarse entre 7 y 13 mg/dL, y el de fosfatasa alcalina entre 319 y 335 IU/L ⁶⁹. Las concentraciones de ALT y AST constituyen una herramienta cuantitativa para evaluar el daño hepático durante la infección aguda. Las aminotransferasas suelen alcanzar niveles a menudo mayores de 500 UI/L, produciéndose un pico tras la fase prodrómica. Los valores de ALT son, por lo general, significativamente mayores a los de AST. En la mayoría de los casos, el ratio ALT/AST es >1,4 ⁷⁰. En ocasiones se observan niveles muy elevados de ALT (entorno a 10.000 IU/L), pero esto no constituye un factor de peor pronóstico ^{71,72}. La albúmina es la principal proteína secretora sintetizada por el hígado y es fundamental en la regulación osmótica, por lo tanto, puede ser de utilidad a la hora de evaluar el pronóstico de la enfermedad ⁷³.

El diagnóstico de laboratorio debe incluir un hemograma completo y un estudio de la coagulación. Un tiempo de protrombina (PT) alargado (PT<40%) y altos niveles de bilirrubina en ausencia de hemólisis son indicativos de hepatitis severa, existiendo un riesgo potencial de fallo hepático agudo ⁵⁴. La resolución de las anomalías analíticas suele ocurrir de una a seis semanas después del inicio de los síntomas ⁷⁴.

Los hallazgos radiológicos de la hepatitis A incluyen hepatomegalia, engrosamiento de la pared de la vesícula biliar mayor de 3 mm (80%) con heterogeneidad arterial, edema periportal y aumento de tamaño de ganglios linfáticos perihepáticos (>7mm de diámetro) ⁷⁵.

2.9.3. Complicaciones de la hepatitis A aguda

La infección por el VHA es autolimitada y no progresa a hepatitis crónica. Sin embargo, entre un 10% y un 20% de pacientes desarrollan hepatitis recidivante o colestasis prolongada durante más de 6 meses ⁵⁴.

Hasta un 20% de pacientes con hepatitis A aguda presentan recaídas, rara vez en forma de enfermedad polifásica (múltiples recaídas). Tras una fase de remisión, con una resolución parcial o completa de las manifestaciones clínicas y bioquímicas, se produce una recaída en un corto periodo de tiempo (por lo general inferior a tres semanas). La recaída suele ser más leve a nivel clínico que la fase inicial, con alteraciones variables en la función hepática y una mayor afectación de parámetros relacionados con la colestasis. Con frecuencia, esta fase se acompaña de manifestaciones inmunológicas, incluyendo púrpura, nefritis y artralgias. El factor reumatoide suele detectarse en la analítica, al igual que falsos positivos en la determinación del virus de la hepatitis C mediante enzimoanálisis (EIA). La viremia y la eliminación fecal del virus vuelven a aparecer durante la recidiva. El curso clínico de las recaídas suele ser benigno salvo raras excepciones. El tratamiento de estos casos con corticoesteroides contribuye a la mejoría clínica ⁷⁶.

Colestasis prolongada

La colestasis prolongada se define como una elevación de la bilirrubina total por encima de 5 mg/dL que se prolonga durante más de cuatro semanas. Se observa en el 5%-7% de pacientes, y se acompaña de elevación prolongada de la fosfatasa alcalina y de la gamma glutamil transpeptidasa (GGT), prurito, pérdida de peso y fatiga ¹. En un estudio realizado por Jung y colaboradores en 595 pacientes con diagnóstico de hepatitis A, la colestasis prolongada se asociaba a pacientes coinfectados por el virus de la hepatitis B, TP prolongado, y valores mayores de bilirrubina total al ingreso. La estancia hospitalaria de estos pacientes fue significativamente más larga, con una media de 70 días. A pesar de esta complicación, todos los pacientes evolucionaron favorablemente ⁷⁷.

Fallo hepático

El fallo hepático agudo se produce en el 0,015-0,5% de los pacientes con hepatitis A ^{1,78}. En un 70% de los casos se resuelve de forma espontánea, mientras que el 30% restante precisa trasplante hepático ⁷⁹. En un estudio retrospectivo realizado en Taiwán se analizaron 3990 casos de hepatitis A que precisaron ingreso hospitalario. Los factores asociados al fallo

hepático en estos pacientes fueron el sexo masculino, edad mayor de 40 años, cirrosis y estancias prolongadas en el hospital ⁸⁰. En 1988, tuvo lugar en Shangai un brote de hepatitis A que afectó a más de 300.000 personas. Los pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis B presentaban con mayor frecuencia una enfermedad grave y elevadas tasas de mortalidad en caso de infección por VHA. La coinfección con otros virus, como el VIH, VHB, VHC, VHE o el dengue puede afectar al curso de la enfermedad y constituye un factor de riesgo para desarrollar fallo hepático agudo en el contexto de una hepatitis A ⁸¹. En un estudio realizado en Argentina, la enfermedad hepática grave inducida por el VHA se asociaba con una inserción de 6 aminoácidos (157insMTTTPV) en el gen TIM1/HAOCR1, que codifica para un receptor implicado en la entrada de eHAV en la célula ⁶⁴.

Estudios acerca de la evolución del fallo hepático agudo relacionado con la hepatitis A muestran que el 55-57% de los pacientes se recuperan espontáneamente, el 31-38% se someten a trasplante hepático, y el 6-14% fallecen sin trasplante. Se ha propuesto un modelo para predecir la necesidad de trasplante o el riesgo de muerte basado en niveles de ALT <2600 UI/L, creatinina >2 mg/dL, necesidad de intubación y uso de vasopresores ⁸². El trabajo de Kim y col. encontró que el grado de encefalopatía hepática constituía un factor independiente para la recuperación espontánea, correlacionándose de forma negativa con la supervivencia ⁸³.

Hepatitis autoinmune

A pesar de que existen muy pocos casos reportados, la infección por el virus de la hepatitis A puede desencadenar una hepatitis autoinmune. Una vez transcurrida la fase aguda de la enfermedad, y habiéndose presentado de la forma habitual, tanto a nivel bioquímico como serológico, se produce una mejoría durante la cual las transaminasas pueden llegar a normalizarse. Varias semanas después, se produce una elevación de las mismas, y se detecta hipergammaglobulinemia y autoanticuerpos. No parece que el virus intervenga en este punto del proceso, ya que los anticuerpos IgM anti-VHA son negativos y los de tipo IgG son detectables ⁸⁴. En un caso de los publicados, se realizó una PCR de biopsia hepática con el objetivo de detectar ARN viral, siendo el resultado negativo ⁸⁵.

2.9.4. Manifestaciones extrahepáticas

El daño renal agudo, definido como valores de creatinina sérica >2 mg/dL o un incremento de al menos 1,5 veces el valor de base, se ha descrito en el 1,5-7,6% de los pacientes con hepatitis A ^{72,86}. Los mecanismos propuestos causantes del daño renal incluyen factores prerrenales asociados con anorexia, náuseas, vómitos, diarrea y fiebre. También se ha asociado a los efectos nefrotóxicos derivados de la hiperbilirrubinemia, nefritis mediada por

inmunocomplejos, nefritis intersticial y, de forma excepcional, hemólisis intravascular masiva⁸⁷. Kim y col. realizaron un estudio en casos de hepatitis A con o sin daño renal agudo. Niveles bajos de hematocrito, la existencia de una coagulopatía y una proteína C reactiva elevada al diagnóstico, al igual que picos mayores de bilirrubina durante el curso de la enfermedad, constituían factores asociados con el desarrollo de daño renal agudo en estos pacientes con hepatitis A no fulminante⁸⁸. En un trabajo posterior, Choi y col. encontraron relación entre el daño renal agudo y la hepatitis fulminante, la leucocitosis y la proteína C reactiva elevada en pacientes con hepatitis A, mientras que valores mayores de bilirrubina total, leucocitosis y PCR elevada fueron considerados factores de riesgo en los casos de hepatitis A no fulminante⁸⁶. La evolución de los pacientes con hepatitis A no fulminante y daño renal agudo suele ser favorable, aunque entre el 10% y el 50% de los casos precisa de terapia de reemplazo renal^{72,88}.

Otras manifestaciones extrahepáticas descritas en pacientes con hepatitis A incluyen colecistitis, pancreatitis, derrame pleural o pericárdico, hemólisis, hemofagocitosis, aplasia pura de células rojas, artritis reactiva aguda, rash cutáneo, y manifestaciones neurológicas, como mononeuritis, síndrome de Guillain-Barré y mielitis transversa⁸⁷.

La colecistitis y la pancreatitis agudas pueden complicar el curso clínico de la hepatitis A. No se conoce con certeza la patogenia de la colecistitis en este contexto. Se ha detectado antígeno de VHA en el epitelio del conducto biliar y en la pared de la vesícula biliar de un paciente, lo cual sugiere un efecto directo de la infección más que un mecanismo secundario⁸⁹. En muchos casos, los síntomas aparecen de forma transitoria y se produce una recuperación espontánea⁸⁷. La pancreatitis es más frecuente en pacientes con hepatitis A fulminante, y rara vez se produce en enfermedad no fulminante⁵.

La hemólisis puede desencadenarse a partir de una hepatitis viral, incluyendo hepatitis A, sobre todo en pacientes con déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. También puede ser de naturaleza autoinmune, relacionada con la producción de anticuerpos frente a la isomerasa trifosfato, y puede presentarse de forma severa⁵.

Ocasionalmente, pueden aparecer manifestaciones relacionadas con la circulación de inmunocomplejos, como la vasculitis cutánea, la artritis y la crioglobulinemia, pudiendo estar implicadas tanto la IgG como la IgM. Los síntomas se resuelven de forma espontánea con la resolución de la hepatitis A⁵.

No se conoce con certeza el mecanismo responsable de las manifestaciones neurológicas secundarias a la hepatitis A. La ausencia de VHA en el líquido cefalorraquídeo de pacientes

con mielitis transversa, unido a la buena respuesta al tratamiento con corticoides parece apuntar hacia una posible causa autoinmune ⁹⁰.

2.10. DIAGNÓSTICO DE LA HEPATITIS A

La hepatitis A no puede distinguirse desde el punto de vista clínico de otras formas de hepatitis aguda, aunque el diagnóstico puede sospecharse en pacientes con síntomas típicos en el contexto de un brote ². Los signos y síntomas clínicos vienen acompañados de alteraciones analíticas como el aumento de las enzimas asociadas a citolisis y colestasis (AST, ALT, GGT, bilirrubina, fosfatasa alcalina) y alteraciones en la coagulación, acompañadas de determinados hallazgos radiológicos. Sin embargo, todo ello es inespecífico de la infección por el VHA, y el diagnóstico de certeza debe establecerse mediante serología ⁹¹.

2.10.1. Detección de anticuerpos

La IgM anti VHA ha sido utilizada como marcador primario de infección aguda, y los ensayos comerciales para su detección constituyen el principal método diagnóstico en el entorno clínico. Se trata fundamentalmente de anticuerpos específicos frente a las proteínas de la cápside ¹⁷. Suelen detectarse en una primera muestra de suero obtenida en la evaluación inicial del paciente. Sin embargo, las pruebas serológicas pueden ser inicialmente negativas en el 6-11% de los casos sintomáticos. La determinación debe repetirse transcurridos de 2 a 5 días en pacientes con sintomatología compatible con hepatitis A. La infección suele confirmarse en una segunda determinación ⁹². El valor predictivo positivo es del 88% ⁷⁰.

La IgM aumenta rápidamente transcurridas de 4 a 6 semanas tras la infección. En pacientes sintomáticos, se eleva en los 5 a 10 días antes de la aparición de síntomas, y disminuye después hasta niveles indetectables dentro de los 4-6 meses posteriores, persistiendo rara vez más de 12 meses ⁹¹.

No se recomienda testar a personas asintomáticas sin evidencia de hepatitis clínica o conocimiento de exposición a una fuente de VHA, ya que en este contexto las pruebas presentan un valor predictivo bajo y pueden dar lugar a falsos positivos ⁹³. También se han observado resultados falsamente positivos en pacientes con artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes ⁹⁴. Entre un 8% y un 20% de las personas vacunadas pueden presentar respuesta IgM detectable de forma transitoria ¹⁷. Aunque la detección de IgM anti-VHA en saliva puede ser de utilidad como test de screening en el contexto de un brote, la sensibilidad es menor que en suero ⁵⁶.

La IgG anti-VHA es detectable una semana después de la aparición de la IgM, alcanza niveles elevados durante la fase de convalecencia, y normalmente persiste de por vida. IgG e IgM anti-VHA pueden detectarse de forma simultánea transcurridas entre 1 y 2 semanas desde el inicio de los síntomas. La determinación de IgG es de utilidad en estudios de prevalencia de infección por el VHA, y a la hora de evaluar la respuesta a la vacunación ⁷⁰.

Los ensayos diseñados comercialmente para el diagnóstico serológico de la hepatitis A, detectan anticuerpos IgM anti-VHA, IgG anti-VHA y anticuerpos totales (IgG+IgM) anti VHA en muestras de plasma o suero. Existen métodos para la detección de IgM, IgG e IgA en saliva, y para la detección de IgG e IgM en orina; pero presentan menor sensibilidad que la determinación en suero, y son poco empleados en nuestro medio⁹⁵. Debido a su elevada sensibilidad y especificidad, las técnicas de quimioluminiscencia (CLIA) se han consolidado como las de mayor implantación. Existen disponibles numerosos kits comerciales de para la detección de IgM antiVHA específica. Los sistemas más utilizados en los Servicios de Microbiología hospitalarios son los comercializados por Abbott (ARCHITECT HAVAB-IGM), Siemens (anti-HAV IgM CLIA para ADVIA Centaur XP), Roche (Elecsys® Anti-HAV IgM), DiaSorin (Liaison® HAV IgM), y Ortho (Vitros ECi Anti-HAV IgM)⁹⁵. En el suero de los pacientes convalecientes se encuentran niveles bajos de anticuerpos frente a proteínas no estructurales, pero los intentos de usar este fenómeno para distinguir la respuesta de anticuerpos frente a la infección natural de la respuesta contra la vacunación no han proporcionado resultados homogéneos ².

2.10.2. Detección de antígenos virales

Se puede detectar el VHA o antígenos virales en las heces de pacientes entre 1 y 2 semanas antes de la aparición de los síntomas. Sin embargo, esta detección tiene un escaso papel en el diagnóstico clínico rutinario, pues estas pruebas no se encuentran ampliamente disponibles y la excreción del virus suele haber finalizado antes de que el paciente solicite atención médica ².

2.10.3. Diagnóstico molecular

La detección de ARN de VHA en suero mediante métodos moleculares puede realizarse técnicamente pero no suele emplearse para diagnóstico clínico ⁹⁶. El diagnóstico molecular puede estar basado en diferentes regiones del genoma del VHA. La región no codificante 5'-UTR es la más conservada, y se utiliza para detectar el genoma viral; mientras que VP1, VP3 y VP1/2A se emplean tanto en la detección de ARN como en el estudio de la variabilidad genética del virus ⁷⁰.

En la actualidad existen comercializadas plataformas de PCR a tiempo real, que presentan elevada sensibilidad y especificidad, como RealStar® HAV RT-PCR kit de Altona Diagnostics (Hamburgo, Alemania). Éstas pueden emplearse en muestras clínicas, pero están siendo utilizadas también para detectar el virus en alimentos y muestras ambientales ⁹⁷. En casos en los que se precise de una mayor sensibilidad, puede realizarse una variante de la PCR conocida como nested PCR o PCR anidada, que utiliza dos pares de cebadores, obteniéndose un mayor rendimiento ⁹⁶. La PCR y otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han sido utilizadas en laboratorios donde se precisa de herramientas muy sensibles para detectar la presencia del virus en las muestras. Es el caso de los estudios ambientales o de las muestras de plasma empleadas para la elaboración de derivados plasmáticos. Las técnicas de PCR permiten detectar partículas virales tanto defectivas como infecciosas. Por lo tanto, la detección de antígenos o ARN de VHA en suero, heces o saliva no significa que una persona infectada sea necesariamente infecciosa, y es probable que el periodo de infectividad sea más corto que el periodo durante el cual el ARN es detectable ². En pacientes inmunocompetentes, la viremia se detecta pocos días después de producirse la infección, antes de la aparición de anticuerpos, y persiste de 3 a 4 semanas ⁹⁸. El periodo de viremia puede prolongarse en pacientes inmunodeprimidos, y en aquellos coinfectados por el VIH ⁶⁹. La detección de ARN viral podría ser de utilidad en el diagnóstico temprano de la infección por VHA, especialmente durante el periodo ventana, en el contexto de brotes y en hepatitis de origen desconocido ⁷⁰.

La utilización de técnicas de PCR en muestras de heces tampoco se ha validado con fines diagnósticos, ya que este tipo de muestras contienen con frecuencia inhibidores de la amplificación, como sales biliares, productos de degradación de la hemoglobina y polisacáridos complejos, y pueden dar lugar a resultados falsamente negativos ².

2.11. INMUNIDAD

El VHA produce una infección relativamente sigilosa del hígado. Su habilidad para modular y evadir la respuesta del hospedador genera un desequilibrio que permite la expansión viral produciendo un daño hepatocelular limitado. Esto constituye un aspecto característico de la patogenia del virus y un nuevo paradigma en las interacciones virus-hospedador ^{19,99}.

Como ya se mencionó anteriormente, el bajo contenido CpG del genoma viral evita que se desencadenen una serie de mecanismos de la inmunidad innata. Además, la infección por VHA desencadena una respuesta muy limitada de IFN-1 ⁹⁹. Esto se debe a la escisión de las proteínas MAVS, TRIF y NEMO, implicadas en la síntesis de IFN, por las proteínas y precursores virales no estructurales 3ABC, 3CD y 3C¹⁰⁰⁻¹⁰³. El hecho de interferir en las cascadas de señalización de la inmunidad innata no solo repercute en la producción IFN, sino

que también limita el proceso inflamatorio del hígado, retrasa la respuesta de anticuerpos y ralentiza el aclaramiento viral ¹⁰⁰. HAVCR1 se localiza en la superficie de los linfocitos T reguladores, y su interacción con el VHA inhibe temporalmente su función ¹⁰⁴.

Por lo general, la respuesta de las células B en la infección por el VHA se encuentra retardada ⁹⁹. Esto se debe probablemente a que los antígenos del VHA están “secuestrados” en el interior de las células infectadas de forma no lítica, y únicamente son liberados cubiertos por membranas del hospedador en los viriones cuasi-envueltos ³¹. La IgM aparece de 5 a 10 días antes de la aparición de síntomas, y puede permanecer elevada de 3 a 12 meses tras la exposición ⁹¹. La IgG se produce una semana después de la aparición de la IgM y confiere actividad neutralizante frente a futuras exposiciones al VHA. La respuesta neutralizante de tipo IgG se vuelve rápidamente predominante y protege de por vida frente a la reinfección sintomática ¹⁰⁵. Estos anticuerpos neutralizantes reconocen un número pequeño de epítopos situados de forma próxima en las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, las cuales están altamente conservadas ^{29,106}. La duración de la IgG puede verse limitada en casos de inmunosupresión, como se demostró en pacientes con infección por VIH en los que no se detectaron anticuerpos frente al VHA varios años después de ser vacunados ¹⁰⁷.

Los anticuerpos anti-VHA de clase IgA se encuentran en heces durante la fase aguda de la enfermedad, y persisten durante varios meses. Sin embargo, no muestran actividad neutralizante ⁷⁰. Al parecer, la IgA podría actuar como carrier en el transporte del VHA al hígado, y este mecanismo estaría relacionado con los diferentes escenarios clínicos de la infección. Transcurridas varias semanas desde la infección, la IgA es capaz de promover de manera cíclica la circulación enterohepática del virus, dando como resultado reinfecciones endógenas del hígado. Esto podría contribuir a cuadros clínicos más prolongados o a recaídas en la enfermedad ¹⁰⁸.

Otro aspecto característico del VHA es su capacidad de evadir los mecanismos de aclaramiento sanguíneos. Algunas glicoproteínas de superficie de los eritrocitos se unen a patógenos, impidiendo que estos alcancen sus tejidos diana ¹⁰⁹. Los viriones desnudos se unen a la sialoglicoproteína glicoforina A de la superficie del glóbulo rojo ¹¹⁰, pero esta unión es altamente dependiente de cambios conformacionales sutiles que se producen en determinadas condiciones como, por ejemplo, un entorno de pH ácido. Como consecuencia, los viriones desnudos que circulan en sangre especialmente en el inicio de la infección no serían aclarados por este mecanismo ¹¹¹.

La resolución de la infección se produce mayoritariamente por una respuesta contundente y sostenida de los linfocitos T CD4+, que producen múltiples citoquinas durante la fase aguda y previenen las recaídas hasta que el genoma del virus es eliminado de los hepatocitos ¹¹².

2.12. EPIDEMIOLOGÍA DEL VHA

2.12.1. Vías de transmisión del VHA

El hombre es el único reservorio natural del VHA ¹¹³. El virus se transmite fundamentalmente por vía fecal-oral. Tras la replicación en el hígado, el virus es eliminado en las heces, donde su concentración es máxima¹⁰. Aunque puede detectarse en saliva de animales infectados de forma experimental y puede estar presente en la saliva humana ^{114,115}, no se ha demostrado contagio de VHA por saliva. Las principales vías de transmisión del VHA son:

Contacto directo

El contacto interpersonal sigue siendo el principal medio de contagio del VHA en la mayor parte del planeta ². La mayor parte de la transmisión ocurre entre contactos estrechos en convivientes y entorno cercano a la familia ¹⁷. La eliminación prolongada de VHA, antes y después del inicio de los síntomas, facilita la transmisión interpersonal ⁷⁰. En la mayoría de países no existe vacunación infantil universal, por lo que los niños siguen teniendo una mayor incidencia de infección, convirtiéndose en reservorios asintomáticos. Además, suelen ser menos cuidadosos en sus hábitos higiénicos, por lo que suelen actuar fuente de infección para los adultos. Los colegios y guarderías se ven a menudo implicados en la diseminación del virus ¹¹⁶.

En el 40-50% de los casos de hepatitis A, el origen no es identificado ¹⁷. Los estudios a nivel molecular son fundamentales para identificar la fuente de infección, especialmente si no existen factores de riesgo ^{117,118}. La relación genética esperable entre las cepas implicadas en la transmisión persona-persona varía dependiendo de la endemidad del área geográfica. En entornos de baja prevalencia de hepatitis A, estos brotes suelen estar vinculados a una única cepa, mientras que en las regiones con una prevalencia elevada se pueden detectar varias cepas implicadas ¹¹⁹.

Agua y Alimentos contaminados

Los brotes de hepatitis A relacionados con agua o alimentos contaminados se caracterizan por un incremento abrupto en el número de personas con ictericia en un corto periodo de tiempo ¹¹⁹. En el caso de países con ingresos bajos, el VHA se disemina a través de aguas contaminadas, contacto directo con individuos infectados, o consumo de alimentos contaminados. Debido a que todos estos patrones de transmisión están ligados al agua, el saneamiento y la higiene, resulta complicado a priori identificar un único origen. En países

de ingresos altos, sin embargo, el consumo de agua corriente es seguro, por lo que es más sencillo detectar alimentos concretos responsables de brotes ¹²⁰.

Los brotes vinculados al agua ocurren entre personas que beben agua contaminada, ya sea por cloración inadecuada o por una infraestructura sanitaria deficiente; o que nadan en entornos próximos a fosas sépticas o vertidos de aguas residuales ¹¹⁹. Uno de los factores que más contribuyen al descenso de las tasas de VHA en la mayoría de países es la mejora en el acceso a fuentes de agua potable y en las condiciones higiénico-sanitarias ¹²⁰. Un meta-análisis confirmó la asociación entre mayores tasas de acceso a una fuente de agua potable segura y una menor incidencia de infecciones por VHA ¹²¹. El tratamiento de las aguas de consumo que se realiza actualmente en nuestro medio hace que los brotes asociados a aguas contaminadas sean poco probables ¹¹³.

La detección y secuenciación del ARN del VHA a partir de muestras de agua y de pacientes infectados son herramientas útiles para la identificación de la fuente de infección ¹¹⁹. Es el caso de un brote de hepatitis A ocurrido en India, que pudo vincularse a agua contaminada después del análisis filogenético del ARN del VHA recuperado de muestras de pacientes y de aguas residuales. En esta ocasión, el estudio de la región 5'-UTR y del genoma prácticamente completo reveló que todos los aislados eran idénticos y pertenecían al genotipo IIIA, indicando una fuente común de infección ¹²².

El VHA es una de las causas más frecuentes de infección por transmisión alimentaria. La transmisión del VHA relacionada con alimentos puede deberse a una contaminación de los mismos, a un manipulador de alimentos infectado; o a una contaminación durante el cultivo, la recolección, el procesado o la distribución del producto. Los alimentos contaminados antes de su distribución son difíciles de identificar. Cuando se identifican, a menudo es imposible determinar en qué momento ha tenido lugar la contaminación. Un solo manipulador trabajando en el periodo en el que es infeccioso puede transmitir el VHA a cientos de personas, pero debido a que los manipuladores de alimentos no presentan un riesgo mayor de infección por VHA, no está establecida la vacunación universal de este colectivo ¹²³.

Los dos grupos primarios de alimentos relacionados con brotes de hepatitis A son los productos de la agricultura y el marisco ¹²⁰. La contaminación de frutas y verduras se produce como resultado de una higiene deficiente en los trabajadores o por utilización de agua de riego contaminada con aguas de desecho. El hecho de que el virus sea difícil de eliminar de la superficie de los vegetales contribuye a la diseminación del mismo ¹²⁴. Los brotes de VHA relacionados con marisco se ven favorecidos por factores añadidos, como la recogida cercana a puntos de desecho de aguas, el vertido de aguas residuales próximo al hábitat del marisco,

o el uso de agua contaminada para la piscicultura ¹¹³. El marisco se asocia con la transmisión de VHA por su efecto filtrante del agua, lo cual lleva a que el virus se concentre de manera eficiente; y su consumo ha estado implicado en importantes brotes ^{125,126}. Muchos de los grandes brotes asociados a alimentos están causados por una única cepa, o por varias estrechamente relacionadas. La secuenciación del VHA facilita de manera significativa la identificación de esa fuente y el control epidemiológico a tiempo real. Uno de los brotes de hepatitis A más relevantes ocurrió en Shangai (China) en 1988, registrándose 300.000 casos relacionados con el consumo de almejas recogidas en una zona contaminada por aguas residuales ¹²⁷. En la Comunidad Valenciana tuvo lugar un brote de hepatitis A con 184 casos confirmados serológicamente. En un primer estudio de casos-controles se asociaron los casos de VHA con el consumo de coquinas importadas de Perú. El análisis de la región 5'-UTR reveló la existencia de secuencias de VHA idénticas en el suero de pacientes y en las coquinas, lo cual confirmó que la fuente del brote era el marisco contaminado ¹²⁸.

La OMS estimó que más de 90.000 personas en el mundo murieron de hepatitis A en 2010, y unas 30.000 de esas muertes podían atribuirse directamente a adquisición a través de alimentos ¹²⁹. El comercio internacional de alimentos está creciendo y se espera que aumenten el número de brotes asociados a alimentos en zonas de buenas condiciones socio-sanitarias. Aunque no todos los brotes de hepatitis A asociados a alimentos en estos países están causados por alimentos importados, el riesgo de contaminación por VHA es elevado cuando los alimentos proceden de zonas de ingresos medios y bajos, en los que la hepatitis A es endémica ¹²⁰. Por ejemplo, los arándanos congelados han causado numerosos brotes de hepatitis A en Europa. En un importante brote que tuvo lugar entre junio de 2013 y agosto de 2014, más de 1100 personas en Italia, Alemania, Noruega y otros 10 países europeos fueron hospitalizados por hepatitis A. La caracterización molecular vinculó el brote a arándanos procedentes de Bulgaria y grosellas empleadas en mezclas de frutos procedentes de Polonia ¹²⁴.

Transmisión entre HSH

Mientras en la mayoría de regiones del mundo el VHA causa infecciones en la infancia, en países de baja endemicidad, gran parte de la población adulta es susceptible a la infección por VHA, lo cual favorece la transmisión entre determinados grupos de riesgo ¹¹⁹.

La transmisión sexual *per se* no constituye una vía de transmisión del VHA. El contagio no es consecuencia directa de la penetración anal, sino que está relacionado con el contacto oral con sitios anatómicos contaminados con materia fecal. Por ello, las medidas empleadas habitualmente para prevenir otras ITS no frenan la transmisión del VHA ¹³⁰. La excreción de VHA en las heces se inicia 19 días antes del pico de ALT y continua durante al menos 25

días, pudiendo extenderse hasta los 80 días ⁶⁹. La existencia de un periodo de eliminación tan extenso favorece la transmisión vía contacto oro-anal y oro-genital ¹¹⁹. Varios estudios de casos-contróles han identificado factores de riesgo asociados, como tener parejas sexuales anónimas, el sexo en grupo, prácticas oro-anales y digito-rectales, el contacto con pacientes con hepatitis A aguda, tener sexo en saunas gay, y visitar saunas y cuartos oscuros ⁶⁹.

Las cepas que circulan de manera predominante entre HSH pertenecen al genotipo IA ¹³¹⁻¹³⁵. El análisis filogenético revela en la mayoría de ocasiones la circulación de cepas de VHA similares entre HSH de diferentes países, lo cual parece sugerir la existencia de una amplia red de comunidades de HSH capaz de mantener la circulación de ciertas cepas relacionadas genéticamente durante largos periodos de tiempo. Esto genera una situación de endemidad en la población HSH ¹³⁵. Se ha estimado que un nivel de inmunidad >70% entre la población HSH prevendría la transmisión sostenida y la aparición de futuros brotes ¹³⁶.

La duración de los brotes de hepatitis A entre HSH se restringe a dos años en la mayoría de ocasiones ¹³⁷. Sin embargo, se han reportado brotes de mayor duración, como el de Canadá ¹³⁸, de 1994 a 1998; y brotes cíclicos, ocurridos en Australia entre 1991 y 1996 ¹³⁹, y en España entre 1989 y 2010 ¹⁴⁰. Desde la década de 1980 se han comunicado múltiples brotes de hepatitis A entre HSH en regiones de baja endemidad de Europa, como Dinamarca ¹⁴¹, Suecia ¹⁴², Reino Unido ¹⁴³, y en Estados Unidos ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. En la década de los 90, se produjo un pico de incidencia de infección por VHA en HSH, afectando a países como Reino Unido ¹⁴⁷⁻¹⁵⁰, Holanda ¹⁵¹, Noruega ¹³⁴, Estados Unidos ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶, Canadá ¹³⁸ y Australia ^{139,152-154}. A pesar de que a mediados de los años 90 se recomendó la vacunación en este colectivo ¹⁴⁸, la emergencia de la infección por VHA en HSH constituye aún hoy un desafío para la salud pública en muchos países europeos.

Entre 2016 y 2017 tuvo lugar en Europa un extenso brote de hepatitis A que afectó fundamentalmente a población HSH. En junio de 2017, 16 países europeos (Austria, Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Irlanda, Italia, Países Bajos, Noruega, Portugal, Eslovenia, España, Suecia y Reino Unido) habían reportado 1500 casos de hepatitis A confirmados infectados por una de las tres cepas implicadas el brote: VRD_521_2016, RIVM-HAV16-090 y V16-25801. Todas ellas pertenecían al subgenotipo IA ¹⁵⁵. La celebración del EuroPride, un evento internacional para celebrar la igualdad de derechos de la comunidad gay, bisexual y transgénero, tuvo lugar en julio de 2016 en Amsterdam. La edición de 2016 congregó a más de medio millón de visitantes ¹⁵⁶, lo cual jugó probablemente un papel clave en la diseminación del virus.

En diciembre de 2016, Reino Unido notificó 15 casos de hepatitis A, 5 de los cuales habían viajado a España. El análisis genético reveló la implicación de una misma cepa (VRD_521_2016), cuya secuencia se relacionaba filogenéticamente con otras derivadas de Sur y Centro América. En junio de 2017, 16 países de la Unión Europea habían reportado 806 casos de hepatitis A en los que VRD_521_2016 estaba implicada, la mayoría de ellos (223) registrados en España. Respecto a los casos detectados en el resto de la UE, de los 71 pacientes con historia de viajes previos, 27 habían visitado España durante el periodo de incubación.

La cepa RIVM-HAV16-090 se identificó por primera vez en Holanda, en dos asistentes al festival EuroPride celebrado en Amsterdam. Ambos casos habían participado de actividades sexuales anónimas en un mismo local. RIVM-HAV16-090 se relacionaba estrechamente con cepas reportadas en Japón y China, por lo que muy probablemente su procedencia sea asiática. En junio de 2017 se habían reportado en la UE 509 casos relacionados con RIVM-HAV16-090, la mayoría de ellos (168) en Reino Unido. De los 88 pacientes con historia de viajes, 26 habían visitado España. Las secuencias de RIVM-HAV16-090 y VRD_521_2016 presentan una similitud de tan solo el 95,4%, lo cual sugiere cadenas de transmisión no relacionadas.

Un tercer clúster, denominado V16_25801, fue descrito en Alemania en diciembre de 2016. La mayoría de los casos asociados se detectaron en Alemania, y el 94% eran hombres. De los 47 casos documentados, 41 afirmaban ser HSH. En cuanto a la información acerca de viajes a otros países, de los 24 casos documentados, 9 habían viajado a España durante el periodo de incubación.

Los casos confirmados subestiman de manera significativa la verdadera extensión del brote, debido a las dificultades para la secuenciación en muchos países. Además, los casos reportados se limitan a aquellos que precisan de asistencia sanitaria, y una gran proporción de casos leves y asintomáticos habrían quedado sin identificar ¹⁵⁵. La mayoría de casos se produjeron entre población HSH no vacunada, pero existe evidencia de casos secundarios en la población general. Se ha reportado transmisión entre convivientes ligada a las cepas implicadas en el brote lo cual subraya la necesidad de un estudio de contactos precoz, y de profilaxis postexposición en contactos estrechos con el objetivo de evitar infecciones secundarias en convivientes no vacunados ¹⁵⁵.

Durante el mismo periodo, se registraron brotes que afectaron a HSH en Estados Unidos y en Israel, en donde se vieron implicadas las cepas VRD_521_2016 y RIVM-HAV16-090 vinculadas al brote europeo ¹⁵⁷. La tercera cepa asociada, V16-25801, fue detectada en Chile,

y en Italia en dos pacientes procedentes de Ecuador, por lo que se cree que pudo estar circulando en Sudamérica incluso antes del brote de Europa ¹⁵⁷.

Las coinfecciones por VHA y VIH han sido descritas en Italia ^{132,158,159}, Polonia ¹⁶⁰ y España ¹⁴⁰. La mayoría de individuos eran hombres con diagnóstico previo de VIH, mientras que otros fueron detectados en el curso de la hepatitis A aguda ^{132,140,158-160}. Entre todos los pacientes varones que fueron diagnosticados de hepatitis A entre 2002 y 2008 en Italia, el 15,2% eran VIH-positivo. Si se excluye a aquellos de los que no se dispone de serología de VIH, la seroprevalencia era del 27,6% ¹⁵⁹. La elevada proporción de coinfecciones VHA/VIH en áreas de baja endemicidad de VHA pone de manifiesto la importancia de testar el VIH en pacientes con hepatitis A aguda ⁶⁹.

Viajes a zonas endémicas

Los viajes a zonas endémicas constituyen una de las principales vías de adquisición del VHA en zonas de endemicidad baja. Las redes de transporte actuales y la globalización de los movimientos humanos facilitan que las enfermedades infecciosas se expandan más rápidamente a través de las fronteras ¹⁶¹. La hepatitis A es una de las enfermedades prevenibles mediante la vacunación más frecuentes entre los turistas y viajeros internacionales ¹⁶². La mayoría de casos de hepatitis A asociados a viajes ocurren cuando los residentes de zonas con un alto nivel de recursos (y algunos habitantes de zonas urbanas con recursos intermedios) viajan a lugares con un nivel mayor de endemicidad de VHA. Los viajeros no vacunados pueden contraer el virus y desarrollar la enfermedad una vez han vuelto a sus países de origen. Estas infecciones importadas pueden transmitirse en el entorno doméstico, colegios, lugares de trabajo y otros ámbitos sociales, generando olas de transmisión ¹²⁰.

En países con buenas condiciones socio-sanitarias, la vacunación está recomendada en poblaciones de riesgo, lo cual incluye viajeros a zonas endémicas ¹⁶³. Sin embargo, un estudio realizado en viajeros a zonas endémicas procedentes de Australia, Canadá, Finlandia, Alemania, Noruega, Suecia y Reino Unido reveló que solo una pequeña minoría de ellos habían sido vacunados frente a la hepatitis A ¹⁶⁴. Las tasas de vacunación encontradas en viajeros procedentes de Japón fueron también bajas ¹⁶⁵, y subóptimas en otros trabajos con viajeros procedentes de Francia, Italia, Corea del Sur, España y Estados Unidos ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Según la red de vigilancia global de la sociedad internacional de medicina asociada a los viajes (ISTM), entre 2007 y 2011, entorno a la mitad de los casos que se produjeron en viajeros internacionales correspondían a turistas en viajes de ocio, el 10% viajaban por trabajo, y una tercera parte eran personas visitando a amigos o parientes (VFRs de su

acrónimo en inglés) ¹⁶⁹. Los emigrantes procedentes de zonas endémicas habrían desarrollado inmunidad natural por una infección asintomática durante la infancia, por lo que pueden no ser conscientes de que sus hijos, que han nacido y crecido en zonas no endémicas, son vulnerables al VHA. Respecto a otros viajeros, es menos probable que los VFRs estén vacunados frente al VHA, y más probable que lleven a cabo conductas de riesgo como beber agua corriente o consumir alimentos potencialmente contaminados cuando visitan sus países de origen ¹⁷⁰.

Personas que se inyectan drogas (PID)

Las PID presentan una seroprevalencia de VHA mayor a la de la población general ⁶⁹. En la década de 1970 aumentó significativamente el número de PID, y comenzaron a reportarse brotes de hepatitis A en este colectivo. El VHA no es un patógeno considerado de transmisión sanguínea en la medida que lo son el VHB o el VHC. Sin embargo, la vía percutánea no puede ser descartada ya que existen grupos cerrados de PID en los que con frecuencia se comparten jeringuillas, lo cual facilita la transmisión desde individuos virémicos al resto del grupo. La transmisión en estos grupos se ve incrementada cuando las condiciones sanitarias y de higiene personal son deficientes, o cuando el consumo de drogas se relaciona con comportamientos sexuales de riesgo para la transmisión del VHA (contacto oral-anal) ¹¹⁹.

La mayoría de brotes se han registrado en Europa ¹⁷¹⁻¹⁷⁴ y Estados Unidos ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. En Noruega, 492 PID se infectaron de hepatitis A entre 1995 y 1996 ¹⁷³. En Terni, Italia, se registraron 47 casos de hepatitis A aguda durante 2002-2003, 35 de los cuáles eran PID y 2, VIH positivos ¹⁷⁸. A pesar de haber implantado la vacunación universal en niños pequeños en 1999, Israel experimentó entre 2012 y 2013 un brote de hepatitis A en PID que se extendió a la población general ¹⁷⁹.

Los subgenotipos IA y IIIA se detectan con frecuencia entre los PID infectados por VHA ¹¹⁹. La investigación de un brote ocurrido en Noruega reveló la emergencia del subtipo IIIA con la transmisión parenteral en este grupo ¹⁸⁰. Estudios posteriores de brotes ocurridos en Europa vinculados a PID han confirmado la circulación del genotipo IIIA en este colectivo ^{118,181-184}. Estas cepas de VHA podrían haberse introducido en Europa a través de la importación de drogas contaminadas procedentes del centro y sur de Asia, donde el subgenotipo IIIA es endémico ¹¹⁹.

Transmisión vertical

Aunque es poco frecuente, se han comunicado diversos casos de transmisión vertical de VHA ¹⁸⁵⁻¹⁹⁰. En dos de los neonatos produjo peritonitis meconial y perforación del íleo, requiriendo cirugía postnatal ^{191,192}. A pesar de presentar una sintomatología por lo general leve, la

hepatitis A durante el embarazo se asocia con un elevado riesgo de complicaciones y parto pretérmino, especialmente si se produce en el segundo y tercer trimestre. En Israel, se analizaron 13 casos de infección gestacional por VHA adquirida durante el segundo y tercer trimestre, de los cuales 9 (69%) presentaron complicaciones como contracciones prematuras, rotura prematura de membranas, separación placentaria y sangrado vaginal. Se encontró una relación significativa entre parto pretérmino y la presencia de fiebre e hipoalbuminemia cuando la infección era adquirida durante el tercer trimestre ¹⁹³. En una serie de 12 casos registrados en Corea del Sur, se produjeron dos partos pretérmino, una ruptura prematura de membranas, y un caso de ascitis fetal que se resolvió de forma espontánea ¹⁹⁴. No se conoce el mecanismo exacto mediante el cual el VHA produce contracciones pretérmino. Una posible explicación sería la intensa respuesta proinflamatoria desencadenada en el curso de una hepatitis viral. En concreto, los niveles séricos de IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa se elevan significativamente en los pacientes con infección aguda por VHA. La asociación entre estas citoquinas y las contracciones pretérmino es ya conocida ¹⁹⁴. En áreas en las que existe población adulta susceptible a la infección por VHA, sería aconsejable la realización de una serología y la vacunación durante el embarazo ¹⁹³.

Transmisión nosocomial

La transmisión nosocomial del VHA es poco frecuente porque las medidas higiénicas suelen extremarse cuando los pacientes presentan una sintomatología que precisa de ingreso hospitalario. Se recomienda establecer precauciones de contacto en el caso de profesionales sanitarios al cargo de pacientes que precisan de pañales o con incontinencia. Los profesionales sanitarios no presentan una mayor prevalencia de infección por el VHA ¹¹³.

2.12.2. Distribución global de la hepatitis A

Se estima que al año se producen en el mundo 100 millones infecciones por el VHA y 1,5 millones de casos sintomáticos, los cuales son responsables de entre 15.000 y 30.000 muertes anuales ¹⁹⁵.

La hepatitis A se presenta esporádicamente y en epidemias de ámbito mundial, y tiende a reaparecer periódicamente. La incidencia de VHA en la población está relacionada con las condiciones socio-económicas, incluyendo el número de convivientes en la vivienda, las condiciones sanitarias, la calidad del agua y los ingresos. En áreas con un mejor acceso al agua potable y eliminación de aguas residuales, núcleos familiares más pequeños y mejor higiene personal la tasa de transmisión es más baja ¹.

Aunque la tendencia de la incidencia de hepatitis A es decreciente a nivel global, la distribución del riesgo no es uniforme. El nivel de endemicidad de hepatitis A en una

población se determina por la prevalencia de anticuerpos anti VHA de tipo IgG en cada grupo de edad. Estos se adquieren tras una infección o mediante inmunización. La carga de enfermedad por VHA está altamente vinculada a la edad media de infección en una población ¹⁹⁶. Los países con ingresos más bajos presentan elevadas tasas de incidencia asociadas a una elevada seroprevalencia de IgG anti-VHA. Sin embargo, la carga de enfermedad en su población es baja, ya que las infecciones se adquieren mayoritariamente en la infancia, cuando la hepatitis A suele cursar de forma asintomática. La proporción de adultos vulnerables es, por tanto, baja. Los países con altos ingresos presentan una tasa de incidencia y una seroprevalencia muy bajas, pero el número de casos sintomáticos puede ser mayor. Esto se debe a que la gran proporción de adultos vulnerables desplaza el momento de adquirir la infección hacia la edad adulta, cuando el VHA produce por lo general una hepatitis franca. Este perfil de riesgo inusual hace que se hable de la paradoja de la hepatitis A. Como consecuencia de esta característica, un mayor acceso al agua potable puede inicialmente aumentar la carga de la hepatitis A en la población, aunque el número de casos descenderá con el desarrollo de las infraestructuras necesarias ¹²⁰.

El estudio de la prevalencia de hepatitis A en las diferentes regiones del mundo se ve limitado por la escasez de datos representativos en determinadas áreas. Mientras que las zonas con ingresos altos han sido muy estudiadas, la información acerca de la seroprevalencia anti-VHA en países con ingresos intermedios o bajos es escasa o, en muchos casos, inexistente. En estas regiones, son normalmente los países dominantes los que contribuyen con un mayor número de publicaciones científicas, y los datos de países en vías de desarrollo pueden no estar representados. Además, en muchos casos, los estudios están enfocados en grupos de riesgo y no representan la situación de la población general. En este contexto, los descensos en la incidencia en determinados países o subpoblaciones pueden no verse reflejados en la literatura ¹²⁰.

Patrones de distribución a nivel mundial

La hepatitis A presenta una distribución mundial. Sin embargo, su tasa de transmisión varía ampliamente entre poblaciones. Las mayores prevalencias de infección por VHA ocurren en las regiones con los niveles socio-económicos más bajos ¹⁷. Las condiciones higiénico-sanitarias, la mayor probabilidad de enfermedad y mortalidad en edades avanzadas, y la inducción de inmunidad de por vida tras la infección por el VHA son los tres factores que determinan los tres patrones epidemiológicos de la hepatitis A en el mundo ¹⁹⁷. La endemidad del VHA en una población se establece de acuerdo a la prevalencia de IgG anti-VHA edad-específica, clasificándose en alta ($\geq 90\%$ a la edad de 10 años), intermedia ($\geq 50\%$ a los 15 años y $< 90\%$ a los 10 años), baja ($\geq 50\%$ a los 30 años y $< 50\%$ a los 15 años), y muy baja ($\leq 50\%$ a los 30 años) ¹⁹⁸.

Patrón de alta endemicidad

En zonas de bajos recursos, con un saneamiento deficiente (como África subsahariana, parte del sudeste asiático, y parte de Sudamérica), las tasas de transmisión son muy altas. Prácticamente toda la población se infecta durante la infancia temprana, edad a la cual la infección rara vez cursa de manera sintomática. Como consecuencia, la mayoría de los adultos son inmunes. En zonas con elevada endemicidad de hepatitis A, al menos el 90% de la población presenta anticuerpos frente al VHA a la edad de 10 años ¹⁹⁹. Por lo tanto, en estas áreas, la hepatitis A no representa un problema de salud pública, ya que, a pesar de la frecuente circulación del virus, la enfermedad por hepatitis A es infrecuente y rara vez se producen brotes.

El término VFR (acrónimo del inglés *visiting friends or relatives*) se emplea para designar a los individuos nacidos en el extranjero, y sus hijos, cuando regresan a su país de origen para visitar a sus familias ²⁰⁰. Los inmigrantes procedentes de áreas endémicas de hepatitis A desarrollan habitualmente inmunidad frente al virus tras una infección asintomática en la infancia, pero pueden no ser conscientes del riesgo que entraña para aquellos descendientes nacidos ya en zonas no endémicas. Los VFRs presentan menores tasas de vacunación que los turistas, y una mayor probabilidad de llevar a cabo conductas de riesgo, como beber agua de grifo o consumir marisco crudo ¹²⁰. El riesgo que supone la infravacunación de los VFRs, especialmente en niños y adolescentes, se ve reflejado, por ejemplo, en los datos de Canadá. Más de la mitad de los casos de hepatitis A registrados entre los viajeros internacionales que partieron de Quebec entre 2004 y 2007 se produjeron en VFRs. La mayoría de esos casos fueron infecciones pediátricas, a pesar de que los niños suponían solo el 10% de los VFRs ²⁰¹.

Patrón de baja y muy baja endemicidad

Las áreas de baja endemicidad se definen por una seroprevalencia de, al menos, el 50% a la edad de 30 años, y menor del 50% a los 15 años; y las de muy baja endemicidad, por una seroprevalencia menor del 50% a los 30 años ¹⁹⁹. Se encuentran en este rango el oeste y el norte de Europa, Australia, Canadá, Japón, y Estados Unidos. En estos países ricos en recursos, la circulación del virus es escasa debido a las buenas condiciones sanitarias e higiénicas. Esto implica también que una importante proporción de la población de todos los grupos de edad carezca de anticuerpos anti-VHA. Por tanto, cualquier entrada de VHA en la población, aunque infrecuente, puede implicar oleadas importantes de diseminación del virus. Estos brotes tienen habitualmente una fuente común, por ejemplo, alimentos importados

contaminados, y se extienden con la transmisión interpersonal, afectando en su mayoría a adolescentes y adultos jóvenes.

Patrón de endemidad intermedia

La seroprevalencia en estas áreas es de, al menos, el 50% a la edad de 15 años, y menor del 90% a los 10 años. Se ajustan a este patrón zonas del sur y este de Europa, China, parte de Latinoamérica, norte de África, Oriente Medio y Rusia ¹⁹⁹. A medida que un país experimenta una transición epidemiológica hacia una menor endemidad, aquellos que se infectan presentan un riesgo más elevado de presentar una infección sintomática ¹⁹⁶. En áreas con condiciones socioeconómicas intermedias, el VHA presenta una tasa de circulación relativamente alta. Este hecho, unido a la existencia de un número importante de niños de mayor edad y adultos jóvenes susceptibles con una mayor probabilidad de desarrollar síntomas ²⁰², lleva a una elevada incidencia de enfermedad clínica. Como consecuencia, se producen brotes extensos relacionados con la transmisión persona-persona o vinculados a contaminación de agua o alimentos a partir de una fuente común ²⁰³.

2.12.3. Epidemiología molecular del VHA

Las técnicas de biología molecular, como la secuenciación o el análisis filogenético, se han empleado para determinar la relación entre cepas recuperadas de individuos infectados. En la actualidad, estos procesos se ven facilitados por la relativamente sencilla recuperación del genoma de VHA a partir de suero de pacientes infectados; y el buen rendimiento de los métodos disponibles, capaces de procesar un gran flujo de muestras en poco tiempo. Estos avances han convertido a la epidemiología molecular en una herramienta esencial en la investigación de brotes y en estudios acerca de la transmisión del VHA.

Los elementos fundamentales del análisis epidemiológico molecular del VHA son, en primer lugar, la determinación del genotipo, vinculado a la distribución geográfica de las cepas; y, en segundo lugar, establecer la relación genética entre los aislados mediante un análisis filogenético. Para facilitar este proceso, se amplifica el ARN del virus mediante PCR. Por lo general se seleccionan regiones cortas del genoma para las que existe gran cantidad de información disponible a la hora de realizar estudios comparativos, siendo VP1-2A la empleada con mayor frecuencia ^{17,119}.

A pesar del elevado nivel de conservación del genoma del VHA, el empleo de regiones subgenómicas para detectar transmisiones a partir de una fuente única está justificado,

considerando el predominio de infecciones producidas por una única cepa, lo cual ayuda a reducir el análisis genético al emparejamiento de secuencias cortas, en lugar de llevar a cabo complejas evaluaciones de las relaciones filogenéticas entre variantes del VHA. Por tanto, aunque la secuenciación de genomas completos de VHA confirma que existe heterogeneidad entre las cepas implicadas en brotes, las secuencias derivadas de una región genómica corta, como VP1-2A, ha demostrado ser suficiente para la identificación de una fuente común de infección ¹¹⁹.

Frecuencia de distribución de los genotipos

Las cepas de VHA que infectan al hombre se agrupan en los genotipos I, II y III, divididos en subtipos A y B. El genotipo I es el más prevalente a nivel mundial, concentrando el 80% de las cepas circulantes. Le sigue en frecuencia el genotipo III, mientras que el genotipo II se aísla en raras ocasiones ^{17,130}. Los subgenotipos IA, IIIA y IB son los más frecuentes, con prevalencias del 66%, 21% y 14% respectivamente ²⁰⁴. En concreto, IA es el subgenotipo más prevalente seguido de IB (especialmente en África) con la excepción del sur de Asia, incluyendo India y Pakistán, donde IIIA es el subtipo más abundante ^{205,206}. En zonas de baja endemicidad, como Estados Unidos o Europa occidental, predomina el subgenotipo IA, aunque se han reportado todos los genotipos y subtipos. En estas regiones el análisis filogenético ha revelado un patrón complejo, ya que los aislados de VHA derivan de múltiples genotipos, indicando probablemente que se trata de cepas importadas de diferentes regiones ^{25,28}. Aunque el genotipo I sigue siendo el mayoritario, en los últimos años el subgenotipo IIIA está aumentando ²⁰⁷ y expandiéndose significativamente a otras partes del mundo. En Europa, donde hasta ahora era poco común, se han detectado brotes asociados al mismo ²⁰⁸⁻²¹⁰. El remplazo de un genotipo por el otro podría explicar en parte el desplazamiento de la enfermedad de la infancia a la edad adulta ^{36,211,212}.

La determinación del genotipo del VHA podría ser de utilidad a la hora de predecir el pronóstico de la enfermedad, aunque en la actualidad no se dispone de información suficiente y se necesitan más estudios al respecto ²⁰⁴. El subgenotipo IIIA se ha asociado a cuadros más severos de hepatitis A, con una mayor alteración de los parámetros clínicos y estancias hospitalarias más prolongadas ²⁰⁷. En un estudio realizado en 499 pacientes en Corea, aquellos infectados por el subgenotipo IIIA presentaron valores significativamente mayores de transaminasas, tiempo de protrombina y recuento de leucocitos, acompañados de síntomas más severos que aquellos infectados por el genotipo IA en el momento de la admisión ²¹³. Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias significativas con respecto a los cuadros producidos por otros genotipos ²¹⁴, por lo que la relación entre el subtipo IIIA y la gravedad de la infección sigue siendo controvertida.

En 2012 se produjo en Cataluña un aumento notable en la incidencia de hepatitis A, con un llamativo incremento de casos sintomáticos en niños menores de 5 años. Este hallazgo constituye un hecho inusual, debido a que la mayoría de infecciones en niños menores de 6 años son asintomáticas. El 60% de las cepas tipadas en ese periodo correspondían al subgenotipo IIIA, todas ellas aisladas en niños procedentes de Pakistán, por lo que parece que este subtipo podría estar asociado a un aumento de casos sintomáticos en niños pequeños ²¹⁵. Aunque esta relación no había sido reportada previamente, en India, donde IIIA es el subtipo más prevalente, el 52% de los casos que presentan síntomas se dan en menores de 5 años ²⁰⁵, lo cual apoya la hipótesis planteada en el estudio de Cataluña.

Un meta-análisis con datos acerca de la prevalencia de los diferentes subgenotipos a nivel mundial reveló que la mortalidad se asociaba con mayor frecuencia a infecciones producidas por los subtipos IB y IIIA ²⁰⁴.

En 2008 se produjo en Cataluña un brote de hepatitis A asociado al consumo de coquinas importadas de Perú. A partir del mismo, se aisló una cantidad considerable de cepas que pertenecían a un subgenotipo indeterminado, equidistante entre IA y IB, que fue considerado como posible candidato a subgenotipo IC, el cual no ha vuelto a ser detectado ²¹⁶.

Dada su baja frecuencia, los subgenotipos IIA y IIB fueron definidos en base a un solo aislado cada uno: CF-53/Berne, aislado en Francia en 1979, y SLF88, aislado en Sierra Leona en 1988 ²⁶, por lo que inicialmente se desconocía su variabilidad genética. El genotipo II es poco común fuera de África subsahariana, aunque ha sido aislado ocasionalmente en Francia. Entre 2002 y 2007, el centro nacional de referencia para el estudio de la hepatitis A en Francia detectó 14 aislados del subgenotipo IIA. El genotipo II presentó menor variabilidad tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos con respecto al resto de genotipos. Independientemente de la región analizada, 5'UTR o VP1-2A, la variabilidad genética demostró ser extremadamente baja. El análisis filogenético reveló que la mayoría de cepas aisladas en Francia habían sido importadas por viajeros procedentes de África Occidental ²⁸.

2.12.4. Hepatitis A en Europa

El número de pacientes con infección por el VHA en los países industrializados ha disminuido en las últimas décadas. Esto podría atribuirse a la mejora en las condiciones higiénico-sanitarias y socio-económicas, la implantación de medidas de seguridad alimentaria y la introducción de programas de vacunación dirigidos a grupos de riesgo ².

Según una revisión sistemática realizada con datos de 28 países, desde 1975, Europa ha experimentado un descenso en las tasas de seropositividad de la población. Se estima que, en 1980, el 5% de la población europea vivía en zonas de endemidad muy baja, mientras que en el 2000 el porcentaje ascendía al 80%. La mayoría de la Unión Europea y de la Comunidad Económica Europea se considera hoy un área de baja o muy baja endemidad de hepatitis A, lo cual implica un número elevado de individuos susceptibles a la infección. Atendiendo a los criterios de la OMS en base a la seroprevalencia, 24 de los 28 países de la Unión Europea y del Espacio Económico Europeo presentan un perfil muy bajo de endemidad de hepatitis A. Sin embargo, las tasas de notificación varían ampliamente a lo largo del territorio, registrándose los valores más altos en los países del este de Europa. A pesar de existir zonas de endemidad elevada, todo el territorio presenta un patrón decreciente similar con respecto a la seroprevalencia a lo largo de las cuatro décadas ²¹⁷. Como se ha comentado con anterioridad, la transición epidemiológica hacia una menor endemidad se acompaña de un desplazamiento de la edad de infección hacia la etapa adulta. Esto se traduce en un aumento de la incidencia relativa de hepatitis A aguda sintomática.

Si se toma como indicador epidemiológico la susceptibilidad de la población al VHA, los países nórdicos presentarían los niveles más elevados, existiendo un gradiente decreciente a medida que nos desplazamos hacia el sur y el este de Europa ²¹⁷.

Los individuos de países de la UE/EEE que se enfrentan a un mayor riesgo de exposición al VHA son aquellos que viajan a áreas de elevada endemidad, incluyendo a aquellos que se desplazan para visitar a amigos y familiares (VFR), expatriados que viven en esas zonas, grupos marginales en condiciones sanitarias deficientes, PID, hombres que tienen sexo con hombres (HSH), y, rara vez, receptores de transfusiones sanguíneas. El número de viajeros procedentes de Europa que viajan a áreas de mayor endemidad está creciendo. Esto puede implicar que estos destinos sean percibidos como menos exóticos, y se recurra con menor frecuencia a consultas de medicina del viajero antes de partir ¹⁹⁹.

Según el informe epidemiológico anual del European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) en 2017 se produjo un pico de incidencia de hepatitis A en Europa, registrándose 26.091 casos, lo cual supuso un incremento en 13.703 casos con respecto a los datos del año anterior. La tendencia desde entonces es decreciente, registrándose en 2020 4382 casos.

Brotos de hepatitis A en la UE/EEE

Durante los últimos años se han producido en Europa brotes de hepatitis A relevantes. Algunos afectaron a grupos de riesgo, mientras que otros se expandieron entre la población general.

En cuanto a brotes relacionados con viajes al extranjero, entre noviembre de 2012 y junio de 2013, unos 100 individuos procedentes de 14 países europeos viajaron a Egipto y se infectaron de VHA del subgenotipo IB. En este caso, la transmisión a través de agua o alimentos contaminados es la vía más probable ²¹⁸.

También se registraron brotes relacionados con alimentos contaminados en los que la infección se adquirió dentro del territorio europeo. Entre 2009 y 2011, el consumo de tomates semisecos procedentes de Turquía se asoció a infecciones por el VHA en Francia, Países Bajos y Reino Unido. Los tres clusters del virus implicados pertenecían al subtipo IB ²¹⁹. En 2013 se produjeron dos brotes de hepatitis A asociados al consumo de frutos rojos congelados contaminados. Uno de ellos tuvo lugar en Dinamarca, Noruega, Suecia y Finlandia, y se vinculó al subgenotipo IB del VHA ²²⁰. El otro brote relacionado con frutos rojos afectó a Irlanda e Italia, y fue producido por el subtipo IA del VHA ²²¹.

En diversos brotes relacionados con alimentos frescos, la contaminación parece apuntar a los manipuladores de alimentos como la fuente más probable. Es el caso del extenso brote asociado al consumo de carne cruda ocurrido en Bélgica, en el que a partir de un único manipulador infectado en el punto de distribución se generaron 269 casos de hepatitis A ²²².

Durante los años 2008 y 2009 tuvo lugar en Europa un importante brote de hepatitis A entre hombres que tienen sexo con hombres, en el cual una importante proporción de los afectados eran VIH-positivo. Entre junio de 2016 y mayo de 2017 tuvo lugar en Europa un brote asociado a hombres que tienen sexo con hombres (HSH), durante el cual 17 países comunicaron un total de 4096 casos, 1400 de los cuáles se confirmaron mediante métodos moleculares. Reino Unido, Países Bajos y Alemania fueron los primeros países en notificar un aumento en el número de casos de hepatitis A a través del ECDC. La secuenciación de la región VP1-2A reveló la existencia de tres cepas cocirculantes, VRD_521_2016, V16-25801 y RIVM-HAV16-090, todas ellas pertenecientes al subgenotipo IA. Tras esas primeras alertas, 14 países más notificaron a este organismo casos de hepatitis A entre HSH. La incidencia nacional de hepatitis A pasó a ser más del doble en Austria, Grecia, Italia, Malta, Portugal, España y Reino Unido, comparada con la del mismo periodo en los cuatro años previos (**figura 1**).

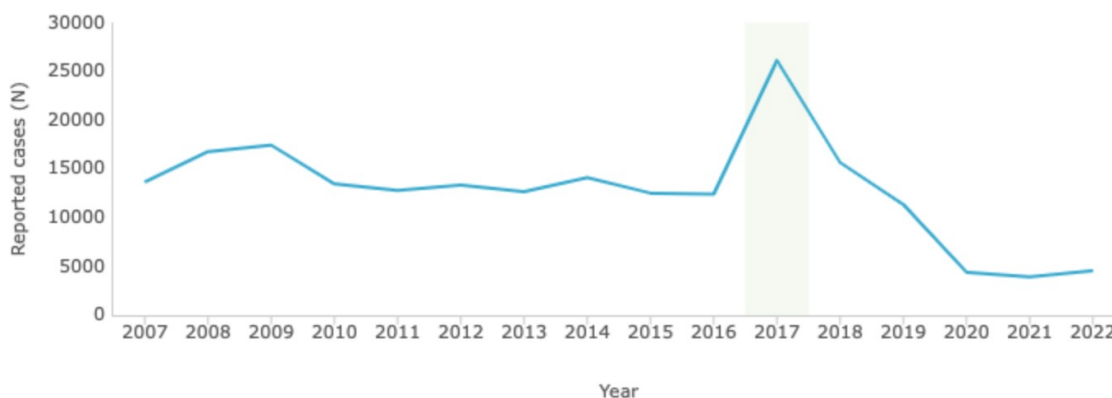


Figura 1. Casos de hepatitis A reportados en Europa entre los años 2007 y 2022.

Fuente: ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases.
<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>.

El 93% de los casos eran hombres, la mayoría con edades comprendidas entre los 18 y los 45 años. De ellos, el 84% eran HSH, y el 49% con datos serológicos eran VIH positivo. El 92% de los infectados no había sido vacunado. Una cuarta parte de los casos confirmados había viajado al extranjero durante el periodo de incubación, siendo España el país más visitado. España fue también el país más afectado, registrando entorno al 50% del total de casos.

El brote podría haberse originado por múltiples introducciones y transmisión prolongada de cepas de VHA originadas en diferentes partes del mundo, incluyendo Centro América (VRD_521_2016) y el este de Asia (RIVM-HAV16-090). El desabastecimiento de la vacuna en Europa podría haber frenado la inmunización del colectivo HSH durante el brote²²³.

Vacunación en la UE/EEE

La OMS recomienda la vacunación rutinaria frente al VHA en países con endemicidad intermedia, lo cual incluye a países del sur y este de Europa, pero no en países de alta endemicidad. En el oeste y norte de Europa, donde la endemicidad es baja o muy baja, las recomendaciones de vacunación de la OMS se dirigen únicamente a grupos de riesgo ¹⁶³. Algunos países con endemicidad intermedia recomiendan la vacunación universal a nivel nacional, como es el caso de Grecia desde el año 2008 ²²⁴; o a nivel regional, como Cataluña en España ²¹⁵, o Puglia en Italia ²²⁵. La mayoría de países europeos han emitido sus propias recomendaciones, al menos para grupos de riesgo, pero éstas no van asociadas necesariamente a mayores recursos económicos y programas de vacunación, ni a una monitorización de la cobertura vacunal ¹⁹⁹.

2.12.5. Hepatitis A en España

España se encuentra en una situación de baja endemicidad de hepatitis A ²²⁶. La mayor incidencia ocurre por lo general en las Ciudades Autónomas de Ceuta y Melilla, debido muy

probablemente a su proximidad con Marruecos. En países de estas características, la introducción del virus ocurre fundamentalmente a través de los flujos migratorios, por viajes a zonas endémicas, o por el consumo de alimentos importados contaminados. Una vez se introduce en un área determinada, la cepa de VHA se transmite mediante contacto interpersonal. El grupo de HSH constituye una diana importante debido a las prácticas sexuales de riesgo relacionadas con la transmisión fecal-oral ²¹⁵.

La hepatitis A es una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en España. Desde 1997, los casos se notifican a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), junto a información como el vehículo de infección o posibles antecedentes de viaje.

Entre 2008 y 2009 tuvo lugar en España un importante brote de hepatitis A asociado a hombres que tienen sexo con hombres ¹⁴⁰. Desde entonces no se habían registrado brotes relevantes. Coincidiendo con lo comunicado por otros países europeos, entre 2016 y 2017 se produjo en España un importante incremento en el número de casos de hepatitis A, afectando mayoritariamente a hombres que tienen sexo con hombres. De los 37 casos en HSH reportados por Reino Unido hasta enero de 2017, 9 (24,3%) referían haber viajado a España recientemente y mantenido relaciones sexuales de riesgo. Otros países como Irlanda, Suecia y Alemania apuntaron al viaje a nuestro país como posible factor de riesgo de exposición ²²⁷. En mayo de 2017, se habían registrado en Europa 4096 casos asociados al brote, de los cuáles 2128 (52%) se habían producido en España ²²³.

Según el último informe publicado por el Centro Nacional de Epidemiología, los casos de hepatitis A notificados fueron aumentando desde junio de 2016 hasta 2017, y en 2018 disminuyeron de forma considerable. El número de casos en 2017 fue tres veces mayor al declarado el año anterior, y la tasa de incidencia (TI), de 9,34 casos por cada 100.000 habitantes, descendiendo a 3,67 en 2018. Atendiendo a la distribución por Comunidades Autónomas, en 2017, la TI más alta fue la de Canarias (15,4), seguida de las de Ceuta y Melilla (15,3), Madrid (14,9), Andalucía (13,3) y Cantabria (13,1). El aumento afectó fundamentalmente a hombres, especialmente en el grupo de los 20 a 44 años. En la mayoría de brotes notificados, la transmisión fue persona-persona. El porcentaje de brotes relacionados con estancias en el extranjero aumentó en 2018 (9,1%) comparado con 2017 (4,2%) ²²⁸.

Según datos del ECDC, en 2020 se declararon en España 189 casos de hepatitis A. De ellos, 52 (40,3%) precisaron hospitalización. El 12,3% de las infecciones se relacionaron con viajes a zonas de mayor endemicidad²²⁹.

En marzo de 2024, los controles portuarios españoles alertaron, a través del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF)²³⁰, de la presencia de hepatitis A en fresas provenientes de Marruecos, siendo la fuente de contaminación más probable es el uso de aguas fecales para regadío. Las fresas importadas fueron destruidas según determinaron las autoridades sanitarias.

Vacunación en España

En nuestro país la vacunación frente a la hepatitis A está recomendada en aquellas personas que presentan mayor riesgo de infección, o de enfermedad grave en caso de infectarse. Esto incluye personas con hepatopatías crónicas o receptores de trasplante hepático, personas que tienen conductas sexuales de riesgo, como los HSH o los profesionales del sexo, personas que se inyectan drogas (PID), personas que trabajan con primates no humanos y en laboratorios de hepatitis A, y viajeros que se desplazan a zonas de alta endemicidad.

En la actualidad, la vacunación infantil universal frente a la hepatitis A no está financiada por el Sistema Nacional de Salud en España. Únicamente en Ceuta y Melilla, por presentar una incidencia mayor que el resto del territorio, y Cataluña, vacunan a todos los niños con una pauta de dos dosis.

Con el objetivo de prevenir la re-emergencia del VHA, en 1998 se inició en Barcelona una campaña de vacunación a pre-adolescentes de 12 años, empleando la vacuna combinada frente a la hepatitis A+B. La incidencia se redujo de un 6,2 por 100.000 en 1996-1998, a un 2,6 en 1999-2000. Sin embargo, entre 2002 y 2009 la tasa volvió a crecer, lo cual se relacionó con la aparición de diversos brotes en los periodos 2003-2004 y 2008-2009²¹⁵, vinculados a HSH¹⁴⁰ y al consumo de marisco contaminado²³¹.

2.13. PREVENCIÓN DE LA HEPATITIS A

2.13.1. Medidas de prevención

Condiciones higiénico-sanitarias e higiene personal adecuadas

El método más eficaz para controlar la hepatitis A y otras infecciones entéricas transmitidas vía fecal-oral consiste en mejorar las medidas higiénicas, sobre todo el suministro de agua potable. Es fundamental llevar a cabo unas buenas prácticas de higiene personal, con especial énfasis en el lavado de manos. La restricción de la actividad laboral a las personas enfermas empleadas en la manipulación de alimentos resulta esencial^{1,21,2}.

Inmunización pasiva

Durante más de cincuenta años, la inmunoglobulina humana ha sido empleada como medida eficiente a corto plazo para la protección pre y post exposición contra infección por el VHA. La profilaxis preexposición vía administración intramuscular de IG es efectiva en las primeras horas tras la inyección, y la protección se extiende de 12 a 20 semanas. La profilaxis postexposición también se logra en las primeras horas tras la administración de IG, y tiene una efectividad del 80-90% cuando se suministra dentro de los 14 días siguientes a la exposición ¹.

La IG ha demostrado su utilidad en la prevención de la hepatitis A en viajeros, cooperantes y militares, e incluso para la profilaxis post exposición en brotes familiares o por exposición a una fuente común. Sin embargo, la IG nunca ha resultado útil para modificar la epidemiología de la hepatitis A en una comunidad, debido a la naturaleza transitoria de la protección, las tasas de cobertura y la incapacidad de inducir inmunidad de grupo ².

La efectividad de las vacunas inactivadas en profilaxis postexposición, unido al elevado coste de la IG y el corto periodo de protección que proporciona, han llevado a la disminución del uso de la IG ²³². Sin embargo, sigue estando recomendada en algunos grupos en los que la vacuna no ha sido ensayada o está contraindicada. Es el caso de las personas mayores de 40 años, los niños menores de 12 meses o los pacientes inmunodeprimidos o con hepatopatías crónicas.

Inmunización activa y vacunas

Todas las vacunas frente a la hepatitis A se producen a partir de cepas de VHA adaptadas a crecer en cultivos celulares de mamíferos. Esta adaptación lleva a una atenuación en la patogenicidad del virus, y se asocia a una pequeña cantidad de mutaciones en proteínas no estructurales del virus ²³³.

La protección frente al VHA inducida por la vacuna se define por un nivel de anticuerpos entre 10 y 33 mUI/mL, dependiendo del inmunoensayo empleado ²³⁴. La mayoría de estudios han adoptado 20 mIU/mL como título de referencia para la seroprotección ⁶⁹. Sin embargo, la experiencia en la práctica clínica sugiere que puede existir protección tras la administración de la vacuna incluso en ausencia de anticuerpos anti-VHA detectables mediante las técnicas habituales ²³⁵.

En la actualidad existen dos tipos de vacunas frente a la hepatitis A disponibles:

2.3.1.1. Vacunas inactivadas con formol (“muertas”)

Gracias a la existencia de un único serotipo, existen diversas vacunas inactivadas altamente eficaces. En la mayoría de países se emplean vacunas inactivadas monovalentes. Contienen hidróxido de aluminio como adyuvante, excepto cuando se emplean virosomas como estimulador inmunitario. Se almacenan a 2-8 °C, tienen una caducidad de 18-36 meses, dependiendo del fabricante, y son intercambiables. Las vacunas inactivadas están aprobadas para administrarse en mayores de 12 años, y se inyectan en el deltoides o en los músculos del muslo en dos dosis con un intervalo de 6 meses entre ellas, que puede ser extendido a 12-36 meses. Estas vacunas son sensibles a la congelación, y presentan sensibilidad al calor en temperaturas entre 28 °C y 37 °C ²³⁶.

Se han desarrollado vacunas combinadas que incluyen VHA y VHB o VHA y fiebre tifoidea, cuyo uso está destinado fundamentalmente a viajeros adultos ¹⁶³.

Todas las vacunas de virus inactivados contra la hepatitis A aprobadas han demostrado ser muy inmunógenas de forma rápida, ya que inducen seroconversiones a niveles protectores de anticuerpos en 2 semanas tras la dosis inicial ^{237,238}. El nivel de anticuerpos tras la vacunación varía con la dosis y el esquema temporal de la vacunación. Sin embargo, la administración de una sola dosis genera una respuesta de anticuerpos cuyo título es más elevado que el producido por niveles protectores conocidos de IG, y menor que los niveles medidos tras la infección natural ^{239,240}.

La eficacia de estas vacunas se probó en un ensayo controlado aleatorizado doble-ciego llevado a cabo en Tailandia en los años 90. Tras la administración de dos dosis, la eficacia protectora de la vacuna inactivada fue del 95%. Su efectividad se demuestra con los programas de inmunización a gran escala realizados en Estados Unidos, Italia o Australia, en los que se consiguió reducir la incidencia de infección por VHA en un 90-97% ²⁴¹⁻²⁴³.

La respuesta a la vacuna puede ser menor en presencia de determinados factores. Según un meta-análisis con un total de 458 pacientes VIH positivo, la tasa de respuesta a la vacunación frente al VHA fue del 64% (88). Los factores que mejor se correlacionaban con una peor respuesta fueron niveles bajos de linfocitos T CD4+ y elevada carga de ARN de VIH en plasma en el

momento de la vacunación. En un estudio prospectivo realizado en el contexto de un brote de VHA entre HSH en Taiwan, la vacunación conllevó una reducción del riesgo de infección por VHA del 93% en pacientes HSH VIH positivo ⁶⁹. Las concentraciones finales de anticuerpos alcanzadas en pacientes con hepatopatía crónica son también menores que en personas sanas, pero las tasas de seroprotección son similares. La efectividad de la vacuna disminuye en casos de cirrosis, por lo que su administración se recomienda antes del desarrollo de cirrosis siempre que sea posible ²⁴⁵.

Se han aislado mutantes que han escapado a la vacuna en pacientes VIH+ con una pauta de vacunación incompleta ³⁵. Estas condiciones son las óptimas para la selección de mutantes presentes en las cuasiespecies capaces de escapar a la neutralización de los anticuerpos ²⁴⁶, ya que la ingestión de cantidades considerables de virus por parte de pacientes con niveles bajos de IgG, incapaces de neutralizar por completo el virus, permite a la población viral replicarse en presencia de anticuerpos. Estos mutantes circularon durante un corto periodo de tiempo, probablemente por una menor capacidad de adaptación que los virus wild-type ³⁵.

Con independencia del fabricante, la experiencia global en la administración de vacunas inactivadas frente al VHA muestra un perfil de seguridad excelente, tanto en niños como en adultos. Los ensayos llevados a cabo en adultos antes de su aprobación detectaron reacciones locales en el sitio de inyección, como dolor o sensibilidad, en el 56% y 53% de los casos respectivamente ²³⁵. Entorno al 15% de los inmunizados presentó dolor de cabeza. En un estudio de seguridad y eficacia realizado en 40.000 niños, no se registraron eventos adversos relevantes relacionados con la vacuna. Dos estudios posteriores a la aprobación de las vacunas inactivadas, realizados con más de 35.000 vacunados de diferentes grupos de edad, tampoco detectaron reacciones adversas importantes ^{58,235,247}.

2.3.1.2. Vacunas vivas atenuadas:

Existen dos vacunas vivas atenuadas desarrolladas en China, basadas en las cepas H2 y L-A-1, y cuyo uso está autorizado en varios países. Se administran por vía subcutánea en niños mayores de 1 año. A pesar de no haberse registrado eventos adversos relevantes relacionados con la seguridad de estas

vacunas, su uso no está recomendado en embarazadas ni pacientes inmunodeprimidos.

Estudios en los que se comparó la inmunogenicidad de las vacunas vivas atenuadas y de las inactivadas muestran que, a pesar de que la seroconversión se alcanza de forma más lenta con las primeras, la tasa de protección generada por ambas vacunas es similar durante al menos ocho años ¹⁶³.

2.14. MANEJO DE PACIENTES CON HEPATITIS A

No existe tratamiento específico para la hepatitis A. Por lo general, se lleva a cabo un tratamiento de soporte basado en una adecuada hidratación y nutrición, y control de los síntomas, como fiebre y vómitos, con fármacos antipiréticos y antitérmicos. Para el control del prurito pueden administrarse ácido ursodesoxicólico o colestiramina ⁸⁷.

En los casos de colestasis prolongada, la respuesta a la terapia con corticoesteroides parecía ser favorable. Sin embargo, dado el prolongado periodo durante el cual se detecta ARN viral en el hígado (hasta 12 meses) (89), el uso de corticoides debe realizarse de forma cuidadosa ya que podría resultar perjudicial para el control del virus por parte del sistema inmune ⁵⁴.

El fallo hepático agudo progresa de forma rápida en una semana, por lo tanto, debe llevarse a cabo un abordaje multidisciplinar que permita reconocer los factores de mal pronóstico y facilite la toma de decisiones urgentes de cara a un posible trasplante hepático ⁵⁴.

La hepatitis A puede desencadenar hemólisis, en particular en pacientes con déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Además, la supervivencia de los eritrocitos puede verse acortada. Teniendo en cuenta que el daño renal agudo o la anemia hemolítica pueden aparecer como complicaciones de la hepatitis A, se debe realizar un análisis de sangre completo incluyendo parámetros de función renal de forma regular. La opción de hemodiálisis debe estar disponible, ya que la mitad de pacientes con hepatitis A que sufren fallo renal agudo precisan de terapia de reemplazo renal.

El pronóstico de los pacientes con hepatitis A es recuperarse sin secuelas, lo cual ocurre en la gran mayoría de los casos ⁵.

3. ANTECEDENTES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. ANTECEDENTES

El virus de la hepatitis A es causa frecuente de infección viral aguda en humanos en todo el mundo, variando ampliamente su prevalencia entre las distintas áreas geográficas. En la actualidad, la seroprevalencia en los países de la Unión Europea oscila entre intermedia y muy baja, con la mayoría de países ubicándose en esta última categoría. Existe una tendencia generalizada decreciente en el tiempo en todos los países, y un importante gradiente geográfico que aumenta desde el norte al centro, sur y este de Europa

La transmisión se produce por vía fecal-oral, a través fundamentalmente de contacto directo con personas infectadas o bien por consumo de agua o alimentos contaminados. La mejora de las condiciones higiénicas y sanitarias ha contribuido a la disminución de la incidencia de hepatitis A en las últimas décadas en España ²²⁷. Esto conlleva una menor proporción de la población inmunizada y una mayor cantidad de adultos susceptibles, etapa durante la cual la infección se manifiesta de forma sintomática. Esta situación de baja incidencia favorece la aparición de brotes esporádicos en grupos de riesgo. La transmisión del VHA entre hombres que tienen sexo con hombres se ha vinculado a la aparición de brotes desde 1970 ^{223,248,249}, algunos de ellos en nuestro país ^{140,215}.

En Málaga tuvo lugar entre los años 2006 y 2010 un aumento en la incidencia de hepatitis A ²²⁷. La mayoría de casos se produjeron en adultos jóvenes, y afectaron a varios miembros dentro de una misma familia. El 11% de los pacientes declaró haber mantenido relaciones sexuales de riesgo, y predominó el subgenotipo IA. Transcurrido este periodo, la incidencia descendió a los niveles registrados en años anteriores. Hasta 2016 no se volvieron a registrar brotes relevantes de hepatitis A en nuestra área.

En 2016, el ECDC alertó de un incremento en el número de casos de hepatitis A que afectaba fundamentalmente a hombres que tienen sexo con hombres ²⁵⁰. Los primeros países en detectar este aumento fueron Reino Unido, Holanda y Alemania. A partir de esta alerta, otros 14 países de la Unión Europea notificaron casos de hepatitis A entre HSH. El estudio a nivel molecular de la región VP1-2A del VHA reveló la implicación de tres cepas: VRD_521_2016, RIVM- HAV16-090 y V16-25801, siendo la primera la más prevalente. A pesar de las recomendaciones de la OMS y el ECDC, se estima que la cobertura vacunal frente al VHA entre HSH era baja en el momento del brote ²²³. La vacunación fue la principal medida de contención del brote recomendada por las instituciones ¹⁵⁵. Sin embargo, el desabastecimiento de vacunas frente a la hepatitis A que se produjo a nivel mundial en este periodo afectó a varios países de la Unión Europea, impidiendo la administración masiva de la misma al colectivo HSH ²²³. Del total de casos confirmados en Europa con información epidemiológica disponible, el 92% no estaban vacunados, y el 43% de ellos habían viajado a

España durante el periodo de incubación ²²³, lo cual se consideró factor de riesgo para adquirir la enfermedad en ese contexto epidemiológico ²⁵¹.

Coincidiendo con lo que estaba ocurriendo en el resto de Europa, en España los casos de hepatitis A aumentaron desde mitad de 2016 ²⁵²⁻²⁵⁵. Esta tendencia se mantuvo durante 2017, triplicándose el número de casos con respecto a los del año anterior. En 2018, la incidencia del virus disminuyó de manera considerable ²²⁸. En Andalucía, se registró un aumento en los casos de hepatitis A desde junio de 2016, afectando fundamentalmente a HSH de entre 20 y 49 años. La incidencia de hepatitis A en la Comunidad Autónoma se había mantenido estable en la década previa, a excepción del periodo 2008-2009, en el que tuvo lugar otro brote vinculado también a hombres jóvenes, en su mayoría HSH ²⁵⁶.

En los dos últimos meses de 2016, el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga detectó también un incremento inusual en el número de diagnósticos de hepatitis A, lo cual se mantuvo hasta mayo de 2017 ²²⁷.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPÓTESIS

El virus de la hepatitis A (VHA) sigue siendo una importante amenaza para la salud pública en todo el mundo, por lo que su seguimiento, estudio del origen de los brotes y la evolución de los mismos constituye un tema de especial importancia en los sistemas de vigilancia de la salud. A pesar de la vacunación a grupos de riesgo y programas de prevención de ITS, la transmisión del virus entre HSH sigue originando brotes puntuales que exigen incrementar los esfuerzos, como el acontecido en el periodo 2016-2018 en distintos puntos del mundo, considerado el más importante en nuestra provincia en los últimos tiempos. Por tanto, se hace necesario seguir estudiando la epidemiología, así como el seguimiento y características de los brotes para mejorar las estrategias de prevención de la hepatitis A. Es por ello, que se plantean los siguientes objetivos:

4.2. OBJETIVOS

- Estudio de las características clínicas y epidemiológicas del brote de hepatitis A ocurrido en Málaga durante el periodo 2016-2017.
- Estudio de las relaciones filogenéticas entre el brote ocurrido en Málaga en los años 2016-2017 con brotes ocurridos en diferentes regiones de Europa de forma simultánea.
- Análisis masivo de secuencias presentes en el suero de pacientes coinfectados con VIH.
- Análisis de aguas residuales, recogidas antes de la entrada a las principales plantas de tratamiento de aguas de Málaga, con el fin de detectar la presencia de VHA y prevenir la aparición de nuevos brotes.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. MATERIAL Y MÉTODOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. COHORTE DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

Para este estudio se incluyeron todos los casos confirmados de hepatitis A registrados por el Servicio de Microbiología del HUVV entre el 1 de marzo de 2016 y el 31 de diciembre de 2017. Este estudio fue llevado a cabo de manera retrospectiva, y se definió como caso clínico sospechoso de hepatitis A, aquel que presentaba enfermedad aguda con desarrollo progresivo de los síntomas (malestar, náuseas, anorexia, fiebre, o dolor abdominal). Se consideraron casos confirmados aquellos que cumplían los criterios de caso clínico de hepatitis A, y que se confirmaron mediante detección de IgM anti-VHA en suero. El HUVV es un Hospital General de Especialidades del Sistema Andaluz de Salud, centro de referencia para el sector oeste de la ciudad y de la provincia de Málaga, con una población asignada superior a 493.196 habitantes (año 2022). El área hospitalaria del HUVV cuenta con 30 centros de Atención Primaria distribuidos en los distritos sanitarios de Málaga, Valle del Guadalhorce y Costa del Sol. Las muestras de suero procedían tanto de servicios del propio hospital, como de centros de Atención Primaria dependientes del mismo (**Anexo A1.1**).

Se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes incluidos en el estudio recogiendo la información acerca de las siguientes variables:

Parámetros epidemiológicos

- Signos
- Datos demográficos: sexo, edad, nacionalidad y centro de procedencia.
- Factores de riesgo para la adquisición del VHA: tipo de relaciones sexuales entre hombres, PID, consumo de agua o alimentos sospechosos, viajes, contacto con niños, contacto con enfermo de VHA, en los dos meses previos.

Parámetros analíticos

- Determinaciones bioquímicas: GOT al inicio y valor pico*, GPT al inicio y pico*, GGT, bilirrubina total inicio y pico*, bilirrubina directa inicio y pico*, colesterol, LDH, PCR, albúmina, creatinina, urea y fosfatasa alcalina. * Los valores que aparecen reflejados en la base de datos corresponden a la primera determinación y al valor pico registrados en el curso clínico de la infección por VHA.
- Hemograma: Hematíes, hematocrito, leucocitos y plaquetas.
- Determinaciones relativas a la coagulación: tiempo de protrombina (%) e INR.

Parámetros clínicos: Fecha de diagnóstico microbiológico, ingreso hospitalario, signos y síntomas (líquido libre intraperitoneal, coluria, acolia, ictericia, fiebre, náuseas y vómitos) y coinfección con otras ITS (VIH, VHB, VHC, Sífilis).

5.2. ASPECTOS ÉTICOS

Dado que se trata de un estudio retrospectivo, no pudo recogerse consentimiento informado de todos los pacientes. Los datos clínicos fueron anonimizados y el estudio fue evaluado por el Comité de Ética para la Investigación Provincial de Málaga para garantizar el anonimato de los pacientes y la protección de datos de los mismos (**Anexo A1.2**).

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó empleando el programa IBM® SPSS® Statistics versión 27. Previo al análisis descriptivo, estudiamos si la distribución de la variable correspondiente se ajustaba o no a la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Aquellas variables que seguían una distribución no normal fueron analizadas mediante el test no paramétrico de Wilcoxon. La comparación de proporciones fue llevada a cabo mediante el test bilateral de Fisher. La asociación o independencia de las variables dicotómicas cuantitativas con distribución normal se determinó en las dos categorías con la prueba T de Student. En todos los casos, la significación estadística se estableció para valores de $p < 0,05$.

Mientras, las muestras de suero procedentes de los pacientes con sospecha clínica de hepatitis A se remitieron en su día al Servicio de Microbiología del HUVV, procedentes tanto de Urgencias y otros servicios hospitalarios, como de centros de Atención Primaria pertenecientes al área sanitaria del hospital. A su recepción, las muestras de suero fueron recodificadas con un número identificativo interno del laboratorio para mantener la anonimidad de los pacientes.

5.4. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DEL VHA

Con el objetivo de confirmar los casos sospechosos de hepatitis A, se realizó la detección de IgM anti-VHA en suero mediante quimioluminiscencia. Para ello, se empleó el inmunoensayo comercial automatizado VITROS™ Controls Anti-HAV IgM (Ortho-Clinical Diagnostics™, actualmente asociado a Thermo Fischer Scientific™ Inc., USA).

Todos los sueros que resultaron positivos fueron almacenados a -80°C en el Servicio de Microbiología hasta la extracción de ARN.

5.5. EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL

La extracción de ARN se llevó a cabo a partir de 300 µL de suero utilizando Speedtools RNA virus extraction kit (Biotools B&M Labs S.A., Spain) según el protocolo de la casa comercial. Posteriormente, tras su cuantificación por métodos fluorométricos (Qubit v3.0. ThermoScientific, Germany), posterior evaluación de la integridad por métodos electroforéticos (1,5% agarosa en 1x TAE, durante 45 min a 80V) y pureza por métodos espectrofotométricos (Nanodrop, ThermoScientific), se realizó una transcripción inversa a ADNc para lo cual se empleó Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific™ Inc., USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. A continuación, se amplificó la región VP1/P2A mediante una PCR anidada (nested PCR). La primera amplificación se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Michaelis²⁵⁷, utilizando los mismos primers (HAV 6.1, 5'-TAT GCY ITI TCW GGI GCI YTR GAY GG-3'; HAV 10, 5'-TCY TTC ATY TCW GTC CAY TTY TCA TCA TT-3', 614 nt). De manera resumida, se realizó una activación inicial del enzima mediante calentamiento a 95° durante 10 min, y 45 ciclos de 95° 15 s y 60° 1min. Para las dos reacciones de la nested PCR se empleó AccuStart II PCR SuperMix (vWR International, LLC, U.S.A.), una mezcla de reacción lista para su uso diseñada para amplificación por PCR rutinaria. Para la segunda PCR se utilizó de partida 10µL del producto de la anterior amplificación, siguiendo el protocolo descrito por HAV Net, Dutch National Institute for Public Health and the Environment (RIVM)²⁵⁸. El par de primers específicos para la región interna VP1/2A fueron HAV8.2-F (5'-GGATTGGTTTCCATTCARATTGCNAAAYTA-3') y HAV11-R (5'-CTGCCAGTCAGAACTCCRGCWTCCATYTC-3'). Esta segunda amplificación englobaba también un paso inicial de 6 min a 95°, y después, 40 ciclos de 95° durante 30 segundos, 60° durante 20 s y 72° durante 15 segundos. La secuencia resultante estaba constituida por 507 nt, lo cual se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa.

5.6. SECUENCIACIÓN Y GENOTIPADO

La secuenciación fue derivada y llevada a cabo por el laboratorio MacroGen Laboratory Spain (Madrid, España), usando como primer iniciador el ya mencionado HAV8.2-F. Se amplificó y secuenció la región de unión VP1/P2A de unos 500 nucleótidos (posiciones 2923 a 3440 en la cepa de referencia de VHA con número de acceso en Genbank NC_001489).

Empleando la secuencia de la región VP1/P2A, se identificó el genotipo de VHA utilizando la herramienta creada por HAVnet (RIVM) Hepatitis A Virus Genotyping Tool Version 1.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/hav/>).

5.7. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y COMPARACIÓN CON OTROS BROTES EUROPEOS

La relación entre nuestras secuencias de VHA y con las implicadas en brotes ocurridos en otros países europeos entre 2016 y 2018 se caracterizó por primera vez mediante un análisis filogenético preliminar. Todas las secuencias fueron alineadas mediante ClustalX²⁵⁹ y editadas manualmente con Jalview²⁶⁰. Aquellas secuencias del VHA recogidas de la literatura que no se correspondían con la región de unión VP1/P2A, de una longitud media de unos 500 nt, fueron suprimidas del alineamiento final. A continuación, reconstruimos la filogenia empleando el método de la máxima probabilidad con el software MEGA 11. Aplicamos el modelo de sustitución TN93, el más conveniente según el criterio de información de Akaike (CIA) determinado con FindModel, incluido en el programa MEGA11²⁶¹. La fiabilidad de cada agrupamiento en el árbol resultante fue evaluada según su valor de remuestreo basado en 1000 iteraciones, considerándose significativo cuando era superior al 70%. Además, la filogenia obtenida fue confirmada mediante análisis bayesiano si la probabilidad posterior (pp) asociada era ≥ 0.9 . La aproximación bayesiana se llevó a cabo con el programa MrBayes versión 3.2²⁶², y fue visualizada utilizando el visualizador gráfico FigTree. Para el análisis con MrBayes se utilizó como modelo evolutivo GTR+I+G (20 millones de generaciones, muestreando cada 100 generaciones, con un 20% de descarte).

5.8. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA EN PACIENTES COINFECTADOS VHA – VIH

El ARN de los pacientes co-infectados con VHA y VIH se secuenció con la finalidad de detectar y cuantificar en su totalidad los posibles virus presentes en el suero de los pacientes coinfectados. Este proceso se llevó a cabo en la Unidad de Genómica y Ultrasecuenciación (SCBI UMA), siguiendo el protocolo Kit SMARTER-Seq Stranded kit de Takara Bio. Para ello, se partió de 7 μ l con un aporte de entre 10pg-10ng de ARN total de partida. El kit permite hacer una aproximación "random" para hacer el ADNc del ARNm y ARNnc. Se eliminó el ARNr (humano) derivado de ADNc que se haya podido sintetizar mediante captura con sondas selectivas. Además, se incluyeron tanto controles positivos con ARN presente en el kit, como un control negativo con agua molecular. Las muestras se corrieron en una carrera MID del equipo Nextseq550, generando de entre 8-26 millones de lecturas por muestra y con una longitud de 2x150pb.

Las lecturas obtenidas se analizaron en el Servicio de Bioinformática y Bioinnovación de la Universidad de Málaga (SCBI-UMA), cuyos pasos se describen a continuación (esquema en la Figura 1).

1. Análisis de la calidad de las lecturas (I): FASTQC La herramienta FastQC (versión 0.11.4 ; www.bioinformatics.babraham.ac.uk) genera un informe en formato .html que permite la visualización de distintas propiedades de las lecturas obtenidas en el secuenciador, incluyendo la calidad de éstas. FastQC no realiza ninguna modificación a las lecturas, es una herramienta para generar informes de calidad. Se utilizó antes de proceder a la limpieza de las lecturas, descrita en el siguiente apartado, y después. Los datos de entrada para FastQC son las lecturas crudas. Los ficheros de salida son los informes en formato .html.
2. Limpieza de las lecturas: mediante la herramienta SeqTrimNext (versión 2.0.67; github.com/dariogf/SeqtrimNext) se alinearon las lecturas obtenidas mediante NGS con distintas plantillas que contienen las secuencias indeseadas para proceder con el análisis, de forma que permite retirar los adaptadores de secuenciación de Illumina, las secuencias con indeterminaciones (N) introducidas en la secuenciación, las lecturas con una calidad (Phred) inferior a 20 y, para este análisis, las secuencias que corresponden al genoma humano, consideradas contaminantes. Los datos de entrada para SeqTrimNext son las lecturas crudas. La plantilla utilizada para retirar los contaminantes humanos corresponde a la versión GRCh37(hg19) del genoma humano, disponible en la base de datos Assembly (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>). SeqTrimNext alinea, por defecto, fragmentos de 22 nucleótidos para realizar la limpieza. En este caso, al utilizar como plantilla el genoma humano, el volumen de secuencias para el alineamiento era muy elevado. Para reducir el tiempo de cómputo, en este análisis se utilizó una ventana de similitud de 90. Esto quiere decir que SeqTrimNext utiliza fragmentos de 90 nucleótidos para alinear las lecturas a la plantilla del genoma humano y comprobar si constituyen un contaminante. El porcentaje de secuencias rechazadas utilizando esta ventana de similitud es menor que usando una ventana de 22, al ser más grandes los fragmentos que deben alinear. SeqTrimNext genera ficheros de salida que contienen las lecturas pareadas limpias, las lecturas no pareadas limpias, los parámetros utilizados y una estadística de los resultados.
3. Análisis de la calidad de las lecturas (II) con FASTQC: Tras obtener las lecturas limpias como ficheros de salida del SeqTrimNext, se generaron los nuevos informes de FastQC correspondientes a cada muestra de la misma forma que en el paso 1.

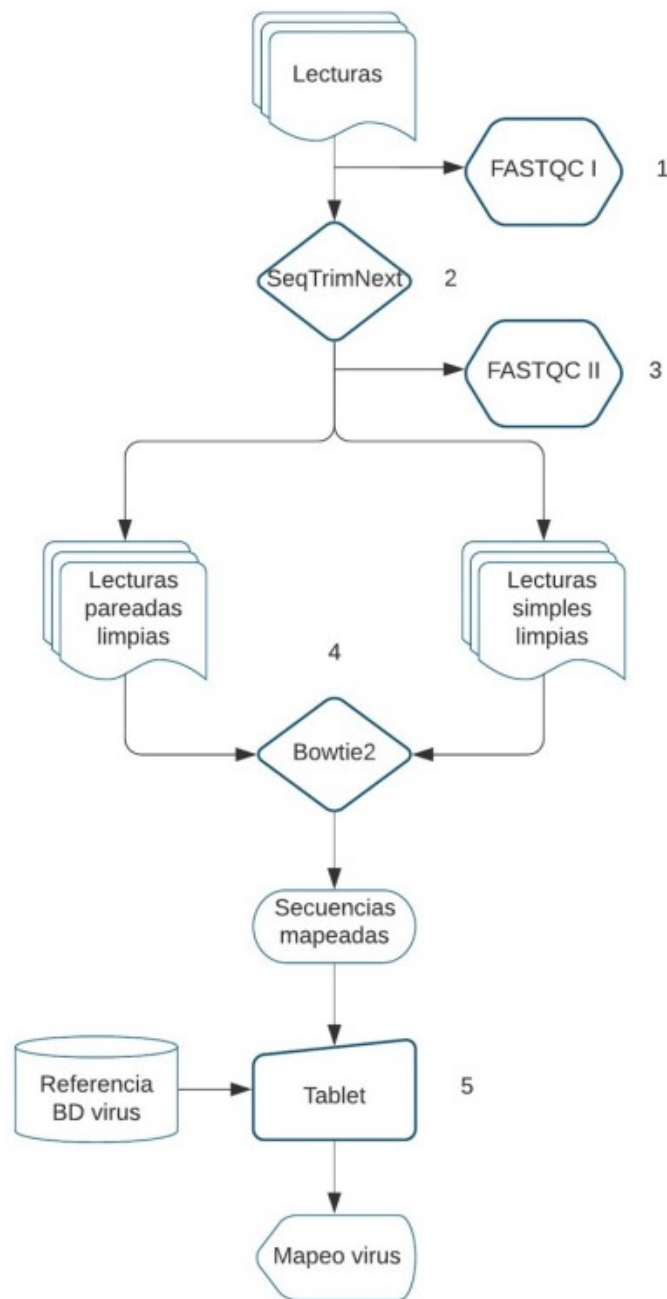


Figura 1. Flujo de trabajo del análisis bioinformático. Las herramientas utilizadas se encuentran marcadas con un borde más grueso e identificadas con su número correspondiente.

4. Alineamiento con BOWTIE2: Bowtie2 (versión 2.2.9; <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2>) es una herramienta para alinear lecturas obtenidas mediante NGS a grandes secuencias de referencia. Para este análisis, la referencia es una base de datos de virus que contiene todos los virus secuenciados y almacenados en la base de datos Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) en formato .fasta. Los datos de entrada para Bowtie2 son los datos de salida de SeqTrimNext, es decir, las lecturas pareadas y no pareadas limpias. En el alineamiento con Bowtie2, se obtuvieron: (1) varios

ficheros de salida en formato .fastq para cada muestra, que contienen las secuencias de las lecturas pareadas y no pareadas que mapean frente a la base de datos de virus, (2) un fichero en formato .bam, un fichero binario que contiene los datos de alineamiento, y (3) un fichero que contiene una estadística de los resultados. El fichero .bam puede utilizarse para visualizar el alineamiento.

5. Visualización del alineamiento: Se utilizó la aplicación Tablet (versión 1.19.09.03; <https://ics.hutton.ac.uk/tablet/>) para la visualización de ensamblajes y alineamientos de secuencias procedentes de NGS. Para ello, es necesario proporcionarle a la aplicación el fichero .bam, que contiene los datos del alineamiento, y el fichero de la referencia utilizado, es decir, la base de datos de virus (.fasta). Se realizó la visualización del alineamiento de la muestra Y_S8 como prueba.

5.9. DETECCIÓN DE VHA A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES

En el marco de otros proyectos de investigación, y con la ayuda y colaboración de la Cátedra del Litoral (UMA, Málaga), se recogieron muestras de aguas de desecho (n=8) de sus colectores antes de la entrada a las principales plantas de tratamiento de aguas de Málaga durante el mes de junio de 2021. Para la concentración de muestras se utilizó el método de absorción-precipitación de $\text{Al}(\text{OH})_3$, descrito previamente por Randazzo y colaboradores, y ampliamente empleado para concentrar virus entéricos en aguas residuales²⁶³. De manera resumida, se tomaron 200mL de cada muestra, se ajustó el pH a 6.0 y se precipitó el $\text{Al}(\text{OH})_3$ añadiendo AlCl_3 al 0.9 N en una proporción 1/100. A continuación, el pH volvió a ajustarse a 6.0, y las muestras se agitaron 15 min a temperatura ambiente. Después, las muestras se concentraron mediante centrifugación a 1,700 g durante 20 min. El pellet se resuspendió en 10 mL de extracto de ternera al 3% a pH 7.4, y se agitó de nuevo durante 10 minutos. El concentrado se recuperó mediante centrifugación a 1,900 x g durante 30 min, y el pellet fue resuspendido en 1mL de tampón fosfato salino (PBS). Todas las muestras fueron preparadas por triplicado, y se añadió 10 uL de Mengovirus (Mengo Extraction Control, ThermoScientific) como control de proceso. El ADNc obtenido se procesó como se describe en el apartado “Análisis filogenético y comparación con otros brotes europeos” (página 66).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

6. RESULTADOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

6. RESULTADOS

6.1. BROTE DE HEPATITIS A EN MÁLAGA DURANTE EL PERIODO 2016-2017

De marzo de 2016 a diciembre de 2017, se detectaron 184 casos de hepatitis A, disponiendo de muestra de suero en 106 de ellos (57,6%). La mayor incidencia se registró en marzo de 2017, con 25 nuevos casos (13,6%) (**Figura 2**).

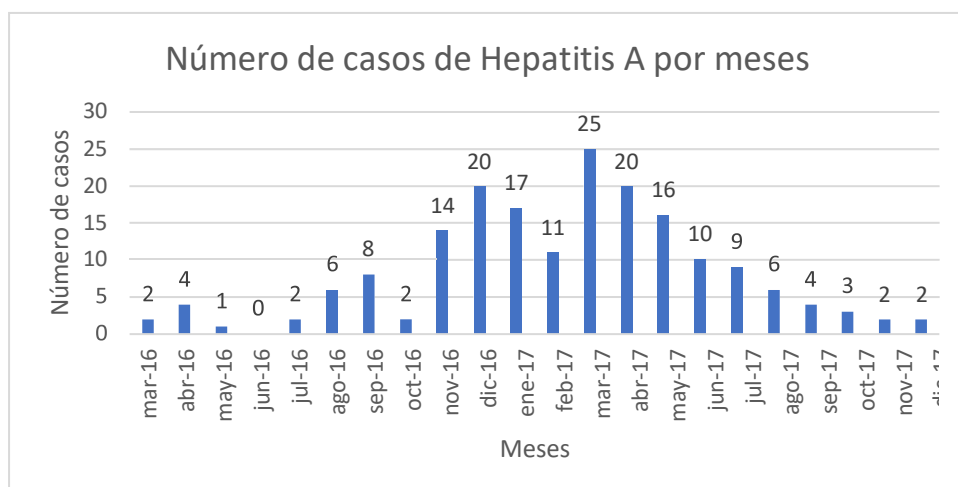


Figura 2. Casos de hepatitis A detectados en el Hospital Virgen de la Victoria (Málaga) a lo largo del tiempo, desde los primeros casos reportados en marzo de 2016 hasta el final del periodo de estudio (diciembre 2017).

6.2. PROCEDENCIA DE LOS CASOS

En la **figura 3** se indica el origen de las muestras de pacientes diagnosticados de hepatitis A durante el periodo de estudio. La mayor parte de ellas procedían del Servicio de Urgencias (45%) del Hospital, seguido de Centros de Atención Primaria (24%), hospitalización (21%) y Consultas Externas (6%). Se desconoce el centro de procedencia de 7 (4%) de las muestras positivas para VHA. Se detectó una (1%) muestra proveniente del Hospital Regional Universitario de Málaga.

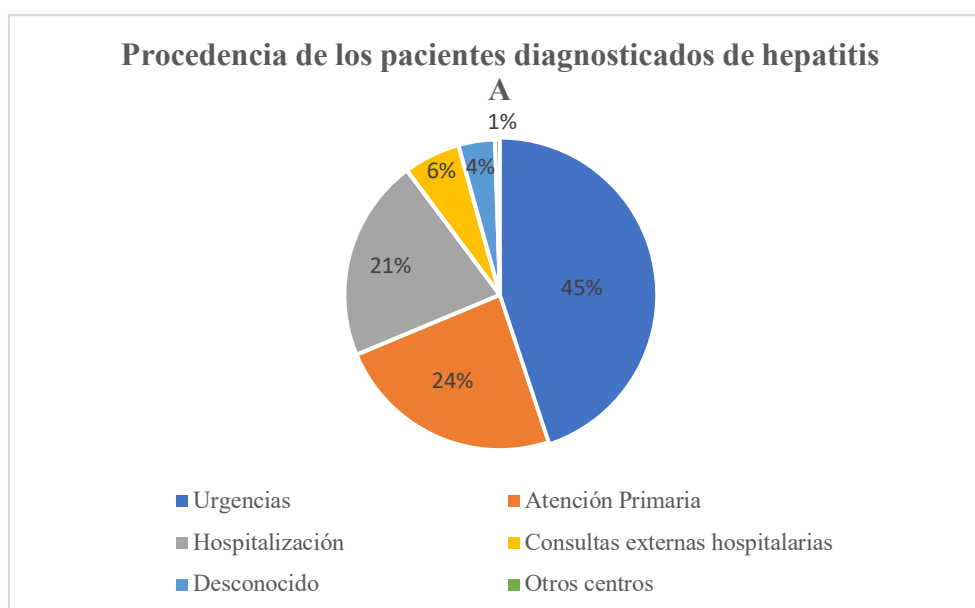


Figura 3. Centro de procedencia de los pacientes diagnosticados de hepatitis A.

Dentro del grupo de pacientes procedentes de Atención Primaria, el centro de Cruz del Humilladero aportó el mayor número de muestras positivas (16,3%), seguido de Cártama Estación (9,3%) y Torremolinos (9,3%) (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución por centros de los pacientes diagnosticados de hepatitis A procedentes de Atención Primaria.

Centro de Atención Primaria	Número de muestras positivas para VHA	% sobre el total de muestras de AP
Alhaurín El Grande	1	2,3
Alhaurín de la Torre	2	4,6
Álora	1	2,3
Carihuela	3	7
Cártama Estación	4	9,3
Churrana	3	7
Cruz del Humilladero	7	16,3
Delicias	2	4,6
El Cónsul	2	4,6
Huelin	3	7
La Luz	1	2,3
Portada Alta	3	7
San Andrés - Torcal	2	4,6
Teatinos	4	9,3
Tiro Pichón	2	4,6
Torremolinos	4	9,3
Total	43	100

Las muestras procedentes del hospital provenían bien de pacientes que acudieron a Urgencias, pacientes ingresados, o de pacientes que acudieron a Consultas Externas de los diferentes servicios del centro. El Servicio de Aparato Digestivo aglutinó el mayor número de casos de hepatitis A (21; 53,8%) entre los pacientes ingresados, seguido de Medicina

Interna (16; 41%), y Cirugía (1; 2,6%) y Oncología (1; 2,6%) (**Tabla 2**). Del total de pacientes diagnosticados a través de Consultas Externas hospitalarias (11; 6%), 5 (45%) procedían de Aparato Digestivo, 5 (45%) de Medicina Interna, y 1 (9,1%) de Dermatología (**Tabla 3**).

Tabla 2. Servicio de origen de los pacientes hospitalizados que fueron diagnosticados de hepatitis A durante su ingreso.

Servicio	Número de muestras positivas para VHA	% sobre el total de hospitalizados
Aparato Digestivo	21	53,8
Cirugía	1	2,6
Medicina Interna	16	41
Oncología	1	2,6
Total	39	100

Tabla 3. Servicios de origen de los pacientes procedentes de Consultas Externas (CE) hospitalarias.

Servicio	Número de muestras positivas para VHA	% sobre el total de muestras de CE
Aparato Digestivo	5	45,45
Dermatología	1	9,1
Medicina Interna	5	45,45
Total	11	100

6.3. DATOS DEMOGRÁFICOS

Las edades de los pacientes estaban comprendidas entre los 2 y los 81 años. La mediana de edad fue de 33 años (RIC=79), y la media, de 34 años ($\sigma=14,1$). De ellos, 157 (84,9 %) eran hombres y 28 (15,1 %) mujeres, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,001$). La media de edad de los hombres fue de 35 años ($\sigma=14,1$), mientras que la de las mujeres fue de 31 años ($\sigma=19,7$). La diferencia de edad entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa ($p=0.307$).

En la **figura 4** aparece representado el porcentaje de casos distribuidos por grupo de edad, observándose el mayor número de pacientes en el intervalo de 19 a 65 años, con 161 casos (87,5%).

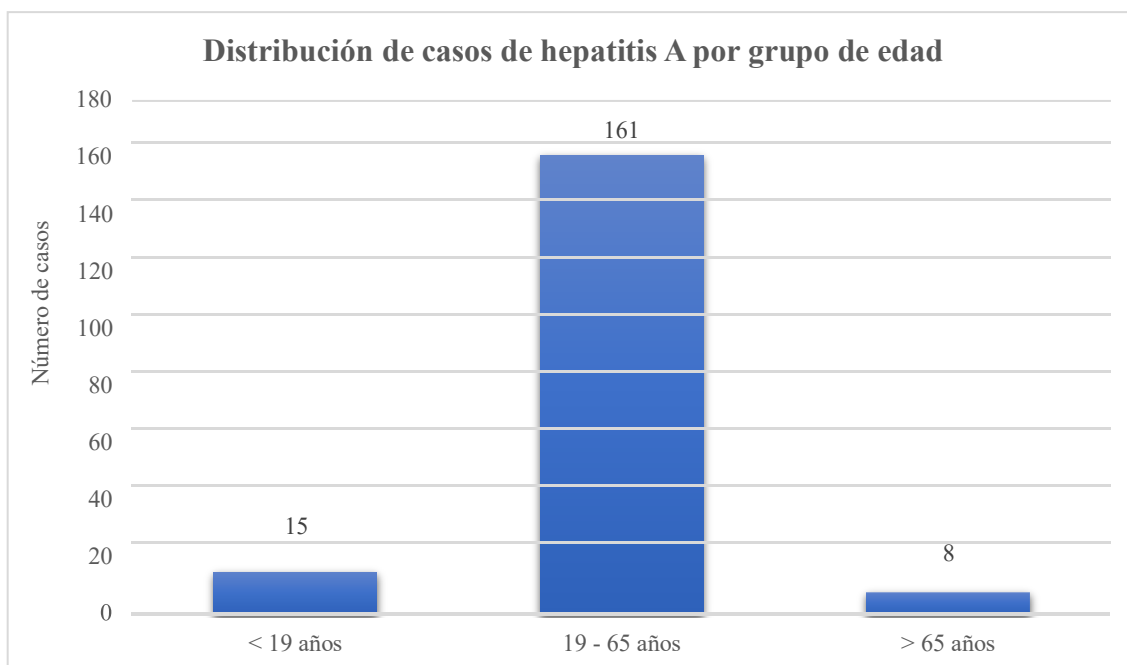


Figura 4. Distribución de los casos de hepatitis A por grupo de edad.

Atendiendo a la nacionalidad, el 91,8% de los pacientes eran españoles, el 2,7% eran británicos, y el 5,5% restante procedían de diferentes países recogidos en la tabla 4.

Tabla 4. País de origen de los pacientes diagnosticados de hepatitis A.

País de origen	Frecuencia	Porcentaje (%)
Argentina	1	0,5
Bolivia	1	0,5
Bulgaria	1	0,5
Colombia	1	0,5
España	169	91,8
Finlandia	1	0,5
Marruecos	1	0,5
Reino Unido	5	2,7
República Checa	1	0,5
Rumanía	1	0,5
Rusia	1	0,5
Venezuela	1	0,5

6.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

En cuanto a las manifestaciones clínicas, el 85,3% de los pacientes presentó uno o varios signos y/o síntomas asociados a la infección por VHA. La **tabla 5** recoge las manifestaciones clínicas más comunes, y su frecuencia en este grupo de pacientes, siendo la coluria (64,7%) seguida de la ictericia (58,2%) los signos más habituales. Por su parte, la fiebre (53,8 %) y las náuseas (53,3%) fueron los síntomas más frecuentes.

Tabla 5. Manifestaciones clínicas asociadas a la hepatitis A y frecuencia de presentación en nuestro grupo de pacientes

Signos	Frecuencia	Porcentaje
Coluria	119	64,7 %
Ictericia	107	58,2 %
Acolia	51	27,7 %
Líquido libre	18	9,8 %
Síntomas		
Fiebre	99	53,8 %
Náuseas	98	53,3 %
Vómitos	73	39,7 %
Diarrea	35	19,0 %

En cuanto a los parámetros bioquímicos, la **tabla 6** recoge los valores de los diferentes parámetros bioquímicos analizados en los pacientes del estudio. Como se puede observar, todos los parámetros, a excepción de la albúmina, la creatinina sérica y la urea, se vieron afectados, ya que sus valores medios se encuentran fuera del rango de la normalidad. Las aminotransferasas constituyen los parámetros más afectados. Los valores de GOT fueron de media 32,6 veces superiores al valor normal en el momento del diagnóstico de la infección, y 40,4 veces superiores cuando se alcanzaba el valor máximo. Con respecto a la GPT, superaba de media en 38,4 veces el valor normal al diagnóstico, y 40,5 veces cuando se alcanzaba el máximo.

Tabla 6. Valores medios de los parámetros bioquímicos analizados en los pacientes diagnosticados de hepatitis A.

	Media	Desviación típica	Valores normales
GOT diagnóstico (UI/L)	1305	1331	8 – 40
GOT pico (UI/L)	1617	1693	8 – 40
GPT diagnóstico (UI/L)	1614	1657	12 – 42

	Media	Desviación típica	Valores normales
GPT pico (UI/L)	1703	1773	12 – 42
GGT (UI/L)	272	246	9 – 52
B total inicio (mg/dL)	5,69	3,86	0,1 – 1,2
B total pico (mg/dL)	6,65	5,72	0,1 – 1,2
B directa inicio (mg/dL)	5,38	2,50	0,1 – 0,3
B directa pico (mg/dL)	5,69	2,47	0,1 – 0,3
Fosfatasa alcalina (UI/L)	198	143	44 - 147
LDH (UI/L)	530	460	130 - 240
Colesterol (mg/dL)	143	62,3	122 - 220
Proteína C reactiva (mg/dL)	12,55	12,59	< 5
Albúmina (g/dL)	3,37	0,541	3,4 – 5,4
Creatinina (mg/dL)	0,88	0,235	0,33 – 1,13
Urea (mg/dL)	25,28	9,81	15 - 44

GOT = Glutámico oxalacético transaminasa; GGT = Gamma glutamil transferasa; B = Bilirrubina; LDH = Lactato deshidrogenasa.

Antes de comparar los valores medios de parámetros bioquímicos de hombres y mujeres, se verificó la distribución normal de los resultados mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El resultado del test resultó no ser significativo por lo que no se pudo rechazar hipótesis nula, y se asumió una distribución normal de los datos. Se realizó la prueba de T de Student para comparar medias.

Tal y como recoge la **tabla 7**, no existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las alteraciones bioquímicas observadas en hombres y mujeres, a excepción de los valores de LDH, más elevados en las mujeres ($p < 0,001$).

Tabla 7. Parámetros bioquímicos medios recogidos en hombres y mujeres diagnosticados de hepatitis A.

	Hombre Media (Desv. Estándar)	Mujer Media (Desv. Estándar)	Significación (P)
GOT diagnóstico	1332,32 (1321,749)	1145,73 (1407,424)	0,544
GOT pico (UI/L)	1666,03 (1737,699)	1336,12 (1412,195)	0,370
GPT diagnóstico	1681,76 (1679,33)	1301,39 (1560,112)	0,380

	Hombre Media (Desv. Estándar)	Mujer Media (Desv. Estándar)	Significación (P)
GPT pico (UI/L)	1744,30 (1819,12)	1494,09 (1537,473)	0,547
GGT (UI/L)	288,10 (254,883)	167,58 (142,152)	0,114
B total inicio (mg/dL)	6,0104 (3,85034)	3,5962 (3,26874)	0,007
B total pico (mg/dL)	6,7937 (5,04313)	5,7687 (8,95365)	0,417
B directa inicio (mg/dL)	5,4881 (2,51271)	4,3308 (2,13897)	0,127
B directa pico (mg/dL)	5,8743 (2,46245)	4,3271 (2,10872)	0,015
Fosfatasa alcalina (UI/L)	199,94 (138,108)	189,50 (187,889)	0,831
LDH (UI/L)	504,81 (426,863)	778,18 (690,024)	0,060
Colesterol (mg/dL)	142,79 (65,513)	146,73 (46,529)	0,826
Proteína C reactiva (mg/dL)	12,4626 (10,08972)	13,2467 (25,12516)	0,822
Albumina (g/dL)	3,3571 (0,54735)	3,4650 (0,50399)	0,556
Creatinina (mg/dL)	0,9162 (0,21879)	0,6536 (0,20549)	<0,001
Urea (mg/dL)	25,52 (9,653)	22,82 (11,496)	0,385

En cuanto a la comparación entre la bioquímica de niños y adultos, la **tabla 8** recoge los valores medios de las determinaciones bioquímicas realizadas en niños y adultos. Tampoco existieron diferencias significativas a nivel estadístico entre los parámetros bioquímicos de estos dos grupos, salvo en el caso de la creatinina sérica, cuyo valor medio en adultos casi duplicó la media recogida en el grupo de los niños ($p < 0,001$).

Tabla 8. Parámetros bioquímicos medios recogidos en niños y adultos diagnosticados de hepatitis A

	Niños (n=15) Media (Desv. Estándar)	Adultos (n=169) Media (Desv. Estándar)	Significación (P)
GOT diagnóstico (UI/L)	844,80 (723,240)	1321,21 (1345,316)	0,433
GOT pico (UI/L)	956,33 (702,210)	1641,40 (1715,442)	0,332
GPT diagnóstico (UI/L)	596,86 (848,082)	1689,63 (1680,597)	0,092

	Niños (n=15) Media (Desv. Estándar)	Adultos (n=169) Media (Desv. Estándar)	Significación (P)
GPT pico (UI/L)	670,13 (813,277)	1768,43 (1798,995)	0,089
GGT (UI/L)	84,75 (105,585)	281,14 (247,666)	0,119
B total inicio (mg/dL)	1,8471 (2,22567)	5,8686 (3,82828)	0,007
B total pico (mg/dL)	7,1588 (15,43518)	6,6269 (4,91377)	0,925
B directa inicio (mg/dL)	53,7500 (1,62635)	5,4034 (2,50240)	0,355
B directa pico (mg/dL)	3,7667 (1,15036)	5,7295 (2,47441)	0,174
Fosfatasa alcalina (UI/L)	437,00 (366,281)	192,71 (134,179)	0,017
LDH (UI/L)	-	530,08 (460,325)	-
Colesterol (mg/dL)	157,60 (20,379)	142,60 (63,995)	0,605
Proteína C reactiva (mg/dL)	2,4750 (1,30815)	12,7105 (12,62526)	0,256
Albúmina (g/dL)	3,9150 (0,49642)	3,3430 (0,53138)	0,038
Creatinina (mg/dL)	0,4686 (0,26854)	0,8987 (0,21578)	<0,001
Urea (mg/dL)	22 (-)	25,31 (9,846)	0,739

Los pacientes no presentaron por lo general grandes alteraciones en la fórmula del hemograma ni en la coagulación, ya que los valores medios de los parámetros correspondientes se encuentran dentro del rango de la normalidad (**Tabla 9**). Sin embargo, un paciente precisó ingreso en la Unidad de Medicina Intensiva durante 3 días por coagulopatía severa (INR 2,2).

Tabla 9. Hemograma y coagulación de los pacientes diagnosticados de hepatitis A.

	Media	Desviación típica	Valores normales
Leucocitos (x10⁹/L)	6,296	2,5294	4 – 10,5
Plaquetas (x10⁹/L)	230,02	83,208	140 – 450
Hematocrito (%)	43,563	4,5638	35 – 46
Tiempo protrombina (%)	73,444	18,9005	80 - 120

INR	1,2356	0,21272	0,8 – 1,2
------------	--------	---------	-----------

6.5. INGRESO

De los 184 pacientes diagnosticados de hepatitis A, precisaron ingreso hospitalario 46, lo cual supone un 24,9%. 41 (89,1%) eran hombres y 5 (10,9%), mujeres, aunque esta diferencia demostró no ser estadísticamente significativa ($p=0,352$).

La edad media de los pacientes que ingresaron fue de 36,6 años ($\sigma=12,20$), mientras que la mediana fue de 35,5 (RIC=57), superior a la de los no ingresados, cuya media fue de 33,7 años ($\sigma=14,64$), siendo esta diferencia no significativa a nivel estadístico ($p=0,238$). La mediana del tiempo de estancia fue de 3 días (RIC 0-6). El paciente que precisó ingreso en la Unidad de Medicina Intensiva por coagulopatía severa permaneció en la misma 3 días.

Un hecho importante son las coinfecciones con otras ITS. Las coinfecciones con otros patógenos de transmisión sexual que presentaban los pacientes cuando fueron diagnosticados de hepatitis A se recogen en la **tabla 10**. La ITS más frecuente fue el VIH, presente en el 10,8% de pacientes, seguida de la sífilis (7%). El porcentaje de VIH entre los HSH aumentaba hasta el 24,4%. El 100% de los pacientes coinfectados por el VIH eran HSH.

Tabla 10. Coinfecciones con otras ITS presentadas por los pacientes al diagnóstico de hepatitis A.

	Número de determinaciones realizadas (N)	Número de pacientes coinfectados	% coinfección sobre N	% coinfección sobre total de Casos de hepatitis A
VIH	143	20	14	10,8
VHC	170	1	0,59	0,5
VHB	167	0	0	0
Sífilis	79	13	16,45	7

El 10,8% de los pacientes diagnosticados de hepatitis A presentaban coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Todos eran hombres, con edades comprendidas entre los 25 y los 50 años (Media 36; mediana 37). De ellos 4 (20%) presentaban además serología positiva para *Treponema pallidum*, agente etiológico de la sífilis, determinada mediante pruebas treponémicas (ELISA) y no treponémicas (RPR).

En cuanto a las alteraciones analíticas de los pacientes coinfectados por VIH frente a las de los no coinfectados, no se registraron grandes diferencias, a excepción de los valores de la creatinina sérica, significativamente superiores en el grupo de los coinfectados ($p<0,001$) (**Tabla 11**).

Tabla 11. Valores bioquímicos medios de los pacientes con hepatitis A coinfectados por el VIH frente a la de los no coinfectados.

	Pacientes VIH Media (Desv. Estándar)	Pacientes no VIH Media (Desv. Estándar)	Significación (P)
GOT diagnóstico (UI/L)	1219,27 (1358,521)	1350,13 (1334,403)	0,723
GOT pico (UI/L)	1451,11 (1116,040)	1771,46 (1866,607)	0,470
GPT diagnóstico (UI/L)	1323,23 (1190,574)	1875,60 (1810,833)	0,297
GPTpico (UI/L)	1697,67 (1091,665)	1875,20 (1965,648)	0,734
GGT (UI/L)	276,23 (264,321)	303,55 (255,470)	0,729
B total inicio (mg/dL)	6,3171 (4,63864)	6,0766 (3,76754)	0,827
B total pico (mg/dL)	7,5118 (4,53302)	6,9117 (5,22064)	0,654
B directa inicio (mg/dL)	5,6309 (2,63243)	5,5150 (2,55907)	0,888
B directa pico (mg/dL)	6,5964 (2,67800)	5,7258 (2,48889)	0,227
Fosfatasa alcalina (UI/L)	237,36 (219,858)	190,96 (119,928)	0,326
LDH (UI/L)	385,75 (192,643)	542,07 (458,612)	0,248
Colesterol (mg/dL)	145,38 (95,997)	135,16 (61,076)	0,687
Proteína reactiva (mg/dL)	^C 10,5885 (8,16306)	13,1978 (13,59303)	0,502
Albúmina (g/dL)	3,2300 (0,57256)	3,2820 (0,53797)	0,791
Creatinina (mg/dL)	1,0862 (0,44009)	0,8869 (0,15047)	<0,001
Urea (mg/dL)	25,83 (11,416)	24,35 (9,055)	0,608

La **tabla 12** recoge los valores medios relativos al hemograma y la coagulación de los citados grupos. No se registraron diferencias significativas en los parámetros de coagulación y

hemograma entre pacientes coinfectados por VIH y no coinfectados ($P>0,001$).

Tabla 12. Valores de hemograma y coagulación medios de los pacientes con hepatitis A coinfectados por el VIH frente a la de los no coinfectados.

	Pacientes VIH Media (Desv. Estándar)	Pacientes no VIH Media(Desv. Estándar)	Significación (P)
Hemáties	4,953 (0,5755)	5,079 (0,7154)	0,515
Hto	42,747 (4,3956)	43,821 (4,5463)	0,391
Leucocitos	5,407 (1,1689)	6,338 (2,7312)	0,196
Plaquetas	239,13 (117,471)	220,14 (78,433)	0,413
TP (%)	76,357 (15,1390)	70,827 (18,3280)	0,283
INR	1,2193 (0,15380)	1,2567 (0,20827)	0,519

6.6. COMPLICACIONES

No se registraron casos de encefalopatía hepática, fallo hepático fulminante, necesidad de transplante ni *exitus*. Un paciente presentó alteraciones importantes en la coagulación (TP (%) = 44; INR = 2,2), motivo por el cual precisó de ingreso en la Unidad de Medicina Intensiva.

6.7. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo para la adquisición del VHA que se registraron en los pacientes diagnosticados de hepatitis A aparecen reflejados en la **tabla 13**. La conducta de riesgo detectada con mayor frecuencia fueron las relaciones homosexuales entre hombres (HSH) (44,5%), seguido de las relaciones sexuales sin protección en los dos meses previos (28,8%). El consumo de agua o alimentos que pudiesen estar contaminados se presentó únicamente en un 2,7% de los casos.

Tabla 13. Factores de riesgo para la adquisición del VHA que presentaron los pacientes diagnosticados de hepatitis A.

Factores de riesgo	Frecuencia	Porcentaje (%)
HSH	82	44,5
Relación riesgo (2 meses previos)	53	28,8
Consumo agua/alimentos sospechosos	5	2,7
Viajes zonas riesgo elevado	4	2,2
Contacto niños	2	1,1
Contacto enfermo	22	12

6.8. ANÁLISIS GENOTÍPICO Y FILOGENÉTICO

De los 106 sueros de pacientes congelados solo se obtuvo ARN de calidad suficiente para poder realizar el resto de procedimientos de 27 muestras, en las cuales se amplificó la región VP1/2A del VHA. Dos secuencias fueron descartadas por ser sugestivas de contaminación. Por tanto, se dispuso finalmente de 25 secuencias (13,6% del total de casos reportados) para realizar el análisis filogenético con el objetivo de comprobar la existencia de un brote. De las 25, 6 secuencias (24%) fueron obtenidas en marzo de 2017; otras 4 (16%), en junio de 2017; y las restantes, en diferentes momentos a lo largo de todo el periodo de estudio. Para el análisis genotípico se empleó la herramienta HAV Genotyping Tool versión 1.0 de HAVNET (RIVM), que concluyó que 20 de las 25 muestras analizadas pertenecían al genotipo IA (tabla 14). Las 5 secuencias restantes no pudieron ser genotipadas mediante esta herramienta, a pesar de corresponderse con la región correcta (Anexo 1.3). Sin embargo, la relación filogenética con las cepas de referencia de cada genotipo parece indicar que pertenecerían también al genotipo IA (figura 5).

Tabla 14. Resultados del análisis genotípico de las secuencias de VHA.

Nombre	Longitud	Especie	Soporte BLAST	Subgenotipo	Soporte filogenético
18_HAV	510	VHA	96,6	VHA IA	96,0
11_HAV	368	VHA	95,0	VHA IA	89,0
13_HAV	510	VHA	96,6	VHA IA	97,0
26_HAV	511	VHA	91,3	VHA IA	100,0
27_HAV	510	VHA	90,5	VHA IA	94,0
4_HAV	510	VHA	94,0	VHA IA	100,0
20_HAV	509	VHA	97,8	VHA IA	100,0
22_HAV	510	VHA	94,7	VHA IA	98,0
14_HAV	510	VHA	94,8	VHA IA	90,0
6_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	97,0
7_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	94,0
23_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	98,0
1_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	98,0
8_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	99,0
16_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	96,0
15_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	97,0
2_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	93,0
3_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	99,0
21_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	91,0
24_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	96,0
10_HAV	510	VHA	96,8	VHA IA	93,0
17_HAV	511	VHA	90,3	VHA IA	72,0
9_HAV	217	VHA	96,7	No asignado	
12_HAV	292	VHA	96,9	No asignado	
5_HAV	274	VHA	95,9	No asignado	

Con el objetivo de confirmar la relación de los numerosos casos de hepatitis A surgidos en nuestra área con los brotes europeos del mismo periodo, se realizó un análisis filogenético (figura 5). Para ello, incluimos la secuencia V16-25801 (núm. acceso GenBank LT796556.1) reportada por primera vez en Alemania²⁶⁴, y las secuencias BCN17_HAV_01 (núm. acceso GenBank MF805869.1) y BCN17/HAV/06 (núm. acceso GenBank

MF805872.1), idénticas a las secuencias VRD_521_2016 y RIVM-HAV16-090, vinculadas originariamente a los clústers epidémicos en Reino Unido y Holanda, respectivamente ²⁶⁵. Las secuencias de referencia incluidas en el análisis, tomadas de GenBank, fueron las siguientes: Genotipo IA: EU131373; AB020565.1; Genotipo IB: M14707; DQ646426; NC001489; AF314208; Genotipo IIA: AY644676; Genotipo IIB: AY644670; Genotipo IIIA: AJ299464; DQ991030; AB279733; y Genotipo IIIB: AB279735; AB425339; AB258387. Los genotipos diferentes a IA fueron utilizados como grupos externos y aparecen en color amarillo, y con números romanos designando el genotipo al que pertenecen. Sólo se muestran las ramas con una proporción de Bootstrap superior al 70%. Las cepas prototipo de los brotes europeos (VRD_521_2016, V16-25801 y RIVM-HAV16-090; o las idénticas a ellas) y el país de origen se indican en diferentes colores.

De las 25 secuencias estudiadas, 20, obtenidas entre abril de 2016 y octubre de 2017, conformaban un clúster monofilético (Clúster I) bien definido (Bootstrap=88%), el cual se relacionaba con BCN17/HAV/01 (número de acceso en Genbank MF805869), una cepa de VHA idéntica a VRD_521_2016, aislada por primera vez en un paciente de Reino Unido ^{255,266}. La presencia de este clúster de transmisión local relacionado con una de las cepas europeas se confirmó también mediante análisis bayesiano con una probabilidad posterior (pp) asociada de 0.99 (**Figura 5**). La filogenia fue inferida con el modelo TN93 usando una distribución Gamma (+G) con 5 categorías, de acuerdo a los resultados obtenidos de FindModel (mostrado en el **anexo A1.4**). Además, otro clúster de transmisión, el clúster III, que comprendía dos cepas locales (20 y 4 HAV Málaga) asociadas a la cepa de VHA holandesa original, no pudo ser confirmado mediante análisis bayesiano (**Figura 5**). Sin embargo, si forzábamos la topología con el comando restringido, el agrupamiento de estas tres cepas se sostenía desde el punto de vista estadístico (**anexo A1.5**). Por otro lado, hubo otras dos secuencias, 26 y 27 HAV Málaga, que se agrupaban en el mismo clúster (Clúster II, bootstrap=100%) pero sin presentar relación filogenética con ninguna de las cepas europeas. Además, hubo una secuencia (22 HAV Málaga) que se mostró más separada a nivel filogenético del resto.

El clúster I SP/UK estaba compuesto en su mayoría por hombres españoles (80%), con una mediana de edad de 32.5 años (27.8-49.8). Para un alto porcentaje de miembros de este clúster (60%) no fue posible averiguar el factor de riesgo, pero una cuarta parte de estos pacientes se autodefinían como hombres que tienen sexo con hombres. De los 20 pacientes incluidos en el clúster, 4 (15%) presentaron coinfección con el VIH, estando uno de ellos coinfectado además por *Treponema pallidum*. Todos los miembros, a excepción de 2, mostraron alguna de las manifestaciones clínicas típicas de la hepatitis, siendo coluria (80%), fiebre (65%), malestar (60%) e ictericia (55%) las predominantes. Con respecto a lo ocurrido

en la cohorte general, un mayor porcentaje de pacientes pertenecientes al clúster I precisaron ingreso hospitalario (35%).

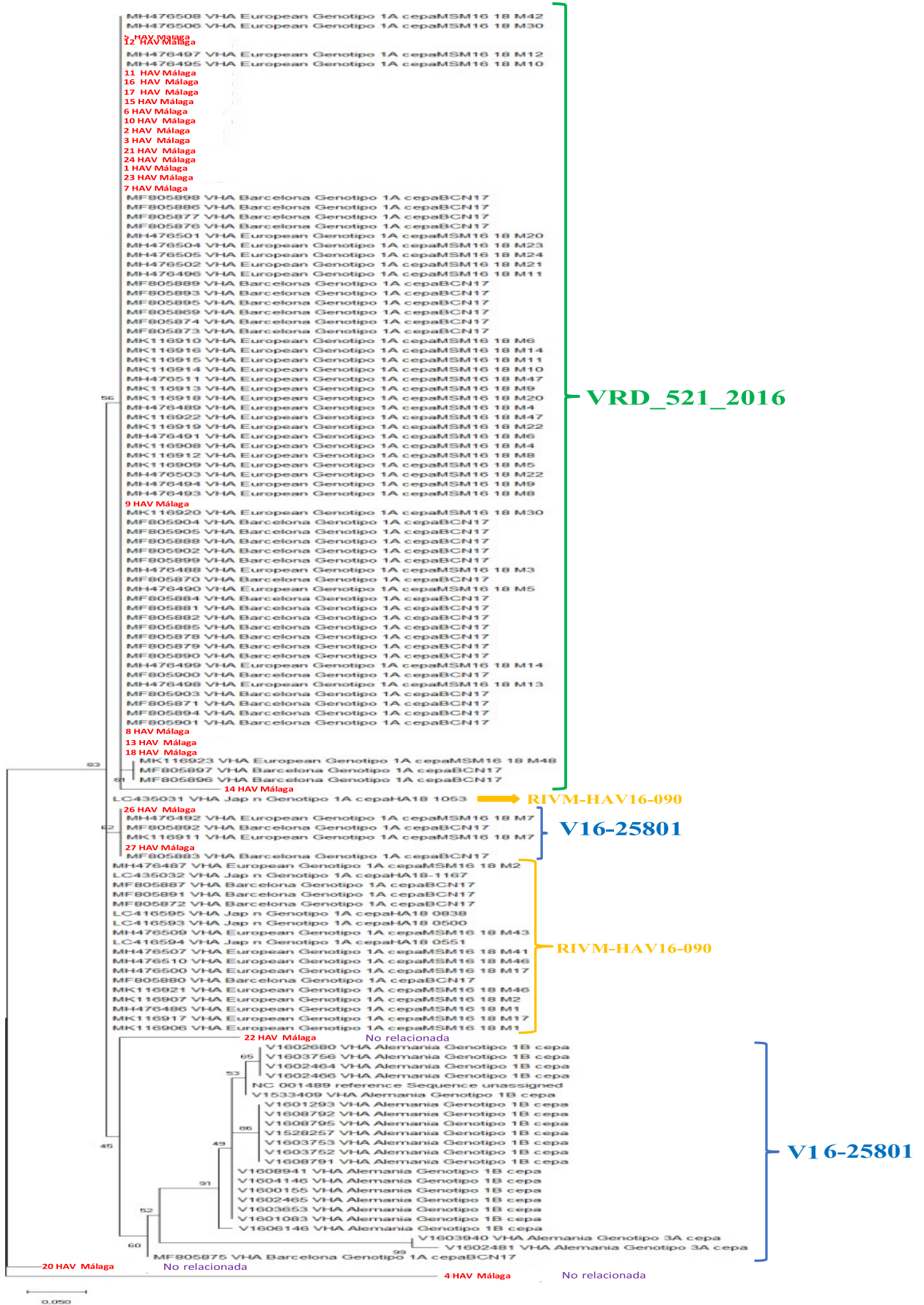


Figura 5. Inferencia filogenética basada en la región VP1/P2A (aprox. 510 nt) de secuencias de VHA obtenidas de pacientes con hepatitis A de nuestra área entre 2016 y 2017.

Atendiendo al perfil bioquímico de los pacientes pertenecientes al clúster I (**Tabla 14**), es similar al de la cohorte completa (**Tabla 6**), destacando el aumento de fosfatasa alcalina, la bilirrubina total y, sobre todo, los valores extremadamente elevados de GOT, GPT y GGT en todos los casos.

Tabla 15. Valores bioquímicos medios de los pacientes con hepatitis A pertenecientes al clúster I.

	Media	Desviación típica	Valores normales
GOT diagnóstico (UI/L)	1382	1000	8 – 40
GOT pico (UI/L)	1732	1178	8 – 40
GPT diagnóstico (UI/L)	1812	1236	12 – 42
GPT pico (UI/L)	2068	1710	12 – 42
GGT (UI/L)	347	186	9 – 52
B total inicio (mg/dL)	5,9	3,8	0,1 – 1,2
B total pico (mg/dL)	6,6	3,3	0,1 – 1,2
B directa inicio (mg/dL)	5,3	2,7	0,1 – 0,3
B directa pico (mg/dL)	6,1	2,1	0,1 – 0,3
Fosfatasa alcalina (UI/L)	214,8	106,9	44 - 147
LDH (UI/L)	495,5	246,8	130 - 240
Colesterol (mg/dL)	135,5	65,9	122 - 220
Proteína C reactiva (mg/dL)	13,1	9,0	< 5
Albúmina (g/dL)	3,4	0,6	3,4 – 5,4
Creatinina (mg/dL)	0,9	0,2	0,33 – 1,13
Urea (mg/dL)	25,2	12,5	15 - 44

Tabla 16. Hemograma y coagulación de los pacientes pertenecientes al clúster I.

	Media	Desviación típica	Valores normales
Leucocitos (x10⁹/L)	5,1	1,6	4 – 10,5
Plaquetas (x10⁹/L)	205,9	42,0	140 – 450
Hematocrito (%)	42,5	3,8	35 – 46
Tiempo protrombina (%)	74,0	18,2	80 - 120
INR	1,2	0,2	0,8 – 1,2

6.9. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA EN PACIENTES COINFECTADOS VHA-VIH

Los pacientes infectados por el VIH, a menudo coinfectados por el virus de la hepatitis B o C, pueden progresar con mayor rapidez a una enfermedad terminal hepática en aquellos casos que la infección por el VIH no está bien controlada, contribuyendo además la toxicidad que en fases avanzadas puedan originar algunos fármacos antirretrovirales. Por tanto, saber cómo evolucionan el VIH y el VHA en el organismo de las personas afectadas puede ser relevante para saber si se producen variantes que pueden tener algún efecto sobre el hospedador o su tratamiento farmacológico. En el caso de las muestras referidas en este trabajo, el 10,8 % de pacientes estaban coinfectados por el VHA y el VIH.

En cuanto a la calidad de las lecturas, al utilizar una ventana de similitud de 90, el porcentaje medio de secuencias rechazadas es 46,9%. En la prueba realizada con una ventana de similitud de 22 para la muestra 36_S5, el porcentaje de secuencias rechazadas es 91,3%, considerablemente mayor que con la ventana utilizada para el análisis completo. El detalle de los resultados puede consultarse en la hoja “SeqTrimNext” depositada en Zenodo (DOI [10.5281/zenodo.11167941](https://doi.org/10.5281/zenodo.11167941)). La tasa media de alineamiento de las lecturas frente a la referencia es del 0,46%. El número medio de virus mapeados es 618. Explorando el fichero .bam, se puede ver que el virus que mapea más veces en todas las muestras es BeAn 58058 (referencia en Nucleotide NC_032111), cuyo hospedador es un roedor. El primer virus humano mapeado en todas las muestras es un retrovirus endógeno (NC_022518), con un número medio de veces mapeado de 2346. La tabla de resultados de Bowtie2 puede consultarse en el anexo 2. Las tablas de los virus mapeados se encuentran en las siguientes hojas, nombradas según la muestra. En la visualización del alineamiento utilizando la muestra Y_S8 en Tablet, se ha observado que la mayoría de las secuencias mapeadas corresponden a homopolímeros, secuencias repetitivas o islas genómicas. Estas secuencias podrían encontrarse en cualquier virus, por lo que el mapeo no es revelador. La **figura 6**, la **figura 7** y la **figura 8** son capturas de pantalla de Tablet que recogen los eventos mencionados.

El mapeo realizado no permite identificar virus con precisión y seguridad. Como consecuencia, no es posible llevar a cabo la identificación de variaciones en las secuencias de los virus presuntamente presentes en el suero de los pacientes.



Figura 6. Captura de pantalla del alineamiento de la muestra Y_S8 sobre el virus BeAn 58058. Se observa únicamente una isla genómica mapeada en todo el genoma del virus.

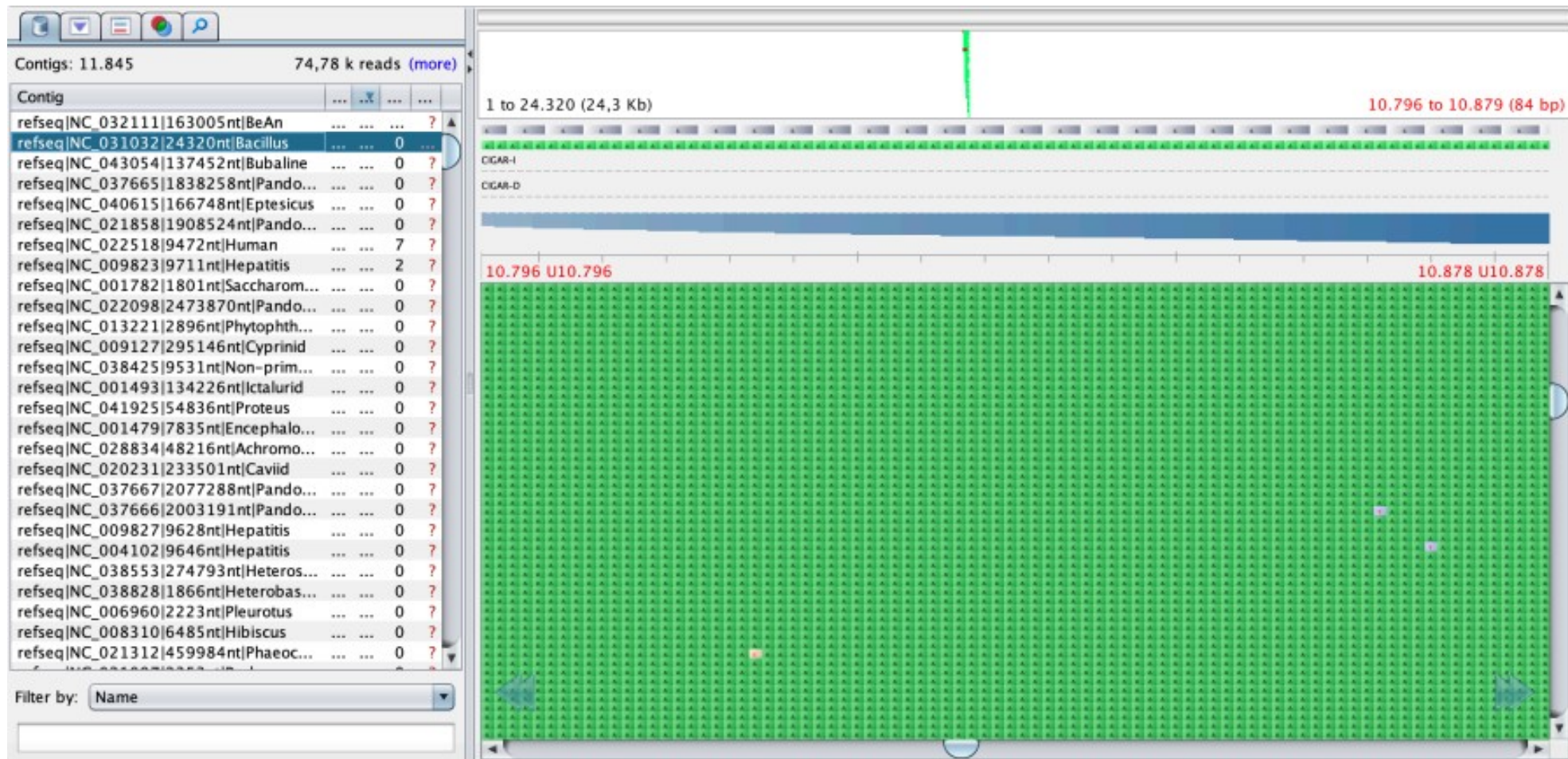


Figura 7. Captura de pantalla del alineamiento de la muestra Y_S8 sobre el virus Bacillus phage Stitch (NC_031032). Se observa únicamente un homopolímero mapeado en todo el genoma.



Figura 8. Captura de pantalla del alineamiento de la muestra Y_S8 sobre el virus Pandoravirus macleadensis (NC_037665). Se observa únicamente una secuencia repetitiva mapeada en todo el genoma

6.10. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE VHA EN AGUAS RESIDUALES DE LA PROVINCIA DE MÁLAGA

El seguimiento de virus de importancia epidemiológica en aguas residuales ha cobrado especial relevancia después de la pandemia de COVID19²⁶⁷. Los virus entéricos humanos se convierten en contaminantes del medio acuático ya que son excretados en cantidades significativas por individuos infectados, y los actuales sistemas de depuración de aguas residuales no garantizan su completa eliminación. El virus de la hepatitis A se ha vinculado a numerosos brotes documentados de origen hídrico²⁶⁸. El interés en cuanto a la detección de la presencia de VHA radica en que en el año 2006 se produjo en Málaga un brote relacionado con la ingestión de agua de una fuente contaminada²⁶⁹ y por ello, es importante vigilar su presencia en aguas residuales. Este estudio se centró en la provincia de Málaga, con un muestreo puntual de muestras de una estación depuradora de aguas residuales (E.D.A.R.) y de una planta de tratamiento, en el contexto de otros trabajos y proyectos contemplados en la Cátedra del Litoral, y que amable y desinteresadamente nos cedieron las muestras para estos análisis. Todas las muestras se concentraron y se sometieron a técnicas de PCR a tiempo real (RT-qPCR) específicas para detectar VHA. Sin embargo, todas las muestras de agua potable resultaron negativas para el virus.

7. DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

7. DISCUSIÓN

Entre 2016 y 2017, se produjo un incremento inusual de casos de hepatitis A en Málaga, de los cuales casi la mitad de ellos eran hombres que mantenían sexo con hombres (HSH). Durante ese mismo periodo, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) comunicó diversos brotes de VHA, la mayoría de ellos entre HSH, asociados a tres cepas pertenecientes al subgenotipo IA, VRD 521_2016, V16-25801, y RIVM-HAV16-090, descritas por primera vez en Reino Unido, Alemania y Holanda, respectivamente ²²³. En este trabajo se presenta una caracterización detallada del notable aumento del número de casos surgido en el área del HUVV durante estos dos años, así como un análisis del posible vínculo con el resto de brotes europeos y con los acontecidos en el resto del mundo durante el mismo periodo.

Andalucía es un área de baja endemicidad de hepatitis A²⁷⁰. Ante la sospecha de la existencia de dos patrones epidemiológicos distintos, se realizó un estudio acerca de la incidencia de hepatitis A en Andalucía entre los años 2007 y 2017. Se observó la existencia de dos brotes de la enfermedad, uno entre 2008 y 2009 y otro, entre 2016 y 2017, coincidiendo con el repunte de casos registrado en este trabajo, así como en otros países europeos ²⁵⁰. El primero de ellos, ocurrido entre enero de 2008 y diciembre de 2009, registró 1576 casos declarados, con una media de 788 casos por año. Los adultos jóvenes (20 a 49 años) constituyeron el 79,1% de los casos, y el 71,4% eran hombres, asociándose al colectivo HSH. El segundo de los brotes, que data de junio de 2016 a mayo de 2017, produjo 1.184 casos de hepatitis A declarados en Andalucía. Los adultos jóvenes supusieron el 82,8% de los casos, y el 83,3% de todos los casos fueron hombres, siendo la razón hombre-mujer de 5:1. El 40,6% de los hombres confirmó haber mantenido relaciones sexuales de riesgo, porcentaje algo superior al registrado en el presente trabajo (28,8%). Estos datos son comparables con los publicados en otros estudios que describen brotes de hepatitis A entre HSH en Europa en el mismo periodo^{155,264,266}. Durante el periodo interepidémico, se registró una media de 171 casos anuales en Andalucía, con un 58,1% de hombres, y una razón hombre-mujer de 1,39. En este periodo, el 38,5% de los casos fueron menores de 14 años. Al igual que ocurre en otros países desarrollados, este estudio confirma la modificación del patrón epidemiológico clásico de la hepatitis A gracias a la mejora de las condiciones higiénico-sanitarias¹⁹⁹. Al no existir contacto con el virus durante la infancia, la población llega a la edad adulta sin inmunidad, lo cual facilita la aparición y transmisión de brotes. Estos adultos expuestos son susceptibles de padecer la enfermedad con mayor sintomatología y gravedad que los niños ¹⁹⁶.

Existen registros previos de brotes entre población HSH acontecidos en Europa. Entre 1997 y 2005 tuvieron lugar en Dinamarca, Alemania, Holanda, Noruega, España, Suiza y Reino Unido extensos brotes de VHA que afectaron casi en su totalidad a población HSH. En 2007, un estudio colaborativo entre los países afectados, en el que se compararon las regiones VP1 y VP1-P2A del virus, determinó que la mayoría de cepas encontradas en HSH conformaban un único clúster estrechamente relacionado perteneciente al genotipo IA. Durante el mismo periodo, circularon entre otros grupos de riesgo (viajeros a zonas endémicas y PID) diferentes cepas de VHA, indicando que había cepas específicas circulando en exclusiva entre población HSH. Estas mismas cepas siguieron detectándose en este grupo de riesgo durante los años posteriores lo cual indica que han estado circulando durante un largo tiempo²⁷¹. Probablemente, las comunidades homosexuales de cada país son demasiado pequeñas para mantener la transmisión en su población a lo largo del tiempo, mientras que la comunidad homosexual europea en su conjunto es lo suficientemente extensa para mantener la circulación continua de cepas durante años, generando una situación de endemidad de hepatitis A entre HSH ²⁷¹. Este estudio ya apuntaba a la probable aparición de nuevos brotes entre HSH y enfatizaba la importancia de alcanzar coberturas vacunales elevadas en grupos de riesgo.

Desde junio de 2016 a mayo de 2017, se detectaron en 17 países de la Unión Europea 4096 casos de VHA asociados a un brote internacional. Se consideraron casos confirmados (1400; 34,2%) aquellos infectados por alguna de las tres cepas del brote, lo cual se determinó mediante secuenciación de la región VP1-P2A. El análisis molecular reveló la implicación de tres cepas cocirculantes pertenecientes al subgenotipo IA: VRD_521_2016, V16-25801 and RIVM-HAV16-090, y detectadas casi exclusivamente en varones adultos²²³. La distribución de las cepas varió según la geografía. La cepa VRD_521_2016 fue la primera reportada²⁶⁶ y la más prevalente, especialmente en el sur de Europa. RIVM-HAV16-090 fue la principal cepa implicada en Europa Central y Reino Unido, salvo en Alemania, donde predominó V16-25801²²³. Sin embargo, aunque 1283 (91,6%) de estos casos eran hombres, solo se cuenta con información acerca de sus conductas sexuales en 676 (53%). De ellos, el 84% eran HSH, porcentaje ligeramente superior al 76,6% registrado en nuestra serie. El 49% de los HSH con información acerca de su status VIH eran positivos. Las coinfecciones VIH-VHA habían sido identificadas previamente. Entre 2002 y 2008, el 15,2% de los hombres diagnosticados de hepatitis A en Italia eran VIH positivo. Al suprimir los casos que carecían de información acerca de la serología del VIH, el porcentaje ascendía al 27,6% ¹⁵⁹. La elevada

proporción de coinfección VIH/VHA en áreas de baja endemicidad de hepatitis A subraya la importancia de solicitar una serología de VIH en aquellos pacientes diagnosticados de infección por el VHA²⁷².

El virus del VIH y el VHA no comparten las vías de transmisión, pero afectan a los mismos grupos de riesgo, por lo que la presencia de una coinfección por ambos virus puede ocurrir en un elevado porcentaje de los casos. La coexistencia de ambos puede poner en riesgo la efectividad y eficacia de los tratamientos, la progresión de la infección y la calidad de vida de los pacientes. Es por ello que es importante realizar estudios moleculares que permitan determinar la coexistencia de variantes del VIH. Sin embargo, en este trabajo no fue posible determinar ni siquiera la presencia del virus en nuestros análisis pese a realizarse secuenciaciones masivas. Cabe la posibilidad de que se trate de pacientes con la infección bien controlada, bajo tratamiento con antirretrovirales, y con cargas virales indetectables, y que, por tanto, la presencia de ácidos nucleicos del virus del VIH sea escasa. Además, la presencia de fragmentos ha solapado con las secuencias con otros virus, como es el caso de *Pandoravirus macleodensis*, que presenta uno de los genomas más grandes descritos en virus, y que tiene una alta probabilidad de solapar con alguna región de otras moléculas de ácidos nucleicos circulantes.

La cuarta parte de los casos confirmados en Europa declaró haber viajado a otros países, de los cuales el 43% visitó España²²³. Durante el periodo del brote, España fue el país de la UE más afectado, concentrando el 52% de los casos, con una incidencia de 4,4 cada 100.000 habitantes, cuatro veces superior a lo registrado en los 4 años previos, y con un ratio hombre-mujer de 7:5, superior al 5:6 registrado en este trabajo. La incidencia más alta se registró en Canarias, con una tasa de 15,4 casos por cada 100.000 habitantes, frente al 13,3 registrado en Andalucía. La ciudad de Málaga constituye un importante atractivo turístico y cuenta con un aeropuerto internacional de gran afluencia, ocupando el cuarto lugar en España en cuanto al número de desplazamientos que registra. Todo ello se traduce en un gran tránsito de personas, lo cual favorece el intercambio de enfermedades transmisibles de diferente procedencia y pudo facilitar la diseminación del VHA en esta zona geográfica. Otras comunidades autónomas, como Galicia, País Vasco y Cataluña, reportaron brotes de las mismas características en ese periodo^{252,255,273}.

Atendiendo al marco temporal, el incremento de casos de hepatitis A se detecta en Málaga a principios de 2016, con dos picos en diciembre de 2016 y marzo de 2017. El resto de brotes

Europeos se solapa en el tiempo con ese aumento de casos en Málaga ^{251,264,266}. Entre los brotes registrados, conviene destacar el ocurrido en Barcelona relacionado con la cepa VRD_521_2016, predominante en Reino Unido. Al igual que ocurrió en Cataluña, la mayoría de casos registrados en Málaga estaban vinculados dicha cepa. Los estudios epidemiológicos previos ya señalaban la exportación de VRD_521_2016 a Inglaterra desde múltiples regiones españolas, y una posterior diseminación entre la población HSH en Reino Unido ^{250,266}. Nuestro estudio infiere la relación filogenética entre casos registrados en otras zonas de España, Málaga e Inglaterra, sin profundizar en otros aspectos filodinámicos. La relación filogenética de nuestros casos con las otras dos cepas restantes que circularon en los brotes europeos, V16-25801 y RIVM-HAV16-090, fue inexistente con la primera y escasa con la segunda, con solo dos secuencias agrupadas junto a la cepa holandesa. La presencia de diferentes clusters no vinculados a estas cepas podría representar rutas independientes de introducción del VHA en nuestra área durante el periodo de estudio.

En cuanto al aspecto clínico, los signos y síntomas y el perfil bioquímico de los casos de hepatitis A de nuestra cohorte fueron similares a los observados en los ya mencionados brotes. Sin embargo, se debe enfatizar la manifestación menos severa de la enfermedad, con un bajo porcentaje de ingresos, y un menor incremento en los valores de transaminasas séricas (aun tratándose de valores muy elevados con respecto a los normales) a los observados en el brote de Cataluña ²⁵⁵. El porcentaje de pacientes que requirió ingreso (35%) fue similar a lo registrado entre los casos catalanes. El número de casos registrados podría estar infraestimado ya que sólo se contabilizaron aquellos pacientes sintomáticos que acudieron al sistema sanitario.

En cuanto al tratamiento sintomático, en un estudio acerca de los factores implicados en la hepatitis A fulminante, el consumo de paracetamol se relacionó con el fallo hepático, la encefalopatía hepática y los niveles bajos de factor V ($p=0,007$), aunque este resultó no ser un factor independiente para el desarrollo de hepatitis fulminante tras el análisis multivariante ²⁷⁴. La administración de paracetamol para el control de la fiebre debe, por tanto, realizarse con cautela durante la fase aguda de la hepatitis A.

La relación entre la carga viral de VHA y el fallo hepático fulminante no está clara, y los estudios realizados muestran resultados opuestos. El trabajo de Rezende y colaboradores encontró una asociación entre una menor carga viral y un mayor riesgo de fallo hepático agudo ²⁷⁴, mientras que para Lee y col. este evento se relacionaba con cargas virales mayores

²⁷⁵. Esta discrepancia podría deberse a la variabilidad en el momento de extracción de la muestra de sangre, y a la fluctuación natural de la viremia durante la fase aguda de la enfermedad ⁵⁴. Existen estudios que sugieren una asociación entre algunos subgenotipos y los casos de hepatitis A fulminante. La prevalencia mundial de los subgenotipos IA, IB y IIIA es del 66%, 14% y 21% respectivamente, mientras que la asociación de esos subgenotipos a casos de hepatitis fulminante es del 30%, 30% y 41% respectivamente ²⁷⁶. Estos datos indicarían que la hepatitis fulminante está más frecuentemente asociada con infecciones por los subgenotipos IB y IIIA. Concretamente, el subgenotipo IIIA está relacionado con una mayor producción de infecciones severas, con una mayor alteración de los parámetros clínicos y con estancias hospitalarias más largas ²⁰⁷. Además, el subgenotipo IIIA se ha asociado a infecciones sintomáticas en niños menores de 4 años ²¹⁵. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual se incrementa la virulencia de estos subgenotipos. La región VP1-2A es altamente variable, lo cual permite la clasificación filogenética de los subgenotipos, pero las diferencias en su virulencia podrían estar relacionadas con el genoma completo o con otras regiones genómicas ¹⁹.

La magnitud del brote en cuanto a número de casos podría estar infraestimada ya que solo existen registros de aquellas infecciones en pacientes que acudieron al sistema sanitario por requerir asistencia, mientras que aquellos con cuadros leves o asintomáticos no habrían consultado y habrían quedado sin diagnosticar.

La transmisión sexual fue señalada como la vía más probable de diseminación en los brotes europeos ²⁵⁰, dado que el 84% de los casos confirmados eran HSH²²³. Los HSH son más propensos a realizar prácticas sexuales de alto riesgo cuando viajan al extranjero ²⁷⁷. Según el European Men-Who-Have-sex-with-men Internet Survey (EMIS) realizado en 2010, el 26% de los HSH europeos declaraban haber mantenido relaciones sexuales en el extranjero el último año, siendo España y Alemania los destinos más habituales²⁷⁷. Durante el brote de 2016-2017, el porcentaje de HSH que mantuvo relaciones sexuales en el extranjero fue del 67%, superior a lo registrado en 2010²²³. Un aumento de la incidencia de hepatitis A en un colectivo vulnerable a la infección, con subgrupos altamente interconectados como ocurre en los HSH, pudo potenciar la rápida diseminación internacional de VHA mediante transmisión sexual. Nuestra cohorte estaba compuesta por un 45,1 % de HSH. La mayoría de los casos fueron diagnosticados desde el servicio de Urgencias, y no contaron con seguimiento por parte de un especialista, por lo que no se cuenta con una historia clínica detallada, sino únicamente con el informe de alta de Urgencias. Además, la conducta sexual pudo no ser

reflejada por el clínico por privacidad del paciente, o bien por no considerarse relevante en el momento de la anamnesis. Todo ello apunta a que la cifra de HSH podría estar infraestimada, y acercarse a los valores del resto de Europa lo cual sugiere un comportamiento de riesgo similar como origen del incremento inusual de casos de VHA observado en nuestra área durante el periodo de estudio. Sin embargo, el aumento de casos y la rápida diseminación fueron de tal magnitud que acabó afectando a la población general²⁷³, al igual que ocurrió en otros países de Europa^{278,279}. Francia reportó en 2017 un incremento cinco veces mayor en los casos de VHA-ARN positivos en donantes de sangre con respecto a lo observado en años previos. De ellos, solo uno declaró ser HSH²⁷⁸. Todos los casos, excepto uno, pertenecían al genotipo IA, al igual que las tres cepas asociadas a los brotes europeos y al resultado de nuestro genotipado. Además, la extensión de los brotes ocurridos en Europa durante 2016 y 2017 terminó implicando otros mecanismos de transmisión adicionales, principalmente los relacionados con manipuladores de alimentos infectados²⁷³. En Bizkaia, un manipulador de alimentos, HSH no vacunado frente al VHA y VIH positivo, se infectó por una de las cepas del genotipo IA implicadas en el brote europeo (RIVM-HAV16-090) y transmitió la infección a otros 14 individuos (11 consumidores de productos del establecimiento, 2 compañeros de trabajo y 1 familiar)²⁷³. La cepa RIVM-HAV16-090 detectada en Holanda, asociada al evento EuroPride 2016 celebrado en Ámsterdam, causó un gran brote entre HSH en Taiwán desde junio de 2015^{251,280}.

En Europa, los casos confirmados de hepatitis A descendieron a partir de marzo de 2017, muy probablemente por una disminución de la notificación, y no tanto por un cambio en la evolución del brote en ese momento²²³. Desde entonces, no se han registrado nuevos brotes asociados las cepas implicadas ni en España ni en el resto de Europa. Aunque la distribución de las cepas varía a lo largo del tiempo y entre países, no se encontraron diferencias en los factores de riesgo y en las características demográficas. Se cree que la introducción múltiple y la transmisión prolongada de cepas de hepatitis A procedentes de diferentes partes del mundo, como Centro América (VRD_521_2016) y Asia (RIVM-HAV16-090), pudo conducir al desarrollo del brote. Existen reportes de estas cepas en Canadá, Israel, Estados Unidos y Taiwan, lo cual indica que el brote habría afectado también a países no europeos^{251,281,282}. Durante el mismo periodo se detectaron eventos similares en países de baja endemicidad de América del Norte y del Sur, Oriente Medio y Sudeste Asiático²⁸¹⁻²⁸⁴.

En la primera mitad del año 2017, el Departamento de Salud de Nueva York registró un incremento de infecciones por VHA, detectándose entre enero y agosto de 2017 un total de

51 casos asociados a HSH que no habían viajado a zonas endémicas²⁸¹. Del total de pacientes declarados, 46 provenían de la ciudad de Nueva York, y los 5 restantes se infectaron en los estados de Colorado y Oregón. De los 46 casos registrados en Nueva York, 45 eran HSH, y una era una mujer que mantenía contacto sexual con un hombre bisexual. El 33% requirió hospitalización, porcentaje ligeramente superior al 25% registrado en nuestra serie. Aunque se desconoce el número de dosis de vacuna frente al VHA administradas, 3 pacientes declararon haber sido vacunados con anterioridad. El 17% de los casos había viajado a países de Europa afectados en ese momento por el brote de VHA entre HSH. El análisis molecular de 25 muestras de pacientes reveló que 24 secuencias, incluyendo las halladas en 4 pacientes de los que habían viajado a Europa, se relacionaban estrechamente con las cepas circulantes en los brotes europeos: HAV16-090 (14 pacientes), VRD_521_2016 (8 pacientes) y V12-25801 (2 pacientes)²⁸¹.

Uno de los casos registrados en Nueva York se produjo en un manipulador de alimentos que infectó a otro manipulador que trabajaba en el mismo establecimiento. Las autoridades sanitarias recomendaron profilaxis postexposición a las 1000 personas que habían consumido alimentos o bebidas en ese establecimiento en un periodo de 7 días²⁸¹. Esto pone de manifiesto el riesgo de diseminación a la población general de este tipo de brotes, dado que se producen en contextos de baja endemicidad de hepatitis A en los que el porcentaje de población inmunizada es muy bajo y, por tanto, existen gran cantidad de adultos susceptibles de contraer la infección.

Desde finales de 2016, tuvo lugar en Chile un brote de hepatitis A que, al igual que ocurrió en Europa, afectó fundamentalmente a hombres, con una elevada proporción de HSH. Entre noviembre 2016 y octubre 2017 se registraron 227 casos, con un pico a mediados de 2017, durante la semana epidemiológica 20, correspondiéndose con un incremento de la incidencia del 168% con respecto al mismo periodo de 2016. El ratio hombre-mujer fue de 5:1. El 72% de los casos se encontraban en el rango de 20 a 39 años. El 61% de los hombres eran HSH, porcentaje ligeramente inferior al de nuestra cohorte. El 32% tenía historia previa de ITS, sobre todo sífilis y VIH (5 de 12 tipados, 41,7%) frente al 24,4% de VIH en los HSH de nuestra cohorte. Del total de pacientes. Las encuestas epidemiológicas que se pudieron realizar a mujeres revelaron que eran familiares de HSH o convivían con ellos²⁸³. El estudio filogenético se realizó mediante secuenciación de la región VP1-P2A, según protocolo HAVNET. Todo genotipo IA, secuencias que se agrupan próximas a V16-25801, reportada por primera vez en Alemania en enero de 2017, y posteriormente detectada en otros países

Europeos como Reino Unido o España. Un análisis retrospectivo de esta cepa reveló que dos pacientes infectados en Italia por cepas pertenecientes al clúster V16–25801 en 2014 y 2016 procedían de Ecuador, lo cual apunta a una probable circulación de V16–25801 en Sudamérica previa a su aparición en Europa¹⁵⁵. No está claro el vínculo epidemiológico, ya que ninguno de los pacientes chilenos había viajado a Europa. Un paciente de los estudiados en Barcelona había viajado a Chile. Desafortunadamente, el estudio filogenético de esta cepa no pudo llevarse a cabo²⁵⁵.

Entre julio de 2017 y abril de 2018, se notificaron en Argentina 32 casos de hepatitis A. De ellos, el 87,5% eran hombres no vacunados y el 69,9% eran HSH, con una mediana de edad de 31,9 años. Todas las secuencias de pacientes HSH correspondían al genotipo IA, y conformaban un mismo cluster junto a VRD 521–2016, implicada en el brote europeo.

En Israel, se detectaron 19 casos de hepatitis A entre diciembre de 2016 y junio de 2017²⁸². 17 eran hombres, con edades entre 22 y 41 años. De ellos, 15 eran HSH, tres de los cuales habían viajado a Europa y uno a Estados Unidos. Una mujer había viajado a India. El resto de casos se infectaron en Israel. Ningún paciente estaba vacunado. La secuenciación de 15 muestras reveló que 8 HSH estaban infectados por RIVM_HAV16–90, 6 HSH por VRD_521_2016, y una mujer, infectada por cepa una cepa india genotipo IB. Entre marzo de 2012 y marzo de 2013 se produjo en Tel Aviv un brote de hepatitis A con 75 casos, 73% de los cuales eran hombres jóvenes no vacunados. El subgenotipo IB fue el predominante tanto en muestras clínicas como en aguas de desecho²⁸⁵. A diferencia de lo ocurrido en el brote de 2012-2013, en el que predominó el genotipo IB asociado a PID no vacunados (y no a HSH), en 2016-2017 fue mayoritario el genotipo IA. La identificación de individuos que se infectaron en el extranjero refuerza la hipótesis de que el brote de 2016- 2017 fue importado a Israel por HSH que viajaron a Europa y Estados Unidos.

En un estudio realizado en Estados Unidos²⁸⁶ se estudió la prevalencia de genotipos de hepatitis A entre 1996 y 2019, para lo cual se analizaron las secuencias de 9.203 muestras. El estudio reveló que hasta el año 2015, el genotipo IA era el más frecuente, constituyendo el 93% de las muestras obtenidas de vigilancia epidemiológica y el 84,4% de las muestras procedentes de brotes. El genotipo IB fue detectado únicamente en el 6,4% de las muestras de vigilancia y en el 15,2% de las muestras de brotes. El genotipo IIIB se detectó en menos del 0,5% del total de muestras. Entre 2016 y 2019, se produjo un aumento de la incidencia de hepatitis A del 294%, comparado con el periodo 2013-2015, asociado a hombres que tiene

sexo con hombres, PID y personas sin hogar. En este periodo, se recolectaron 6.661 cepas asociadas a brotes. El genotipo IB fue el mayoritario, detectándose en el 82,8% de los casos. El genotipo IA se identificó en el 15,7%, y el IIIA, en el 1,5% de las muestras. El análisis genético apuntó a una posible introducción de genotipo IB procedente de zonas geográficas en las que es endémico durante el periodo 2016-2019, y esto pudo ser el desencadenante para la aparición de brotes entre población vulnerable.

El VHA se transmite vía fecal-oral, principalmente por la ingestión de agua o alimentos contaminados. La endemicidad del virus en países en vías de desarrollo se debe fundamentalmente a un incorrecto tratamiento del agua y a condiciones de saneamiento deficientes. Conocer y controlar las fuentes de contaminación ambiental de VHA constituye una medida esencial para el control de la infección. El tratamiento efectivo del agua reduce significativamente la presencia de VHA²⁶⁸, por tanto, el empleo de sistemas de tratamiento de agua potable y de desecho efectivos son fundamentales para evitar la transmisión del VHA por consumo de agua.

El consumo de agua contaminada constituye otra de las principales vías de transmisión del VHA, especialmente en áreas en las que el virus es endémico y las condiciones higiénico-sanitarias son deficientes. En estas zonas, se vierte al agua una elevada carga de virus presente en las heces de los individuos infectados. Los datos acerca de la vigilancia ambiental de varios virus, especialmente aquellos relacionados con la viabilidad y la potencial infectividad, pueden complementar la vigilancia clínica a la hora de predecir brotes de enfermedad en el tiempo, y proporcionar señales de alarma tempranas a las autoridades sanitarias^{287,288}. En este sentido, la diseminación del virus de la hepatitis A se ha monitorizado con frecuencia en los sistemas de aguas de desecho, proporcionando información no solo de la incidencia, sino también acerca de la estacionalidad y de la distribución de los diferentes genotipos en el ambiente, y del riesgo real de infección²⁸⁹⁻²⁹¹. Este hecho resulta especialmente relevante en el caso de la hepatitis A dada su difícil monitorización en la población debido a la existencia de un porcentaje elevado de casos asintomáticos.

En un meta-análisis publicado recientemente²⁶⁸ se analizó la prevalencia de VHA en diversas fuentes de agua de países con diferente perfil socioeconómico. A pesar de las variaciones entre las diferentes regiones, la variabilidad metodológica y la infrarrepresentación de regiones con bajos ingresos, el estudio concluyó que la prevalencia global de VHA en las

diferentes fuentes de agua fue mayor en los países con un bajo nivel de ingresos (29%), mientras que, en los países con ingresos elevados, los más representados en el estudio, la prevalencia era significativamente más baja (10,8%; $p < 0,001$). El estudio concluyó también que la prevalencia global de VHA en aguas de desecho era del 31,5%, y del 0,4% en agua potable lo cual apuntaba a la efectividad de los sistemas de tratamiento.

En un estudio reciente realizado en Argentina²⁹², se detectó el VHA presente en aguas de desecho, y se caracterizó con el objetivo de analizar su correlación con secuencias detectadas en muestras clínicas en un periodo de cinco años. Los dos años con una incidencia mayor de hepatitis A en la población coincidían con aquellos con mayores tasas de detección del virus en muestras de agua. Todas las secuencias detectadas, tanto en muestras clínicas como ambientales, pertenecían al genotipo IA. Sin embargo, se identificaron dos clústers monofiléticos: uno que agrupaba secuencias de muestras tanto clínicas como de aguas obtenidas en el periodo 2017-2018, y otro con todas las muestras recogidas en 2022, lo cual apunta a que la circulación ambiental del virus podría constituir una réplica de la circulación viral en la población²⁹².

En el proceso de investigar el brote israelita, se evaluó también la presencia de VHA en agua de desecho, para lo cual se recolectaron 23 muestras entre agosto de 2016 y junio de 2017 procedentes de tres localizaciones. Las muestras recolectadas entre agosto y diciembre de 2016, los cinco meses previos a la detección del primer caso, fueron todas negativas, de lo cual se deduce que estas cepas no circulaban en Tel Aviv antes de diciembre de 2016. 7 de las 15 muestras recolectadas entre enero y junio del 2017 fueron positivas para VHA. El análisis filogenético de estas cepas reveló que se agrupaban junto a RIVM_HAV16-90 y VRD_521_2016.

La utilidad de la monitorización de la circulación de virus entéricos mediante el muestreo de aguas residuales fue también demostrada por Bisseux et al. En un estudio en el que analizaron 54 muestras de aguas de desecho, encontraron virus en todas ellas, con un 60% de aguas sin tratar positivas para VHA²⁹³. A pesar del bajo número de infecciones notificadas en ese periodo, debido probablemente al curso asintomático de la enfermedad en muchos casos, estos resultados evidencian la circulación sostenida del virus en la comunidad.

Entre los años 2000 y 2008 se recolectó en Barcelona y Valencia un total de 61 muestras de aguas de desecho con el objetivo de analizar la prevalencia de hepatitis A²⁹⁴. Desde 2009,

Cataluña tiene establecida la vacunación universal en pre-adolescentes, mientras que en la Comunidad Valenciana se vacuna únicamente a grupos de riesgo. Estudios previos realizados entre 1994 y 2000 en las mismas regiones encontraron una tasa de positividad para VHA del 57,4%. La distribución de cepas ambientales, 50% genotipo IA y 50% genotipo IB, se correspondía con la detectada en muestras clínicas de pacientes infectados en ese periodo. Varias cepas se detectaron simultáneamente en muestras de agua y sueros de pacientes²⁹⁵. El porcentaje de positividad de las aguas cayó drásticamente en el segundo periodo de estudio, entre los años 2000 y 2008, con un 3,1% de muestras positivas²⁹⁴. La disponibilidad de una vacuna eficiente y la mejora generalizada de las condiciones higiénico sanitarias son probablemente las principales responsables del descenso de la circulación del virus en la población y de los niveles de excreción de VHA en las aguas de desecho generadas. Este dato sugiere también un mayor número de individuos susceptibles a la infección en este segundo periodo. La inmunización universal de niños o adolescentes tiene un efecto protector en la población general. Sin embargo, a pesar de las diferentes estrategias de vacunación en Barcelona y Valencia, la prevalencia de muestras positivas para VHA fue igual en ambas. Este dato apunta a que el descenso de la circulación de VHA no puede darse de forma individual en una región de España, ni a consecuencia de programas de vacunación autonómicos aislados. La implementación de plantas de tratamiento de aguas residuales constituye un factor determinante en la reducción de la transmisión de virus entéricos a la población. Entre 1992 y 2008, Cataluña incrementó el número de plantas de tratamiento de 91 a 343²⁹⁴.

En el curso de este trabajo se quiso saber si algunas de las cepas predominantes en los brotes europeos seguían circulando en nuestra área varios años después del último caso registrado en este estudio (diciembre de 2017). Para ello, se tomaron muestras de agua de desecho antes de su entrada a las principales plantas de tratamiento de aguas residuales de la provincia de Málaga. La persistencia de VHA en el ambiente puede detectarse mediante RT-qPCR, como ya se ha hecho en otros estudios, incluso para otros virus como el SARS-CoV-2²⁹⁶⁻²⁹⁸. Esta presencia no siempre garantiza infectividad, pero proporciona importante información acerca de la diseminación ambiental del virus²⁹⁹⁻³⁰¹. No fue posible amplificar ARN del VHA a partir de ninguna de las muestras de agua, por tanto, la persistencia del virus en nuestra área podría ser descartada. La vacunación en grupos de riesgo, entre ellos el colectivo HSH, junto a la naturaleza temporal de los brotes, podría haber contribuido de manera importante a mitigar el número de casos en esta zona.

La monitorización de las aguas de desecho constituye una potente herramienta a la hora de obtener información acerca de las tendencias de diseminación de virus entéricos en una población. Un sistema de vigilancia combinado, que monitorice la presencia de VHA tanto a nivel clínico como a nivel ambiental, proporcionaría una imagen más completa acerca de la diseminación del virus y de los genotipos circulantes, permitiendo un mejor conocimiento de los cambios en las tendencias de la infección. El rastreo de virus en aguas residuales presenta algunas ventajas sobre las pruebas clínicas, ya que supone un coste menor y no requiere de la presencia de pacientes para la toma de muestras. Sin embargo, con este método no siempre se pueden rastrear variantes específicas del virus, y, aquellos microorganismos más sensibles a la temperatura ambiental o a la presencia de contaminantes pueden degradarse dando lugar a falsos negativos. En el caso del VHA se ha detectado fácilmente en aguas residuales, por lo tanto, la obtención de resultados negativos indica que el virus actualmente no está circulando, o no lo hace en cantidades detectables según la técnica utilizada en la provincia de Málaga. Conviene recalcar que las muestras se tomaron de forma puntual en un momento dado en el contexto de una colaboración previa. Para hacer un adecuado seguimiento, se requiere de mayor número de tomas y más continuadas a lo largo del tiempo.

La vacunación constituye la única medida eficaz para la protección individual en poblaciones susceptibles. Paradójicamente, en el momento del brote en Málaga, la vacuna frente al VHA no estaba disponible por problemas de desabastecimiento a nivel nacional, y los convivientes recibieron profilaxis con gamma-globulina²²⁷.

En dos estudios llevados a cabo para evaluar la persistencia de la respuesta inmune inducida por la vacuna inactivada, la tasa de seroprotección transcurridos 10 años desde la administración era del 99% en adultos, y del 100% en niños^{302,303}. Se estima que, tomando como punto de corte ≥ 20 mIU/mL, la duración media de la protección otorgada por la vacuna inactivada sería de 45 años³⁰⁴. En un ensayo aleatorizado, la vacuna inactivada demostró una eficacia similar a la IG en profilaxis postexposición³⁰⁵. Además, presenta ventajas relativas a la salud pública, como protección más prolongada, mayor facilidad de administración y mayor disponibilidad, por lo que, en la actualidad, la vacuna se recomienda en la mayoría de escenarios para la profilaxis postexposición³⁰⁶.

En 2006 se publicó un ensayo clínico que evaluaba la persistencia de anticuerpos anti VHA generados por la vacuna viva atenuada elaborada a partir de la cepa H2. El 72% de los niños

inmunizados con una sola dosis tenían anticuerpos anti-VHA detectables transcurridos ocho años, mientras que el grupo que recibió una segunda dosis en los 12 meses posteriores a la primera, presentaba anticuerpos en el 98% de los casos ³⁰⁷. En otros dos estudios llevados a cabo en China, esta misma vacuna demostró una eficacia del 100% y una persistencia de los anticuerpos anti-VHA generados del 72%-88% 15 años después de la inmunización ³⁰⁸. La vacuna elaborada a partir de la cepa H2 ha mostrado una eficacia del 95% administrada en profilaxis postexposición en el contexto de un brote ³⁰⁹.

Al igual que ocurre con la vacunación frente a otras enfermedades infecciosas prevenibles, las estrategias de inmunización frente a la hepatitis A han ido variando a lo largo de los años. La experiencia acumulada acerca de la extraordinaria inmunogenicidad, efectividad y seguridad de las vacunas frente al VHA ha desplazado el enfoque desde la vacunación individual centrada en grupos de riesgo hacia campañas de vacunación masiva, y posteriormente, vacunación universal. Sin embargo, esta última sigue restringida a unos pocos países ³¹⁰.

Con la aprobación de las primeras vacunas, la inmunización se recomendó inicialmente para individuos con un alto riesgo de infección por el VHA. Este criterio incluía a viajeros desde zonas de baja endemicidad a zonas de endemicidad media o alta, pacientes que precisan de transfusiones de hemoderivados de por vida, trabajadores de centros de día, manipuladores de alimentos, hombres que tienen sexo con hombres, trabajadores en contacto con primates no humanos y PID ³¹¹. Una correcta adhesión a la pauta de vacunación es clave para evitar la aparición de mutantes de escape a la vacuna y posibles nuevos serotipos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos ³⁵. A pesar de beneficiar a los receptores a nivel individual, existe escasa evidencia de que este tipo de políticas consigan proporcionar altas coberturas dentro de los propios grupos diana, o de que sean efectivas reduciendo la incidencia en la población general ¹⁶³. Sin embargo, el impacto de la vacunación masiva a niños susceptibles en comunidades de riesgo ha sido demostrado en numerosos proyectos llevados a cabo en Alaska, en indios americanos, en Puglia (Italia), Bielorrusia y Australia, dando como resultado un descenso de la incidencia de hasta el 97% ³¹⁰. En 1999, el Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) del CDC amplió las recomendaciones de vacunación a niños de zonas de Estados Unidos en las que la incidencia se encontraba por encima de la media nacional. A pesar de alcanzarse coberturas vacunales variables (entre el 50% y el 80%), la incidencia descendió de forma progresiva de 21,1 a 2,5 casos por cada 100.000 habitantes, lo cual supuso una caída del 88% ^{235,312}. Basándose en la evidencia que

confirmaba que la transmisión del VHA ocurría fundamentalmente por la excreción viral de niños pequeños, en 1999 Israel fue el primer país en introducir vacunación masiva universal (VMU) en niños de 18 meses, empleando una pauta de dos inyecciones intramusculares administradas con un intervalo de 6 meses. Con una cobertura vacunal del 90% y del 85% con la primera y segunda dosis respectivamente, la incidencia anual de la hepatitis A cayó de forma drástica en los 3 primeros años tras el inicio del programa, alcanzando un descenso global del 95% con respecto a las tasas registradas prevacunación ³¹³.

En 1998 se llevó a cabo en Cataluña un proyecto de vacunación masiva frente a VHA y VHB en preadolescentes. El objetivo del estudio era comparar la incidencia de infección por VHA en la cohorte de vacunados frente a la de los no vacunados. La mayor reducción se observó en el grupo de 10-14 años, donde la incidencia pasó de 10.3 a 1.8 casos por cada 100.000 habitantes. La efectividad de la vacunación se estimó en un 97% ³¹⁴.

Los programas de vacunación son particularmente coste-efectivos cuando la incidencia es suficientemente alta para producir un riesgo significativo de infección, pero suficientemente baja para que los niños no desarrollen con frecuencia inmunidad en etapas tempranas en ausencia de la vacuna ³¹⁵. Según un estudio realizado con el objetivo de estimar las prevalencias en diferentes áreas del mundo, las regiones con ingresos intermedios de Asia, Latinoamérica, Europa del Este y Oriente Medio podrían beneficiarse si se produjese un aumento en el uso de la vacuna ¹²⁰.

En cuanto a la profilaxis postexposición, la administración de inmunoglobulina es altamente efectiva en la prevención de la hepatitis A cuando se suministra dentro de las dos semanas posteriores a la exposición al virus. En un ensayo clínico aleatorizado en el que se comparó la efectividad de la vacuna frente a la inmunoglobulina en la prevención de la infección por VHA en contactos, ambas proporcionaron una buena protección postexposición, evitando la infección en más del 95% de los casos. Sin embargo, las tasas de infección fueron ligeramente mayores entre los que recibieron la vacuna, indicando una modesta diferencia en la eficacia. Este hallazgo podría ser clínicamente relevante en pacientes con especial predisposición a la enfermedad severa, como los ancianos o aquellos con hepatopatías crónicas. La vacunación presenta, en cambio, ventajas sobre la inmunoglobulina, como la protección a largo plazo que confiere, la comodidad en la administración o su mayor disponibilidad. Todas estas consideraciones deberían ser relevantes a la hora de decidir qué tipo de profilaxis administrar

305.

En la actualidad, la vacunación sistemática no está establecida en Andalucía. La vacuna se administra a colectivos de riesgo, y como medida postexposición para prevenir infección en contactos, como recomienda el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Son considerados grupos de riesgo viajeros que se desplazan a zonas endémicas, personas con hepatopatías crónicas, sujetos infectados por el VIH, personas con mayor riesgo ocupacional, manipuladores de alimentos, personal de guardería y personas con estilos de vida que supongan mayor riesgo, como los varones homosexuales con contactos sexuales múltiples²⁷⁰. En Nueva York, la incidencia de infección por VHA entre 2013 y 2015 entre HSH que no habían viajado a zonas endémicas del virus fue 6.8 veces mayor que la registrada en adultos no HSH²⁸¹. La transmisión en este grupo se ve favorecida por prácticas de alto riesgo como el *chemsex* o el sexo en grupo, habituales entre el colectivo de HSH, por lo cual parece razonable aumentar las precauciones en cuanto a prevención y vigilancia en este grupo. Sin embargo, existe evidencia que avala la utilidad de la vacunación frente al VHA cuando se administra a población general en zonas de endemicidad baja o intermedia³¹⁶. En Israel se instauró en 1999 la vacunación universal con dos dosis en niños de 1,5 y 2 años, lo cual condujo a un descenso de la incidencia del 90%³¹⁷. Este programa no protege a los HSH nacidos antes de 1999. Existe, sin embargo, una recomendación del Ministerio de Sanidad israelí de vacunación a los HSH. En Chile, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Chilena de Infectología³¹⁸, y teniendo en cuenta un estudio local de coste-efectividad³¹⁹ y los buenos resultados de programas similares en otros países latinoamericanos^{320,321}, se implantó la vacunación universal frente al VHA en niños de 18 meses²⁸³ con el objeto de prevenir la aparición de brotes similares. Aun así, el control de brotes y la protección a aquellos no inmunizados resulta complicado dada la infranotificación y al elevado número de infecciones asintomáticas, que llevan a la continua circulación del virus.

Las tasas de seroconversión tras la administración de dos dosis de la vacuna con una diferencia de 6 a 12 meses son más bajas en individuos VIH positivo que en VIH negativo. En un meta-análisis que incluyó 8 estudios, incluyendo 458 individuos VIH-positivo, la tasa media de respuesta serológica al VHA fue del 64%²⁴⁴. Recuentos elevados de linfocitos T CD4 se han correlacionado con tasas mayores de seroconversión²⁷². Las tasas de respuesta podrían aumentarse añadiendo una tercera dosis intercalada en la semana 4 entre la primera y la segunda dosis. Sin embargo, no está claro que esto pueda tener algún efecto en individuos VIH que hayan perdido los anticuerpos frente al VHA²⁷². En cuanto a la persistencia de los anticuerpos anti-VHA en pacientes VIH, Lin y colaboradores concluyeron que, transcurridos

5 años, el 78% de los VIH vacunados mantenían la seroprotección frente a la hepatitis A²⁷². Una carga viral indetectable en el momento de la vacunación y sostenida en el tiempo se ha correlacionado con seroprotección persistente ³²². Desafortunadamente, se desconoce el estatus vacunal y la carga viral de los pacientes VIH de este trabajo, aunque sí se han reportado casos de hepatitis A en individuos VIH vacunados durante el mismo periodo de tiempo en otros países ²⁷². A diferencia de lo que ocurre con la hepatitis B, no existe un marcador serológico en el VHA que permita distinguir entre individuos vacunados o naturalmente inmunizados.

A partir del brote ocurrido entre HSH en 2017, Israel intensificó la vigilancia del VHA introduciendo la confirmación molecular de las serologías positivas y muestreando aguas de desecho mensualmente. Además, se realizaron campañas de información dirigidas a la población HSH en redes sociales, se repartieron panfletos explicando el modo de transmisión y se ofreció la vacunación a todos los casos, sus convivientes y sus contactos sexuales. Un año después, en 2018, se analizaron los resultados de estas actuaciones. Mientras que en 2017 el 89% de los casos eran hombres y el 45% se identificaban como HSH, en 2018, el 49% fueron hombres y solo 3% declaró ser HSH. En lo que respecta al análisis molecular, se secuenciaron 50 muestras en 2017 y 47 en 2018. De los 50 casos de 2017, 41 pertenecían al genotipo IA, mientras que solo 8 pertenecían al genotipo IB. La baja incidencia del subgenotipo IB podría deberse a una infranotificación de estos casos, ya que en ese momento los esfuerzos iban dirigidos a contener el brote por el subgenotipo IA. Una vez controlado el brote, la proporción se invirtió en 2018, ya que, de las 47 muestras analizadas, 38 correspondían al genotipo IB y 6, al genotipo IA. Las secuencias de genotipo IB encontradas pertenecían al mismo clúster que las circulantes en Israel antes del brote. Las posteriores investigaciones epidemiológicas revelaron que los pocos casos producidos por el genotipo IB en 2017 y aquellos registrados en 2018 fueron esporádicos, algunos de ellos producidos en el seno de familias sin vacunar. El 96% de las cepas del genotipo IA analizadas en los dos periodos se detectaron en personas que habían viajado a Europa. Esta tendencia en los genotipos se observó de igual manera en las aguas de desecho analizadas en ambos periodos. Un único caso de 2017 y tres casos de 2018 pertenecían al genotipo III. Todos ellos eran viajeros que habían visitado zonas endémicas, o personas que convivían con ellos.

La confirmación molecular de la infección por VHA mejoró la especificidad del diagnóstico. En dos de los sueros con IgM anti VHA positiva no se detectó ARN del virus. Los datos clínicos y epidemiológicos terminaron por excluir el diagnóstico de hepatitis A en estos dos

casos ³²³. En este sentido, el CDC reportó que entre 2017 y 2018, entre el 8% y el 10% de las muestras con IgM antiVHA positivas no se confirmaron en el análisis molecular³²⁴.

Las cepas mayoritarias de los subgenotipos IA y IB identificadas en las aguas israelitas se agrupaban estrechamente junta a aquellas detectadas en muestras clínicas. Además, el hecho de que exista una correlación en el tiempo, espacio y correlación entre subgenotipos de casos y muestras ambientales sugiere que el estudio de esta últimas puede aportar importante información acerca de la circulación de virus entéricos como el VHA en países en los que la incidencia es baja o bien los casos están infradeclarados. La detección de virus en aguas de desecho alerta de forma precoz de la posible aparición de brotes³²³.

Desde el punto de vista de las enfermedades infecciosas, la globalización del comercio y de los desplazamientos internacionales condicionan el cambio epidemiológico³²⁵. En áreas de endemidad baja de hepatitis A, existe un riesgo elevado de contaminación por VHA cuando se adquieren alimentos procedentes de países de endemidad media y elevada¹²⁰. Entre el periodo de estudio de este trabajo y la actualidad, se han registrado en Europa brotes de VHA en zonas de baja endemidad asociados al consumo de alimentos importados contaminados. En 2018, Suiza registró 20 casos de hepatitis A atribuidos todos ellos a una cepa idéntica del genotipo IB, la cual fue hallada en fresas congeladas importadas de Polonia. Esta misma cepa fue aislada en 14 casos diagnosticados en Austria, y en fresas importadas a este último país por el mismo productor polaco³²⁶. Tras lo ocurrido en Suiza y Austria, Alemania detectó 65 casos de VHA vinculados a la misma cepa del virus entre octubre de 2018 y enero de 2020, presente en tartas de fresa congeladas. El análisis filogenético vinculó la cepa del brote a cepas aisladas previamente en agua de desecho, heces y fresas en Egipto. El estudio retrospectivo reveló que el productor polaco había importado fresas congeladas de Egipto³²⁷, lo cual permitió establecer el origen común de los tres brotes. En 2021, Reino Unido registró un brote de hepatitis A vinculado al consumo de dátiles importados de Jordania en el que se vieron implicadas tres cepas estrechamente relacionadas pertenecientes al genotipo IB, y próximas a las detectadas en pacientes que habían viajado a Siria y Líbano ³²⁸. Es probable que las frutas se contaminasen debido a una higiene deficiente de los trabajadores, o por empleo de aguas de desecho para el regadío ¹²⁴. La prevención de los casos de hepatitis A causados por alimentos contaminados requiere de la mejora del procesamiento de los alimentos en el país de origen. Dada la existencia de un mercado globalizado, parece necesario establecer regulaciones internacionales acerca de seguridad alimentaria en la que se vean implicados tanto los países que importan como los que exportan.

En la actualidad, la aparición de nuevos virus constituye una amenaza directa para la salud pública, subrayando la importancia de determinar y comprender los factores genéticos y evolutivos involucrados en este fenómeno. Tras la pandemia por SARS-CoV2 este hecho ha tomado más relevancia y ha puesto de manifiesto que la rápida evolución de los virus es consecuencia de genomas compactos, altas tasas de mutación, ciclos replicativos cortos y grandes tamaños poblacionales, generando poblaciones altamente variables. Los virus ofrecen un sistema ideal para estudiar tasas de cambio evolutivo. El estudio de la variabilidad genética y la evolución de las poblaciones es crucial para desarrollar estrategias de control, dado que la diversidad genética y la capacidad de evolución rápida pueden obstaculizar la efectividad de las metodologías de control. La capacidad de los virus y viroides para cambiar rápidamente es una preocupación central en la gestión de enfermedades, siendo el ascenso y caída de genotipos en una población viral influido por la selección natural. Los cuellos de botella poblacionales, que reducen drásticamente el tamaño poblacional, pueden acelerar o inhibir este proceso, afectando la composición genómica y las propiedades biológicas. Para expandirse a nuevos hospedadores, una población viral debe contener variantes capaces de infectar al nuevo hospedador, lo que puede dar lugar a la emergencia de nuevas cepas.

En muchos países, la escasez de vacunas frente al VHA obstaculizó el control del brote ocurrido en 2016-2017 entre HSH. Con el objetivo de minimizar el impacto, se implementó la reducción en el número de dosis. Sin embargo, estas medidas podrían tener consecuencias en la evolución del VHA, favoreciendo la emergencia de variantes antigénicas. A pesar de la estabilidad antigénica del VHA, la selección ejercida por la presión inmune podría llevar a la emergencia de variantes e incluso, de nuevos serotipos³⁴. Este hecho podría hacer replantear la utilidad de la profilaxis post exposición, y recalca la importancia de vacunar con pautas completas, sobre todo en el grupo de HSH en el que la hepatitis A está convirtiéndose en endémica. La replicación del virus en un contexto de baja concentración de anticuerpos podría favorecer la replicación y selección de mutantes de escape. El análisis molecular de las cuasiespecies resulta de gran interés a la hora de estudiar la evolución del VHA bajo presión inmunológica. Comprender los procesos que generan la diversidad viral, así como las presiones selectivas y cuellos de botella, puede guiar intervenciones y determinar la eficacia de las medidas de control. Aunque no existe suficiente evidencia, la administración de dosis de booster en pacientes vacunados mucho tiempo atrás, o a aquellos con bajas cargas de anticuerpos anti-VHA, podrían ser medidas a considerar, sobre todo en contextos en los que el virus es endémico. En un trabajo realizado en China³²⁹, donde la hepatitis A es

endémica, se seleccionaron 42 aislados del VHA cuya secuencia de la unión VP1-2A era idéntica. Para el estudio de las cuasiespecies se analizaron y clonaron los genes VP3 y VP1-2A en tres muestras clínicas. El análisis filogenético reveló que la mayoría de los aislados pertenecían al subgenotipo IA, y unos pocos al subgenotipo IB. Aunque no se encontraron mutaciones aminoacídicas en los sitios de neutralización de epítomos, se identificaron diversas sustituciones de un único aminoácido en las regiones VP1 y VP3, dos de las cuales se encontraban muy próximas al sitio inmunodominante, lo cual abre la posibilidad de que aparezcan mutantes antigénicos de escape y subraya la necesidad de seguir investigando en este sentido.

Las poblaciones de virus de ARN, con su alta variabilidad y heterogeneidad genética, exhiben una capacidad adaptativa significativa. Sin embargo, pese a que otro de los grandes objetivos del trabajo era poder identificar coinfecciones y variantes de VHA y VIH, no fue posible llegar a discriminar entre cuasiespecies pese a trabajar con una de las técnicas más sensibles hasta el momento. Hoy en día se disponen de chip como los diseñados para la detección de genomas minoritarios en cuasiespecies virales mediante el empleo de microchips de ADN³³⁰.

Los hallazgos reflejados en este trabajo subrayan la importancia de ofrecer la vacuna frente a la hepatitis A a colectivos de riesgo como los HSH, junto con la realización de campañas sobre la necesidad de prevenir las ITS y reforzar la vigilancia epidemiológica coordinada entre países europeos dada la facilidad de diseminación de los patógenos entre fronteras.

A pesar de las medidas establecidas, como la vacunación preexposición en HSH, siguen apareciendo en nuestro medio brotes de VHA, lo cual hace pensar que no se estén alcanzando las coberturas vacunales necesarias para controlar la aparición de los mismos, y se deben fomentar políticas que las aumenten²⁶⁴. La estrategia de vacunación a personas de riesgo puede ser suficiente para el control de un brote puntual (junto con las medidas higiénico-sanitarias adecuadas), pero sin embargo es insuficiente para el control de la enfermedad a largo plazo y para prevenir la aparición de nuevos brotes. Dada la repercusión en la población general de los últimos brotes registrados en Europa, deberían plantearse nuevas estrategias como la vacunación sistemática universal.

Los sistemas sanitarios deben contar con disponibilidad de dosis suficientes para vacunar a una gran cantidad de individuos en un corto periodo de tiempo en el caso de aparición de brotes. Las pautas de vacunación deben ser completas con el objetivo conseguir una inmunización eficaz y de evitar la aparición de variantes de escape a la vacuna.

Aunque existen vacunas eficaces frente al VHA, el desarrollo de tratamiento antivirales podría resultar de utilidad a la hora de prevenir y tratar las formas severas o fulminantes de hepatitis, y en la reducción de la duración de los síntomas y del periodo de infectividad. Esto disminuiría el riesgo de aparición de brotes y de diseminación de variantes de escape de la vacuna ¹⁹⁵. Las investigaciones llevadas a cabo han sido dirigidas tanto a dianas del hospedador como al desarrollo agentes antivirales. El interferón tipo I (IFN-1) ha demostrado suprimir de forma eficaz la replicación in vitro ^{331,332}, y, en algunos casos, mejorar la función hepática ³³³. El interferón tipo III, con menos efectos secundarios que el tipo I, se presenta como una alternativa interesante ³³⁴. Otras dianas del hospedador que resultan prometedoras son la proteína humana La, una proteína de unión al ARN que interviene en su metabolismo; los compuestos de zinc y la enzima hemo-oxigenasa 1

¹⁹⁵. Los fármacos antivirales dirigidos a otras infecciones víricas como la ribavirina, la amantadina o el sofosbuvir han mostrado actividad antiviral frente al VHA en cultivo celular ³³⁵⁻³³⁸. En lo que respecta a compuestos dirigidos específicamente frente al VHA, parece que las dianas más interesantes podrían ser el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), la proteasa 3c ³³⁹⁻³⁴¹ y la polimerasa 3D ³⁴². El bloqueo de la vía de entrada del virus podría constituir una estrategia interesante, pero es necesario un mayor conocimiento acerca de los receptores de superficie virales ³⁴³.

7.1. LIMITACIONES

Aunque el aumento del número de casos se asoció a un incremento de relaciones sexuales de riesgo homosexuales resulta difícil de demostrar. En el 15,8% de los casos no se registró ningún factor de riesgo para la adquisición de la infección. Esto puede deberse, por un lado, a que la mayoría de pacientes acudieron al Servicio de Urgencias y carecen de un seguimiento por un especialista, por lo tanto, se cuenta únicamente con los datos epidemiológicos recogidos brevemente en la anamnesis previa al diagnóstico. La información acerca de la conducta sexual pudo no registrarse por privacidad del paciente, o por considerarse irrelevante en ese momento. La información acerca de viajes al extranjero y otros factores de riesgo para la adquisición del VHA aparece registrada en un bajo porcentaje de los casos. Tampoco aparece registrado el estatus vacunal de los pacientes de nuestra cohorte.

El Hospital Universitario Virgen de la Victoria carece de Servicio de Pediatría y Urgencias pediátricas. A pesar de que otros trabajos reflejan que el brote se produjo fundamentalmente

en adultos HSH, nuestro estudio podría presentar un sesgo en cuanto al número de casos detectados en niños.

A pesar de contar con muestra de suero de todos los pacientes diagnosticados, solo pudo genotiparse un bajo porcentaje de ellos. Esto se debe a que, de rutina, los sueros se encuentran inicialmente refrigerados y congelados a -20°C en el Laboratorio de Microbiología, y no a -80°C . Este hecho, unido a la labilidad del material genético de los virus ARN, pueden ser los responsables de los problemas de amplificación.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

8. CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

8. CONCLUSIONES

Entre marzo de 2016 y diciembre de 2017 se produjo en Málaga un aumento de la incidencia de hepatitis A, coincidiendo con lo ocurrido en otros países europeos.

La mayoría de los pacientes eran hombres, con una mediana de edad de 33 años, españoles, y fueron diagnosticados principalmente en el Servicio de Urgencias y en Atención primaria.

El 85,3% de los pacientes presentó alguna de las manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad, aunque el porcentaje de casos que precisó ingreso hospitalario fue inferior al registrado en otras series. Los parámetros bioquímicos más afectados fueron las aminotransferasas (GOT, GPT), y el 10,8% presentó coinfección con el VIH.

Al igual que ocurrió en otros países de Europa, la conducta de riesgo detectada con mayor frecuencia fue el ser hombre que tiene sexo con hombres.

El subgenotipo IA fue el más prevalente, del mismo modo que ocurrió en el último brote detectado en Málaga entre 2006 y 2010. La mayoría de casos analizados en este trabajo estaban vinculados a la cepa VDR_521_2016, predominante en los brotes que se produjeron simultáneamente en Barcelona y Reino Unido, y considerada una de las tres cepas responsables del brote registrado en Europa durante el mismo periodo.

El análisis mediante secuenciación masiva de muestras de pacientes con coinfección por el VHA y el VIH no aportó información relevante para este trabajo.

El análisis de aguas residuales llevado a cabo en este trabajo no detectó presencia de VHA en las mismas.

A pesar de décadas de mejoras en las condiciones sanitarias, la hepatitis A sigue constituyendo un problema de salud pública a nivel global, con regiones hiperendémicas y nuevos grupos de riesgo. Esta situación demanda de nuevas estrategias dirigidas a la prevención y el control de la infección.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

9. BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Lemon SM, Ott JJ, Van Damme P, Shouval D. *Type A Viral Hepatitis: A Summary and Update on the Molecular Virology, Epidemiology, Pathogenesis and Prevention.*; 2018. doi:10.1016/j.jhep.2017.08.034
2. Mandell G, Douglas, Bennett. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica.* 8ª edición. (Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, eds.). Elsevier; 2015.
3. Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *QJM.* 1912;os6(1):1-29. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.QJMED.A069332/2/OS6-1-1.PDF.GIF
4. Melnick JL. History and epidemiology of hepatitis A virus. *J Infect Dis.* 1995;171 Suppl 1. doi:10.1093/INFDIS/171.SUPPLEMENT_1.S2
5. Cuthbert JA. Hepatitis A: Old and new. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(1):38-58. doi:10.1128/CMR.14.1.38-58.2001
6. Blumer G. Infectious jaundice in the United States. *J Am Med Assoc.* 1923;81(5):353-358. doi:10.1001/JAMA.1923.02650050007003
7. Havens WP. Experiment in cross immunity between infectious hepatitis and homologous serum jaundice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1945;59:148-150.
8. Krugman S, Ward R, Giles JP, Bodansky O, Jacobs AM. Infectious Hepatitis - Detection of Virus during the Incubation Period and in Clinically Inapparent Infection. *N Engl J Med.* 1959;261(15):729-734. doi:10.1056/NEJM195910082611501
9. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A New Antigen in Leukemia Sera. *JAMA.* 1965;191(7):541-546. doi:10.1001/JAMA.1965.03080070025007
10. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: Detection by Immune Electron Microscopy of a Viruslike Antigen Associated with Acute Illness. *Science (1979).* 1973;182(4116):1026-1028. doi:10.1126/SCIENCE.182.4116.1026
11. Locarnini SA, Ferris AA, Stott and Gust ACID. The relationship between a 27 nm virus like particle and hepatitis A as demonstrated by immune electron microscopy. *Intervirology.* 1974;4(2):110-118. doi:10.1159/000149849
12. Anthony SJ, Leger JAS, Liang E, et al. Discovery of a novel hepatovirus (Phopivirus of seals) related to human hepatitis A virus. *mBio.* 2015;6(4). doi:10.1128/MBIO.01180-15/ASSET/BCD91337-80FC-46C4-9AAE-74C19FFB6944/ASSETS/GRAPHIC/MBO0041524230005.JPEG
13. Shi M, Lin XD, Chen X, et al. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature.* 2018;556(7700):197-202. doi:10.1038/S41586-018-0012-7
14. Drexler JF, Corman VM, Lukashev AN, et al. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(49):15190-15195. doi:10.1073/PNAS.1516992112
15. de Oliveira Carneiro I, Sander AL, Silva N, et al. A Novel Marsupial Hepatitis A Virus Corroborates Complex Evolutionary Patterns Shaping the Genus Hepatovirus. *J Virol.* 2018;92(13). doi:10.1128/JVI.00082-18
16. Picornavirales - Positive Sense RNA Viruses - Positive Sense RNA Viruses (2011) - ICTV. Accessed April 21, 2022. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/227/picornavirales
17. Nainan O V., Xia G, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis A virus infection: A molecular approach. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):63-79. doi:10.1128/CMR.19.1.63-79.2006
18. Thuener J. Hepatitis A and B Infections. *Primary Care: Clinics in Office Practice.* 2017;44(4):621-629. doi:10.1016/J.POP.2017.07.005
19. Pintó RM, Pérez-Rodríguez FJ, Costafreda MI, et al. Pathogenicity and virulence of hepatitis A virus. *Virulence.* 2021;12(1):1174. doi:10.1080/21505594.2021.1910442



20. Yang Y, Yi M, Evans DJ, Simmonds P, Lemon SM. Identification of a Conserved RNA Replication Element (cre) within the 3Dpol-Coding Sequence of Hepatoviruses. *J Virol.* 2008;82(20):10118. doi:10.1128/JVI.00787-08
21. Ali IK, McKendrick L, Morley SJ, Jackson RJ. Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *J Virol.* 2001;75(17):7854-7863. doi:10.1128/JVI.75.17.7854-7863.2001
22. Borman AM, Kean KM. Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation. *Virology.* 1997;237(1):129-136. doi:10.1006/VIRO.1997.8761
23. Pintó RM, Pérez-Rodríguez FJ, D'andrea L, de Castellarnau M, Guix S, Bosch A. Hepatitis A Virus Codon Usage: Implications for Translation Kinetics and Capsid Folding. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(10). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A031781
24. Jenkins GM, Holmes EC. The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus Res.* 2003;92(1):1-7. doi:10.1016/S0168-1702(02)00309-X
25. Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, et al. Molecular Evolution of Hepatitis A Virus: a New Classification Based on the Complete VP1 Protein. *J Virol.* 2002;76(18):9516-9525. doi:10.1128/JVI.76.18.9516-9525.2002/FORMAT/EPUB
26. Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology.* 1992;73:1365-1377.
27. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, Kew OM. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology.* 1987;160(2):311-322. doi:10.1016/0042-6822(87)90001-8
28. Desbois D, Couturier E, Mackiewicz V, et al. Epidemiology and genetic characterization of hepatitis A virus genotype IIA. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3306-3315. doi:10.1128/JCM.00667-10
29. Wang X, Ren J, Gao Q, et al. Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature.* 2015;517(7532):85-88. doi:10.1038/nature13806
30. Hirai-Yuki A, Hensley L, Whitmire JK, Lemon SM. Biliary Secretion of Quasi-Enveloped Human Hepatitis A Virus. *mBio.* 2016;7(6). doi:10.1128/MBIO.01998-16
31. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature.* 2013;496(7445):367-371. doi:10.1038/nature12029
32. Lemon SM, Jansen RW, Brown EA. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine.* 1992;10(SUPPL. 1). doi:10.1016/0264-410X(92)90540-Z
33. Costa-Mattioli M, Domingo E, Cristina J. Analysis of sequential hepatitis A virus strains reveals coexistence of distinct viral subpopulations. *Journal of General Virology.* 2006;87(1):115-118. doi:10.1099/VIR.0.81286-0/CITE/REFWORKS
34. Sánchez G, Bosch A, Gómez-Mariano G, Domingo E, Pintó RM. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology.* 2003;315(1):34-42. doi:10.1016/S0042-6822(03)00483-5
35. Pérez-Sautu U, Isabel Costafreda M, Caylà J, et al. Hepatitis A Virus Vaccine Escape Variants and Potential New Serotype Emergence. doi:10.3201/eid1704.10.1169
36. Costa-Mattioli M, Napoli A Di, Ferré V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. doi:10.1099/vir.0.19532-0

37. Drexler JF, Corman VM, Lukashev AN, et al. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(49):15190-15195. doi:10.1073/PNAS.1516992112/SUPPL_FILE/PNAS.1516992112.ST05.DOCX
38. Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, Zhang Y, Kaplan GG. The Human Homolog of HAVcr-1 Codes for a Hepatitis A Virus Cellular Receptor. *J Virol*. 1998;72(8):6621-6628. doi:10.1128/JVI.72.8.6621-6628.1998/ASSET/ADEBEE3E-AC52-4E9A-92A7-0E1D007A645B/ASSETS/GRAPHIC/JV0880383009.JPEG
39. Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J*. 1996;15(16):4282-4296. doi:10.1002/J.1460-2075.1996.TB00803.X
40. Das A, Hirai-Yuki A, González-López O, et al. TIM1 (HAVCR1) is not essential for cellular entry of either quasi-enveloped or naked hepatitis a virions. *mBio*. 2017;8(5). doi:10.1128/MBIO.00969-17/FORMAT/EPUB
41. Rivera-Serrano EE, Gonzá Lez-Ló Pez O, Das A, Lemon SM. Cellular entry and uncoating of naked and quasi-enveloped human hepatoviruses. Published online 2019. doi:10.7554/eLife.43983.001
42. Das A, Barrientos R, Shiota T, et al. Gangliosides are essential endosomal receptors for quasi-enveloped and naked hepatitis A virus. *Nat Microbiol*. 2020;5(9):1069. doi:10.1038/S41564-020-0727-8
43. Costafreda MI, Abbasi A, Lu H, Kaplan G. Exosome mimicry by a HAVCR1–NPC1 pathway of endosomal fusion mediates hepatitis A virus infection. *Nat Microbiol*. 2020;5(9):1096-1106. doi:10.1038/S41564-020-0740-Y
44. Stuart DI, Ren J, Wang X, Rao Z, Fry EE. Hepatitis A Virus Capsid Structure. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(5). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A031807
45. Siegl G, Weitz M, Kronauer G. Stability of Hepatitis A Virus. *Intervirology*. 1984;22(4):218-226. doi:10.1159/000149554
46. Scholz E, Heinricy U, Flehmig B. Acid stability of hepatitis A virus. *Journal of General Virology*. 1989;70(9):2481-2485. doi:10.1099/0022-1317-70-9-2481/CITE/REFWORKS
47. Blaum BS, Wünsche W, Benie AJ, et al. Functional binding of hexanucleotides to 3C protease of hepatitis A virus. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(7):3042-3055. doi:10.1093/NAR/GKR1152
48. Teterina NL, Bienz K, Egger D, Gorbalenya AE, Ehrenfeld E. Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology*. 1997;237(1):66-77. doi:10.1006/VIRO.1997.8775
49. Gosert R, Egger D, Bienz K. A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology*. 2000;266(1):157-169. doi:10.1006/VIRO.1999.0070
50. Paul A V., Yin J, Mugavero JA, Rieder E, Liu Y, Wimmer E. A “slide-back” mechanism for the initiation of protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J Biol Chem*. 2003;278(45):43951-43960. doi:10.1074/JBC.M307441200
51. Esser-Nobis K, Harak C, Schult P, Kusov Y, Lohmann V. Novel perspectives for hepatitis A virus therapy revealed by comparative analysis of hepatitis C virus and hepatitis A virus RNA replication. *Hepatology*. 2015;62(2):397-408. doi:10.1002/HEP.27847
52. Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *EMBO J*. 2015;34(19):2398-2407. doi:10.15252/EMBJ.201592484
53. Costafreda MI, Pérez-Rodríguez FJ, D’Andrea L, et al. Hepatitis A Virus Adaptation to Cellular Shutoff Is Driven by Dynamic Adjustments of Codon Usage and Results in the Selection of Populations with Altered Capsids. *J Virol*. 2014;88(9):5029-5041.



- doi:10.1128/JVI.00087-14/ASSET/1F20651E-09C3-4C43-B088-D044FAB1E584/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9990989380006.JPEG
54. Shin EC, Jeong SH. Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis A. Published online 2018. doi:10.1101/cshperspect.a031708
 55. Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: From discovery to vaccines. *Hepatology*. 2006;43(2 SUPPL. 1). doi:10.1002/hep.21052
 56. Leon LAA, De Almeida AJ, De Paula VS, et al. Longitudinal Study of Hepatitis A Infection by Saliva Sampling: The Kinetics of HAV Markers in Saliva Revealed the Application of Saliva Tests for Hepatitis A Study. *PLoS One*. 2015;10(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0145454
 57. Normann A, Jung C, Vallbracht A, Flehmig B. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J Med Virol*. 2004;72(1):10-16. doi:10.1002/JMV.10532
 58. Innis BL, Snitbhan R, Kunasol P, et al. Protection Against Hepatitis A by an Inactivated Vaccine. *JAMA*. 1994;271(17):1328-1334. doi:10.1001/JAMA.1994.03510410040030
 59. Rosenblum LS, Villarino ME, Nainan O V., et al. Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants. *J Infect Dis*. 1991;164(3):476-482. doi:10.1093/INFDIS/164.3.476
 60. Sjogren MH, Tanno H, Fay O, et al. Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann Intern Med*. 1987;106(2):221-226. doi:10.7326/0003-4819-106-2-221
 61. Wang M, Feng Z. Mechanisms of Hepatocellular Injury in Hepatitis A. *Viruses*. 2021;13:861. doi:10.3390/v13050861
 62. Vallbracht A, Maier K, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehmig B, Fleischer B. Liver-derived cytotoxic T cells in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis*. 1989;160(2):209-217. doi:10.1093/INFDIS/160.2.209
 63. Belkaya S, Michailidis E, Korol CB, et al. Inherited IL-18BP deficiency in human fulminant viral hepatitis. *J Exp Med*. 2019;216(8):1777-1790. doi:10.1084/JEM.20190669
 64. Kim HY, Eyheramonho MB, Pichavant M, et al. A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans. *J Clin Invest*. 2011;121(3):1111. doi:10.1172/JCI44182
 65. Hirai-Yuki A, Whitmire JK, Joyce M, Tyrrell DL, Lemon SM. Murine Models of Hepatitis A Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(1). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A031674
 66. Feng Z, Li Y, McKnight KL, et al. Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J Clin Invest*. 2015;125(1):169-176. doi:10.1172/JCI77527
 67. Armstrong GL, Bell BP. Hepatitis A virus infections in the United States: model-based estimates and implications for childhood immunization. *Pediatrics*. 2002;109(5):839-845. doi:10.1542/PEDS.109.5.839
 68. Koff RS. Clinical manifestations and diagnosis of hepatitis A virus infection. *Vaccine*. 1992;10(SUPPL. 1). doi:10.1016/0264-410X(92)90533-P
 69. Lin KY, Chen GJ, Lee YL, et al. Hepatitis A virus infection and hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-positive patients: A review. *World J Gastroenterol*. 2017;23(20):3589-3606. doi:10.3748/wjg.v23.i20.3589
 70. De Paula VS. Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virol*. 2012;7(5):461-472. doi:10.2217/fvl.12.35
 71. Tong MJ, El-Farra NS, Grew MI. Clinical manifestations of hepatitis a: Recent experience in a community teaching hospital. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;171. doi:10.1093/infdis/171.Supplement_1.S15

72. Jung YJ, Kim W, Jeong JB, et al. Clinical features of acute renal failure associated with hepatitis A virus infection. *J Viral Hepat.* 2010;17(9):611-617. doi:10.1111/J.1365-2893.2009.01216.X
73. Krishna YR, Saraswat VA, Das K, et al. Clinical features and predictors of outcome in acute hepatitis A and hepatitis E virus hepatitis on cirrhosis. *Liver International.* 2009;29(3):392-398. doi:10.1111/J.1478-3231.2008.01887.X
74. Su CW, Wu JC, Huang YS, et al. Comparison of clinical manifestations and epidemiology between acute hepatitis A and acute hepatitis E in Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(11):1187-1191. doi:10.1046/J.1440-1746.2002.02858.X
75. Park SJ, Kim JD, Seo YS, et al. Computed tomography findings for predicting severe acute hepatitis with prolonged cholestasis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(16):2543-2549. doi:10.3748/WJG.V19.I16.2543
76. Glikson M, Galun E, Oren R, Tur-Kaspa R, Shouval D. Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. *Medicine.* 1992;71(1):14-23. doi:10.1097/00005792-199201000-00002
77. Jung YM, Park SJ, Kim JS, et al. Atypical manifestations of hepatitis A infection: A prospective, multicenter study in Korea. *J Med Virol.* 2010;82(8):1318-1326. doi:10.1002/JMV.21822
78. Cooksley WGE. What did we learn from the Shanghai hepatitis A epidemic? *J Viral Hepat.* 2000;7(SUPPL. 1):1-3. doi:10.1046/J.1365-2893.2000.00021.X
79. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schioødt F V., et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med.* 2002;137(12):947-954. doi:10.7326/0003-4819-137-12-200212170-00007
80. Chen CM, Chen SCC, Yang HY, Yang ST, Wang CM. Hospitalization and mortality due to hepatitis A in Taiwan: a 15-year nationwide cohort study. *J Viral Hepat.* 2016;23(11):940-945. doi:10.1111/JVH.12564
81. Lin L, Verslype C, Van Pelt JF, Van Ranst M, Fevery J. Viral interaction and clinical implications of coinfection of hepatitis C virus with other hepatitis viruses. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18(12):1311-1319. doi:10.1097/01.MEG.0000243881.09820.09
82. Taylor RM, Davern T, Munoz S, et al. Fulminant hepatitis A virus infection in the United States: Incidence, prognosis, and outcomes. *Hepatology.* 2006;44(6):1589-1597. doi:10.1002/HEP.21439
83. Kim JM, Lee YS, Lee JH, Kim W, Lim KS. Clinical outcomes and predictive factors of spontaneous survival in patients with fulminant hepatitis A. *Korean J Hepatol.* 2008;14(4):474-482. doi:10.3350/KJHEP.2008.14.4.474
84. Muñoz Bertrán E, Salazar VR, Hostalet Robles F, Correa Estañ JA, Belda Abad G, Muñoz Ramírez E. Hepatitis autoimmune desencadenada por una hepatitis aguda por virus de la hepatitis A. *Gastroenterol Hepatol.* 2002;25(8):501-504. doi:10.1016/S0210-5705(02)70300-2
85. Huppertz HI, Triechel U, Gassel AM, Jeschke R, Meyer zum Büschenfelde KH. Autoimmune hepatitis following hepatitis A virus infection. *J Hepatol.* 1995;23(2):204-208. doi:10.1016/0168-8278(95)80336-X
86. Choi HK, Song YG, Han SH, et al. Clinical features and outcomes of acute kidney injury among patients with acute hepatitis A. *Journal of Clinical Virology.* 2011;52(3):192-197. doi:10.1016/J.JCV.2011.07.013
87. Jeong SH, Lee HS. Hepatitis A: Clinical Manifestations and Management. *Intervirol.* 2010;53:15-19. doi:10.1159/000252779
88. Kim HW, Yu MH, Lee JH, et al. Experiences with acute kidney injury complicating non-fulminant hepatitis A. *Nephrology.* 2008;13(6):451-458. doi:10.1111/J.1440-1797.2008.00974.X



89. Mourani S, Dobbs SM, Genta RM, Tandon AK, Yoffe B. Hepatitis A virus-associated cholecystitis. *Ann Intern Med.* 1994;120(5):398-400. doi:10.7326/0003-4819-120-5-199403010-00008
90. Chonmaitree P, Methawasiri K. Transverse Myelitis in Acute Hepatitis A Infection: The Rare Co-Occurrence of Hepatology and Neurology. *Case Rep Gastroenterol.* 2016;10:44-49. doi:10.1159/000444013
91. Desai AN, Kim AY. Management of Hepatitis A in 2020-2021. *JAMA.* 2020;324(4):383-384. doi:10.1001/JAMA.2020.4017
92. Lee HK, Kim KA, Lee JS, Kim NH, Bae WK, Song TJ. Window period of anti-hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies in diagnosing acute hepatitis A. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013;25(6):665-668. doi:10.1097/MEG.0B013E32835DF262
93. Castrodale L, Fiore A, Schmidt T. Detection of immunoglobulin M antibody to hepatitis A virus in Alaska residents without other evidence of hepatitis. *Clin Infect Dis.* 2005;41(9). doi:10.1086/497073
94. Tennant E, Post JJ. Production of False-Positive Immunoglobulin M Antibodies to Hepatitis A Virus in Autoimmune Events. *J Infect Dis.* 2016;213(2):324-325. doi:10.1093/INFDIS/JIV417
95. Aguilera Guirao A, Alonso Fernández R, Córdoba Cortijo J, Fuertes Ortiz de Urbina A. *Diagnóstico Microbiológico de Las Hepatitis Víricas.*; 2014.
96. Abutaleb A, Kottilil S. Hepatitis A: Epidemiology, Natural History, Unusual Clinical Manifestations, and Prevention. doi:10.1016/j.gtc.2020.01.002
97. Ortiz De Lejarazu R, Avellón A, Eiros JM. Diagnóstico microbiológico de las hepatitis víricas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24(3):194-204. doi:10.1157/13086553
98. Hughes JA, Fontaine MJ, Gonzalez CL, Layon AG, Goodnough LT, Galel SA. Case report of a transfusion-associated hepatitis A infection. *Transfusion (Paris).* 2014;54(9):2202-2206. doi:10.1111/TRF.12648
99. Lanford RE, Feng Z, Chavez D, et al. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(27):11223-11228. doi:10.1073/PNAS.1101939108/-/DCSUPPLEMENTAL/SD01.XLSX
100. Hirai-Yuki A, Hensley L, McGivern DR, et al. MAVS-dependent Host Species Range and Pathogenicity of Human Hepatitis A Virus. *Science.* 2016;353(6307):1541. doi:10.1126/SCIENCE.AAF8325
101. Yang Y, Liang Y, Qu L, et al. Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(17):7253. doi:10.1073/PNAS.0611506104
102. Wang D, Fang L, Wei D, et al. Hepatitis A virus 3C protease cleaves NEMO to impair induction of beta interferon. *J Virol.* 2014;88(17):10252-10258. doi:10.1128/JVI.00869-14
103. Qu L, Feng Z, Yamane D, et al. Disruption of TLR3 Signaling Due to Cleavage of TRIF by the Hepatitis A Virus Protease-Polymerase Processing Intermediate, 3CD. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):1002169. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1002169
104. Manangeeswaran M, Jacques J, Tami C, et al. Binding of hepatitis A virus to its cellular receptor 1 inhibits T-regulatory cell functions in humans. *Gastroenterology.* 2012;142(7). doi:10.1053/J.GASTRO.2012.02.039
105. Lemon SM, Binn LN. Serum Neutralizing Antibody Response to Hepatitis A Virus. *J Infect Dis.* 1983;148(6):1033-1039. doi:10.1093/INFDIS/148.6.1033
106. Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol.* 1992;66(4):2208. doi:10.1128/JVI.66.4.2208-2216.1992



107. Crum-Cianflone NF, Wilkins K, Lee AW, et al. Long-term durability of immune responses after hepatitis A vaccination among HIV-infected adults. *J Infect Dis*. 2011;203(12):1815-1823. doi:10.1093/INFDIS/JIR180
108. Dotzauer A, Heitmann A, Laue T, et al. The role of immunoglobulin A in prolonged and relapsing hepatitis A virus infections. *J Gen Virol*. 2012;93(Pt 4):754-760. doi:10.1099/VIR.0.038406-0
109. Gagneux P, Varki A. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*. 1999;9(8):747-755. doi:10.1093/GLYCOB/9.8.747
110. Sánchez G, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Capsid Region Involved in Hepatitis A Virus Binding to Glycophorin A of the Erythrocyte Membrane. *J Virol*. 2004;78(18):9807. doi:10.1128/JVI.78.18.9807-9813.2004
111. Costafreda MI, Ribes E, Franch À, Bosch A, Pintó RM. A Single Mutation in the Glycophorin A Binding Site of Hepatitis A Virus Enhances Virus Clearance from the Blood and Results in a Lower Fitness Variant. *J Virol*. 2012;86(15):7887. doi:10.1128/JVI.00707-12
112. Zhou Y, Callendret B, Xu D, et al. Dominance of the CD4(+) T helper cell response during acute resolving hepatitis A virus infection. *J Exp Med*. 2012;209(8):1481-1492. doi:10.1084/JEM.20111906
113. Hofmeister MG, Foster MA, Teshale EH. Epidemiology and Transmission of Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus Infections in the United States. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(4). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A033431
114. Cohen JI, Feinstone S, Purcell RH. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J Infect Dis*. 1989;160(5):887-890. doi:10.1093/INFDIS/160.5.887
115. Mahboobi N, Porter SR, Karayiannis P, Alavian SM. Oral fluid and hepatitis A, B and C: a literature review. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(7):505-516. doi:10.1111/J.1600-0714.2011.01123.X
116. Klevens RM, Miller JT, Iqbal K, et al. The Evolving Epidemiology of Hepatitis A in the United States: Incidence and Molecular Epidemiology From Population-Based Surveillance, 2005-2007. *Arch Intern Med*. 2010;170(20):1811-1818. doi:10.1001/ARCHINTERNMED.2010.401
117. Rodrigues L, Pista A, Oliveira A, Água-Doce I, Manita C, Paixão MT. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in a group of Portuguese citizens living in Lisbon area. *J Med Virol*. 2007;79(5):483-487. doi:10.1002/JMV.20851
118. Perevoscikovs J, Lucenko I, Magone S, Brila A, Curikova J, Vennema H. Community-wide outbreak of hepatitis A in Latvia in 2008 - an update. *Euro Surveillance*. 2009;14(3). doi:10.2807/ESE.14.03.19092-EN/CITE/PLAINTEXT
119. Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, et al. Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*. Published online 2014. doi:10.1016/j.meegid.2013.10.023
120. Jacobsen KH. Globalization and the Changing Epidemiology of Hepatitis A Virus. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(10). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A031716
121. Jacobsen KH, Koopman JS. The effects of socioeconomic development on worldwide hepatitis A virus seroprevalence patterns. *Int J Epidemiol*. 2005;34(3):600-609. doi:10.1093/IJE/DYI062
122. Chobe L, Arankalle V. Investigation of a hepatitis A outbreak from Shimla Himachal Pradesh. *Indian J Med Res*. 2009;130(2):179-184.
123. Fiore AE. Hepatitis A transmitted by food. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;38(5):705-715. doi:10.1086/381671/2/38-5-705-FIG003.GIF



124. Tavoschi L, Severi E, Niskanen T, et al. Food-borne diseases associated with frozen berries consumption: a historical perspective, European Union, 1983 to 2013. *Euro Surveill.* 2015;20(29). doi:10.2807/1560-7917.ES2015.20.29.21193
125. Enriquez R, Frösner GG, Hochstein-Mintzel V, Riedemann S, Reinhardt G. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *J Med Virol.* 1992;37(3):174-179. doi:10.1002/JMV.1890370305
126. Xu ZY, Li ZH, Wang JX, Xiao ZP, Dong DX. Ecology and prevention of a shellfish-associated hepatitis A epidemic in Shanghai, China. *Vaccine.* 1992;10(1). doi:10.1016/0264-410X(92)90547-W
127. Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, et al. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *Journal of Infectious Diseases.* 1991;164(5):852-859. doi:10.1093/infdis/164.5.852
128. Sánchez G, Pintó RM, Vanaclocha H, Bosch A. Molecular Characterization of Hepatitis A Virus Isolates from a Transcontinental Shellfish-Borne Outbreak. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):4148. doi:10.1128/JCM.40.11.4148-4155.2002
129. Kirk MD, Pires SM, Black RE, et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med.* 2015;12(12). doi:10.1371/JOURNAL.PMED.1001921
130. D'Hont F, Chico Mena M. Vigilancia epidemiológica de la Hepatitis A en 2017. *Apuntes de Ciencia.* 2018;8(2):15-20.
131. Taffon S, Bidini G, Vichi F, et al. A unique HAV strain circulated in patients with acute HAV infection with different risk exposures in Tuscany, Italy. *Journal of Clinical Virology.* 2011;50(2):142-147. doi:10.1016/J.JCV.2010.10.011
132. Bordi L, Rozera G, Scognamiglio P, et al. Monophyletic outbreak of Hepatitis A involving HIV-infected men who have sex with men, Rome, Italy 2008–2009. *Journal of Clinical Virology.* 2012;54(1):26-29. doi:10.1016/J.JCV.2012.01.009
133. Sfetcu O, Irvine N, Ngui SL, Emerson C, Mccaughey C, Donaghy P. Hepatitis A outbreak predominantly affecting men who have sex with men in Northern Ireland, october 2008 to july 2009. *Eurosurveillance.* 2011;16(9):1-6. doi:10.2807/ESE.16.09.19808-EN/CITE/PLAINTEXT
134. Stene-Johansen K, Jenum PA, Hoel T, Blystad H, Sunde H, Skaug K. An outbreak of hepatitis A among homosexuals linked to a family outbreak. *Epidemiol Infect.* 2002;129(1):113-117.
135. Stene-Johansen K, Tjon G, Schreier E, et al. Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *J Med Virol.* 2007;79(4):356-365. doi:10.1002/JMV.20781
136. Regan DG, Wood JG, Benevent C, et al. Estimating the critical immunity threshold for preventing hepatitis A outbreaks in men who have sex with men. *Epidemiol Infect.* 2016;144(7):1528-1537. doi:10.1017/S0950268815002605
137. Lin KY, Chen GJ, Lee YL, et al. Hepatitis A virus infection and hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-positive patients: A review. *World J Gastroenterol.* 2017;23(20). doi:10.3748/wjg.v23.i20.3589
138. Allard R, Beauchemin J, Bédard L, Dion R, Tremblay M, Carsley J. Hepatitis A vaccination during an outbreak among gay men in Montréal, Canada, 1995–1997. *J Epidemiol Community Health (1978).* 2001;55(4):251-256. doi:10.1136/JECH.55.4.251
139. Person MJ, Young LC, Stokes ML. Changing epidemiology of hepatitis A in the 1990s in Sydney, Australia. *Epidemiol Infect.* 1998;121(3):631. doi:10.1017/S0950268898001563

140. Tortajada C, de Olalla PG, Diez E, et al. Hepatitis a among men who have sex with men in Barcelona, 1989-2010: insufficient control and need for new approaches. *BMC Infect Dis.* 2012;12:11. doi:10.1186/1471-2334-12-11
141. Høybye G, Skinhøj P, Hentzer B, Faber V, Mathiesen L. An epidemic of acute viral hepatitis in male homosexuals. Etiology and clinical characteristics. *Scand J Infect Dis.* 1980;12(4):241-244.
142. Christenson B, Broström CH, Büttiger M, et al. An epidemic outbreak of hepatitis A among homosexual men in Stockholm. Hepatitis A, a special hazard for the male homosexual subpopulation in Sweden. *Am J Epidemiol.* 1982;116(4):599-607. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A113442
143. Mindel A, Tedder R. Hepatitis A in homosexuals. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1981;282(6277):1666. doi:10.1136/BMJ.282.6277.1666
144. Henning KJ, Bell E, Braun J, Barker ND. A community-wide outbreak of hepatitis a: Risk factors for infection among homosexual and bisexual men. *Am J Med.* 1995;99(2):132-136. doi:10.1016/S0002-9343(99)80132-6
145. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis A vaccination of men who have sex with men--Atlanta, Georgia, 1996-1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1998;47(34):708-711.
146. Cotter SM, Sansom S, Long T, et al. Outbreak of hepatitis A among men who have sex with men: implications for hepatitis A vaccination strategies. *J Infect Dis.* 2003;187(8):1235-1240. doi:10.1086/374057
147. Kani J, Nandwani R, Gilson RJC, Johnson AM, Maguire HC, Tedder RS. Hepatitis A virus infection among homosexual men. *BMJ : British Medical Journal.* 1991;302(6789):1399. doi:10.1136/BMJ.302.6789.1399-A
148. Atkins M, Zambon M, Watkins P. Hepatitis A virus infection. Should susceptible homosexual men be offered immunization. *Br Med J.* 1993;307(6903):562-562. doi:10.1136/BMJ.307.6903.562
149. Walsh B, Sundkvist T, Maguire H, Young Y, Heathcock R, Iverson A. Rise in hepatitis A among gay men in the Thames regions 1995 and 1996. *Sex Transm Infect.* 1996;72(6):449-450. doi:10.1136/STI.72.6.449
150. Bell A, Ncube F, Hansell A, et al. An outbreak of hepatitis A among young men associated with having sex in public venues. *Commun Dis Public Health.* 2001;4(3):163-170.
151. Leentvaar-kuijpers A, Kool JL, Veugelers PJ, Coutinho RA, Van Griensven GJP. An Outbreak of Hepatitis A among Homosexual Men in Amsterdam, 1991–1993. *Int J Epidemiol.* 1995;24(1):218-222. doi:10.1093/IJE/24.1.218
152. Stewart T, Crofts N. An Outbreak of Hepatitis a Among Homosexual Men in Melbourne. *Medical Journal of Australia.* 1993;158(9):519-521. doi:10.5694/J.1326-5377.1993.TB121865.X
153. Stokes ML, Ferson MJ, Young LC, Person MJ. Outbreak of hepatitis A among homosexual men in Sydney. *Am J Public Health.* 1997;87(12):2039. doi:10.2105/AJPH.87.12.2039
154. Delpech V, Thackway S, Young L, Pontivivo G. Hepatitis A in south-eastern Sydney 1997-1999: continuing concerns for gay men and an outbreak among illicit drug users. *Commun Dis Intell.* 2000;24(7):203-206.
155. European Centre for Disease Prevention and Control. *Hepatitis A Outbreak in the EU/EEA Mostly Affecting Men Who Have Sex with Men - Third Update, 28 June 2017.*; 2017.
156. Freidl GS, Sonder GJ, Bovée LP, et al. Hepatitis a outbreak among men who have sex with men (MSM) predominantly linked with the EuroPride, the Netherlands, July 2016 to February 2017. *Eurosurveillance.* 2017;22(8). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.8.30468



157. Rivas V, Barrera A, Pino K, et al. Hepatitis A outbreak since November 2016 affecting men who have sex with men (MSM) in Chile connected to the current outbreak in MSM in Europe, situation up to October 2017. *Eurosurveillance*. 2018;23(9). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.18-00060
158. Manfredi R, Calza L, Chiodo F. Changing epidemiology of hepatitis A in the Bologna metropolitan area, northern Italy: importance of counselling and prophylactic measures for the male homo/bisexual population. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(10):845-848. doi:10.1111/J.1469-0691.2005.01219.X
159. Girardi E, Scognamiglio P, Sciarrone MR, et al. High HIV prevalence in male patients with acute hepatitis A in the Rome metropolitan area, Italy 2002–2008. *J Hepatol*. 2011;54(6):1102-1106. doi:10.1016/J.JHEP.2010.09.024
160. Dabrowska MM, Nazzal K, Wiercinska-Drapalo A. Hepatitis A and hepatitis A virus/HIV coinfection in men who have sex with men, Warsaw, Poland, September 2008 to September 2009. *Eurosurveillance*. 2011;16(34):19950. doi:10.2807/ESE.16.34.19950-EN/CITE/PLAINTEXT
161. Gushulak BD, MacPherson DW. Population mobility and infectious diseases: the diminishing impact of classical infectious diseases and new approaches for the 21st century. *Clin Infect Dis*. 2000;31(3):776-780. doi:10.1086/313998
162. Boggild AK, Castelli F, Gautret P, et al. Vaccine preventable diseases in returned international travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Vaccine*. 2010;28(46):7389-7395. doi:10.1016/J.VACCINE.2010.09.009
163. WHO position paper on hepatitis A vaccines: June 2012-recommendations. *Vaccine*. 2013;31(2):285-286. doi:10.1016/J.VACCINE.2012.10.102
164. Heywood AE, Nothdurft H, Tessier D, et al. Pre-travel advice, attitudes and hepatitis A and B vaccination rates among travellers from seven countries†. *J Travel Med*. 2016;24(1). doi:10.1093/JTM/TAW069
165. Namikawa K, Iida T, Ouchi K, Kimura M. Knowledge, attitudes, and practices of Japanese travelers on infectious disease risks and immunization uptake. *J Travel Med*. 2010;17(3):171-175. doi:10.1111/J.1708-8305.2010.00405.X
166. Chin BS, Kim JY, Gianella S, Lee M. Travel Pattern and Prescription Analysis at a Single Travel Clinic Specialized for Yellow Fever Vaccination in South Korea. *Infect Chemother*. 2016;48(1):20. doi:10.3947/IC.2016.48.1.20
167. Pedersini R, Marano C, De Moerlooze L, Chen L, Vietri J. HAV & HBV vaccination among travellers participating in the National Health and Wellness Survey in five European countries. *Travel Med Infect Dis*. 2016;14(3):221-232. doi:10.1016/J.TMAID.2016.03.008
168. Lammert SM, Rao SR, Jentes ES, et al. Refusal of recommended travel-related vaccines among U.S. international travellers in Global TravEpiNet. *J Travel Med*. 2016;24(1). doi:10.1093/JTM/TAW075
169. Leder K, Torresi J, Libman MD, et al. GeoSentinel Surveillance of Illness in Returned Travelers, 2007–2011. *Ann Intern Med*. 2013;158(6):456. doi:10.7326/0003-4819-158-6-201303190-00005
170. Van Genderen PJJ, Van Thiel PPAM, Mulder PGH, Overbosch D. Trends in knowledge, attitudes, and practices of travel risk groups toward prevention of hepatitis A: results from the Dutch Schiphol Airport survey 2002 to 2009. *J Travel Med*. 2012;19(1):35-43. doi:10.1111/J.1708-8305.2011.00578.X
171. Sundkvist T, Johansson B, Widell A. Rectum Carried Drugs May Spread Hepatitis a among Drug Addicts. *Scand J Infect Dis*. 1985;17(1):1-4. doi:10.3109/00365548509070411
172. Leino T, Leinikki P, Hyypiä T, et al. Hepatitis A Outbreak Amongst Intravenous Amphetamine Abusers in Finland. *Scand J Infect Dis*. 1997;29(3):213-216. doi:10.3109/00365549709019029



173. Stene-Johansen K, Skaug K, Blystad H, et al. A Unique Hepatitis A Virus Strain Caused an Epidemic in Norway Associated with Intravenous Drug Abuse. *Scand J Infect Dis*. 1998;30(1):35-38. doi:10.1080/003655498750002277
174. O'donovan D, Cooke R, RPD, Joce R, Eastbury A, Waite J, Stene-Johansen & K. An outbreak of hepatitis A amongst injecting drug users. *Epidemiol Infect*. 2001;127:469-473. doi:10.1017/S0950268801006185
175. Harkess J, Gildon B, Istre GR. Outbreaks of hepatitis A among illicit drug users, Oklahoma, 1984-87. *Am J Public Health*. 1989;79(4):463-466. doi:10.2105/AJPH.79.4.463
176. Centers for Disease Control. Hepatitis A among drug abusers. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1988;37:297-300.
177. Hutin YJF, Sabin KM, Hutwagner LC, et al. Multiple modes of hepatitis A virus transmission among methamphetamine users. *Am J Epidemiol*. 2000;152(2):186-192. doi:10.1093/AJE/152.2.186
178. Spada E, Genovese D, Tosti ME, et al. An outbreak of hepatitis A virus infection with a high case-fatality rate among injecting drug users. *J Hepatol*. 2005;43(6):958-964. doi:10.1016/J.JHEP.2005.06.012
179. Manor Y, Lewis M, Ram D, et al. Evidence for Hepatitis A Virus Endemic Circulation in Israel Despite Universal Toddler Vaccination Since 1999 and Low Clinical Incidence in All Age Groups. *J Infect Dis*. 2017;215(4):574-580. doi:10.1093/INFDIS/JIW611
180. Stene-Johansen K, Jonassen TØ, Skaug K. Characterization and genetic variability of Hepatitis A virus genotype IIIA. *Journal of General Virology*. 2005;86(10):2739-2745. doi:10.1099/VIR.0.81155-0/CITE/REFWORKS
181. Spada E, Genovese D, Tosti ME, et al. An outbreak of hepatitis A virus infection with a high case-fatality rate among injecting drug users. *J Hepatol*. 2005;43(6):958-964. doi:10.1016/J.JHEP.2005.06.012
182. Ngui SL, Granerod J, Jewes LA, Crowcroft NS, Teo CG. Outbreaks of hepatitis A in England and Wales associated with two co-circulating hepatitis A virus strains. *J Med Virol*. 2008;80(7):1181-1188. doi:10.1002/JMV.21207
183. Mukomolov S, Kontio M, Zheleznova N, et al. Increased circulation of hepatitis A virus genotype IIIA over the last decade in St Petersburg, Russia. *J Med Virol*. 2012;84(10):1528-1534. doi:10.1002/JMV.23378
184. Davidkin I, Zheleznova N, Jokinen S, Gorchakova O, Broman M, Mukomolov S. Molecular epidemiology of hepatitis A in St. Petersburg, Russia, 1997–2003. *J Med Virol*. 2007;79(6):657-662. doi:10.1002/JMV.20843
185. Watson JC, Fleming DW, Borella AJ, Olcott ES, Conrad RE, Baron RC. Vertical transmission of hepatitis A resulting in an outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Infect Dis*. 1993;167(3):567-571. doi:10.1093/INFDIS/167.3.567
186. Tanaka I, Shima M, Kubota Y, Takahashi Y, Kawamata O, Yoshioka A. Vertical transmission of hepatitis A virus. *Lancet*. 1995;345(8946):397. doi:10.1016/S0140-6736(95)90389-5
187. Erkan T, Kutlu T, Çullu F, Tümay GT. A case of vertical transmission of hepatitis A virus infection. *Acta Paediatr*. 1998;87(9):1008-1009. doi:10.1080/080352598750031725
188. Urganci N, Arapoglu M, Akyildiz B, Nuhoglu A. Neonatal cholestasis resulting from vertical transmission of hepatitis A infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(4):381-382. doi:10.1097/00006454-200304000-00023
189. Motte A, Blanc J, Minodier P, Colson P. Acute hepatitis A in a pregnant woman at delivery. *Int J Infect Dis*. 2009;13(2). doi:10.1016/J.IJID.2008.06.009
190. Renge RL, Dani VS, Chitambar SD, Arankalle VA. Vertical transmission of hepatitis A. *Indian J Pediatr*. 2002;69(6):535-536. doi:10.1007/BF02722662



191. Leikin E, Lysikiewicz A, Garry D, Tejani N. Intrauterine transmission of hepatitis A virus. *Obstet Gynecol.* 1996;88(4 Pt 2):690-691.
192. McDuffie RS, Bader T. Fetal meconium peritonitis after maternal hepatitis A. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(4):1031-1032. doi:10.1016/S0002-9378(99)70678-2
193. Elinav E, Ben-Dov IZ, Shapira Y, et al. Acute Hepatitis A Infection in Pregnancy Is Associated With High Rates of Gestational Complications and Preterm Labor. *Gastroenterology.* 2006;130(4):1129-1134. doi:10.1053/J.GASTRO.2006.01.007
194. Cho GJ, Kim YB, Kim SM, et al. Hepatitis A virus infection during pregnancy in Korea: Hepatitis A infection on pregnant women. *Obstet Gynecol Sci.* 2013;56(6):368. doi:10.5468/OGS.2013.56.6.368
195. Miguères M, Lhomme S, Izopet J. Hepatitis A: Epidemiology, High-Risk Groups, Prevention and Research on Antiviral Treatment. *Viruses.* 2021;13. doi:10.3390/v13101900
196. Jacobsen KH, Wiersma ST. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine.* 2010;28(41):6653-6657. doi:10.1016/J.VACCINE.2010.08.037
197. Mohd Hanafiah K, Jacobsen KH, Wiersma ST. Challenges to mapping the health risk of hepatitis A virus infection. *Int J Health Geogr.* 2011;10(1):1-8. doi:10.1186/1476-072X-10-57/TABLES/2
198. World Health Organization. *WHO Immunological Basis for Immunization Series, Module 18: Hepatitis A Update.*; 2019.
199. Gossner CM, Severi E, Danielsson N, Hutin Y, Coulobrier D. Changing hepatitis A epidemiology in the European Union: new challenges and opportunities. *Euro surveillance : European communicable disease bulletin.* 2015;20(16). doi:10.2807/1560-7917.ES2015.20.16.21101
200. Barnett ED, Macpherson DW, Stauffer WM, et al. The Visiting Friends or Relatives Traveler in the 21st Century: Time for a New Definition. *J Travel Med.* 2010;17:163-170. doi:10.1111/j.1708-8305.2010.00411.x
201. Bui YG, Trépanier S, Milord F, Blackburn M, Provost S, Gagnon S. Cases of malaria, hepatitis A, and typhoid fever among VFRs, Quebec (Canada). *J Travel Med.* 2011;18(6):373-378. doi:10.1111/J.1708-8305.2011.00556.X
202. Green MS, Block C, Slater PE. Rise in the incidence of viral hepatitis in Israel despite improved socioeconomic conditions. *Rev Infect Dis.* 1989;11(3):464-469. doi:10.1093/CLINIDS/11.3.464
203. Aggarwal R, Goel A. Hepatitis A: Epidemiology in resource-poor countries. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28(5):488-496. doi:10.1097/QCO.000000000000188
204. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Foodborne viruses. *Curr Opin Food Sci.* 2016;8:110-119. doi:10.1016/J.COFS.2016.04.002
205. Chitambar S, Joshi M, Lole K, Walimbe A, Vaidya S. Cocirculation of and coinfections with hepatitis A virus subgenotypes IIIA and IB in patients from Pune, western India. *Hepatology Research.* 2007;37(2):85-93. doi:10.1111/J.1872-034X.2007.00025.X
206. Wasley A, Samandari T, Bell BP. Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination. *JAMA.* 2005;294(2):194-201. doi:10.1001/JAMA.294.2.194
207. Miyamura T, Ishii K, Kanda T, et al. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: Recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research.* 2012;42(3):248-253. doi:10.1111/J.1872-034X.2011.00919.X
208. Tallo T, Norder H, Tefanova V, et al. Sequential changes in hepatitis A virus genotype distribution in Estonia during 1994 to 2001. *J Med Virol.* 2003;70(2):187-193. doi:10.1002/JMV.10377



209. Gillesberg Lassen S, Soborg B, Midgley SE, et al. Nordic countries affected. *Euro Surveill.* 2012;18(17). Accessed April 21, 2022. [www.eurosurveillance.org:pii=20467](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20467). Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20467>
210. Mukomolov S, Kontio M, Zheleznova N, et al. Increased circulation of hepatitis A virus genotype IIIA over the last decade in St Petersburg, Russia. *J Med Virol.* 2012;84(10):1528-1534. doi:10.1002/JMV.23378
211. Cianciara J. Hepatitis A shifting epidemiology in Poland and Eastern Europe. *Vaccine.* 2000;18 Suppl 1(SUPPL. 1). doi:10.1016/S0264-410X(99)00469-7
212. Tanaka J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine.* 2000;18 Suppl 1(SUPPL. 1). doi:10.1016/S0264-410X(99)00466-1
213. Yun H, Lee HJ, Jang JH, et al. Hepatitis A Virus genotype and its correlation with the clinical outcome of acute hepatitis A in Korea: 2006–2008. *J Med Virol.* 2011;83(12):2073-2081. doi:10.1002/JMV.22229
214. Hussain Z, Husain SA, Almajhdi FN, Kar P. Immunological and molecular epidemiological characteristics of acute and fulminant viral hepatitis A. *Viol J.* 2011;8(1):1-10. doi:10.1186/1743-422X-8-254/FIGURES/6
215. D'Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, de Castellarnau M, et al. Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):6842-6854. doi:10.3390/IJMS16046842
216. Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Lite J, et al. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005–2009: Circulation of newly emerging strains. *Journal of Clinical Virology.* 2011;52(2):98-102. doi:10.1016/J.JCV.2011.06.011
217. Carrillo-Santistevé P, Tavoschi L, Severi E, et al. Seroprevalence and susceptibility to hepatitis A in the European Union and European Economic Area: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(10):e306-e319. doi:10.1016/S1473-3099(17)30392-4
218. European Centre for Disease Prevention and Control Estocolmo. Outbreak of hepatitis A virus infection in travellers returning from Egypt. Rapid risk assessment. Published April 2013. Accessed May 11, 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/RA-Outbreak-hepatitis-A-virus-infection-travellers-returning-from-Egypt.pdf>
219. Petriagnani M, Harms M, Verhoef L, et al. Update: A food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands related to semi-dried tomatoes in oil, January-February 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(20).
220. Nordic Outbreak Investigation Team C. Joint analysis by the Nordic countries of a hepatitis A outbreak, October 2012 to June 2013: frozen strawberries suspected. *Euro Surveill.* 2013;18(27):205-220. www.eurosurveillance.org
221. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). European Food Safety Authority. *Update: Outbreak of Hepatitis A Virus Infection in Italy and Ireland.*; 2013.
222. Robesyn E, De Schrijver K, Wollants E, Top G, Verbeeck J, Van Ranst M. An outbreak of hepatitis A associated with the consumption of raw beef. *Journal of Clinical Virology.* 2009;44(3):207-210. doi:10.1016/J.JCV.2008.12.012
223. Ndumbi P, Freidl GS, Williams CJ, et al. Hepatitis A outbreak disproportionately affecting men who have sex with men (MSM) in the European Union and European Economic Area, June 2016 to May 2017. *Eurosurveillance.* 2018;23(33):1-12. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.33.1700641
224. Mellou K, Chrysostomou A, Sideroglou T, et al. Epidemiology of hepatitis A in Greece in the last decade: management of reported cases and outbreaks and lessons learned. *Epidemiol Infect.* 2020;148. doi:10.1017/S0950268820000382



225. Chironna M, Prato R, Sallustio A, et al. Hepatitis A in Puglia (South Italy) after 10 years of universal vaccination: Need for strict monitoring and catch-up vaccination. *BMC Infect Dis.* 2012;12(1):1-9. doi:10.1186/1471-2334-12-271/FIGURES/3
226. Grupo de Trabajo de Hepatitis A. *Recomendaciones de Vacunación Frente a Hepatitis A En Grupos de Riesgo. Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones.*; 2017.
227. García-Ferreira AJ, Ortega-Alonso A, Cobos-Rodríguez J, et al. Brote epidémico de hepatitis aguda A en el área sanitaria del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (HUVV): un cambio en la epidemiología. *Revista Española de Enfermedades Digestivas.* 2018;110(6):380-385. doi:10.17235/REED.2018.5207/2017
228. Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Años 2017-2018. Published online 2018. Accessed May 12, 2022. <http://publicaciones.isciii.es>
229. European Centre for Disease Prevention and Control. *Hepatitis A - Annual Epidemiological Report for 2020.*; 2022. Accessed January 26, 2024. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hepatitis-annual-epidemiological-report-2020>
230. RASFF Window. European Commission. *NOTIFICATION 2024.1531 Presencia de Hepatitis A En Fresas de Marruecos. Presence of Hepatitis A in Strawberries from Morocco.*; 2024.
231. Pintó RM, Costafreda MI, Bosch A. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(23):7350. doi:10.1128/AEM.01177-09
232. Lemon SM, Binn LN. Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross-neutralization. *Infect Immun.* 1983;42(1):418-420. Accessed April 20, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6194118>
233. Emerson SU, Huang YK, Nguyen H, et al. Identification of VP1/2A and 2C as Virulence Genes of Hepatitis A Virus and Demonstration of Genetic Instability of 2C. *J Virol.* 2002;76(17):8551. doi:10.1128/JVI.76.17.8551-8559.2002
234. Lemon SM. Immunologic approaches to assessing the response to inactivated hepatitis A vaccine. *J Hepatol.* 1993;18(SUPPL. 2):S15-S19. doi:10.1016/S0168-8278(05)80372-1
235. Fiore AE, Wasley A, Bell BP. *Prevention of Hepatitis A Through Active or Passive Immunization: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).*; 2006. Accessed March 14, 2022. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5507a1.htm>
236. Stalder J, Costanzo A, Daas A, Rautmann G, Buchheit K. Establishment of a biological reference preparation for hepatitis A vaccine (inactivated, non-adsorbed). *Pharmeur Bio Sci Notes.* 2010;April(1):15-29.
237. van Damme P, Matheï C, Thoelen S, Meheus A, Safary A, André FE. Single dose inactivated hepatitis A vaccine: Rationale and clinical assessment of the safety and immunogenicity. *J Med Virol.* 1994;44(4):435-441. doi:10.1002/JMV.1890440422
238. Shouval D, Ashur Y, Adler R, et al. Single and booster dose responses to an inactivated hepatitis A virus vaccine: comparison with immune serum globulin prophylaxis. *Vaccine.* 1993;11(SUPPL. 1):S9-S14. doi:10.1016/0264-410X(93)90151-M
239. Fujiyama S, Iino S, Odoh K, et al. Time course of hepatitis A virus antibody titer after active and passive immunization. *Hepatology.* 1992;15(6):983-988. doi:10.1002/HEP.1840150602
240. Fujiyama S, Odoh K, Kuramoto I, Mizuno K, Tsurusaki R, Sato T. Current seroepidemiological status of hepatitis A with a comparison of antibody titers after

- infection and vaccination. *J Hepatol*. 1994;21(4):641-645. doi:10.1016/S0168-8278(94)80113-4
241. Hanna JN, Hills SL, Humphreys JL. Impact of hepatitis A vaccination of Indigenous children on notifications of hepatitis A in north Queensland. *Medical Journal of Australia*. 2004;181(9):482-485. doi:10.5694/J.1326-5377.2004.TB06404.X
 242. Lopalco PL, Salleras L, Barbuti S, et al. Hepatitis A and B in children and adolescents – what can we learn from Puglia (Italy) and Catalonia (Spain)? *Vaccine*. 2000;19(4-5):470-474. doi:10.1016/S0264-410X(00)00193-6
 243. Bialek SR, Thoroughman DA, Hu D, et al. Hepatitis A Incidence and Hepatitis A Vaccination Among American Indians and Alaska Natives, 1990–2001. *Am J Public Health*. 2004;94(6).
 244. Shire NJ, Welge JA, Sherman KE. Efficacy of inactivated hepatitis A vaccine in HIV-infected patients: a hierarchical bayesian meta-analysis. *Vaccine*. 2006;24(3):272-279. doi:10.1016/J.VACCINE.2005.07.102
 245. Leise MD, Talwalkar JA. Immunizations in chronic liver disease: What should be done and what is the evidence. *Curr Gastroenterol Rep*. 2013;15(1). doi:10.1007/S11894-012-0300-6
 246. Pintó RM, D’Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, et al. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiol*. 2012;7(3):331-346. doi:10.2217/FMB.12.5
 247. Black S, Shinefield H, Hansen J, Lewis E, Su L, Coplan P. A post-licensure evaluation of the safety of inactivated hepatitis A vaccine (VAQTA®, Merck) in children and adults. *Vaccine*. 2004;22(5-6):766-772. doi:10.1016/J.VACCINE.2003.08.034
 248. Corey L, Holmes KK. Sexual Transmission of Hepatitis A in Homosexual Men. *N Engl J Med*. 1980;302(8):435-438. doi:10.1056/NEJM198002213020804
 249. Dritz SK, Ainsworth TE, Back A, et al. Patterns of sexually transmitted enteric diseases in a city. *The Lancet*. 1977;310(8027):3-4. doi:10.1016/S0140-6736(77)90002-2
 250. European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm D 2016. *Rapid Risk Assessment: Hepatitis A Outbreaks in the EU/EEA Mostly Affecting Men Who Have Sex with Men, 20 December 2016*. Accessed January 21, 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-hepatitis-outbreaks-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex>
 251. Freidl GS, Sonder GJ, Bovée LP, et al. Hepatitis a outbreak among men who have sex with men (MSM) predominantly linked with the EuroPride, the Netherlands, July 2016 to February 2017. *Eurosurveillance*. 2017;22(8):30468. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.8.30468/CITE/PLAINTEXT
 252. Suárez GN, Purriños MJ, Pousa A. Brote de hepatitis A en Galicia durante 2016-2018. *Rev Esp Salud Publica*. 2020;94.
 253. Fraile M, Barreiro Alonso E, de la Vega J, Rodríguez M, García-López R, Rodríguez M. Acute hepatitis due to hepatitis A virus during the 2017 epidemic expansion in Asturias. Spain. *Med Clin (Barc)*. 2019;152(10):391-394. doi:10.1016/j.medcli.2018.07.009
 254. Fortea JI, Fernandez González M, Samaniego Vega L, et al. Epidemiology and clinical course of hepatitis A in Cantabria before and after the epidemic outbreak of June 2016. *Rev Clin Esp*. Published online October 10, 2019. doi:10.1016/j.rce.2019.08.005
 255. Rodríguez-Tajes S, Perpiñán E, Caballol B, et al. Hepatitis A outbreak in Barcelona among men who have sex with men (MSM), January-June 2017: A hospital perspective. *Liver International*. 2018;38(4):588-593. doi:10.1111/LIV.13606

256. Lorenzo Ortega R, O'Donnell Cortés B, Ortiz González Serna R, Gallardo García V, López Hernández B. Cambios en el patrón epidemiológico de la hepatitis A en Andalucía: 2007-2017. *Rev Esp Salud Pública*. 2018;92:1-7. Accessed May 23, 2022. www.msc.es/resp
257. Michaelis K, Wenzel JJ, Stark K, Faber M. Hepatitis A virus infections and outbreaks in asylum seekers arriving to Germany, September 2015 to March 2016. 2017;6. doi:10.1038/emi.2017.11
258. HAV Net. Dutch National Institute of Public Health and the Environment (RIVM). PROTOCOL: Molecular Detection and Typing of VP1 region of Hepatitis A virus, HAVnet. Accessed January 20, 2022. <https://www.rivm.nl/sites/default/files/2018-11/Typing%20protocol%20HAVNET%20VP1P2A%20a1a.pdf>
259. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(24):4876-4882. doi:10.1093/NAR/25.24.4876
260. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 2009;25(9):1189. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTP033
261. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*. 2021;38(7):3022-3027. doi:10.1093/MOLBEV/MSAB120
262. Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol*. 2012;61(3):539. doi:10.1093/SYSBIO/SYS029
263. Randazzo W, Piqueras J, Evtoski Z, et al. Interlaboratory Comparative Study to Detect Potentially Infectious Human Enteric Viruses in Influent and Effluent Waters. *Food Environ Virol*. 2019;11(4):350-363. doi:10.1007/S12560-019-09392-2/METRICS
264. Werber D, Michaelis K, Hausner M, et al. Ongoing outbreaks of hepatitis A among men who have sex with men (MSM), Berlin, November 2016 to January 2017 – linked to other German cities and European countries. *Eurosurveillance*. 2017;22(5). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.5.30457
265. Rodríguez-Tajes S, Perpiñán E, Caballol B, et al. Hepatitis A outbreak in Barcelona among men who have sex with men (MSM), January-June 2017: A hospital perspective. *Liver International*. 2018;38(4):588-593. doi:10.1111/liv.13606
266. Beebejaun K, Degala S, Balogun K, et al. Outbreak of hepatitis A associated with men who have sex with men (MSM), England, July 2016 to January 2017. *Euro Surveill*. 2017;22(5):30454. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.5.30454
267. Karthikeyan S, Levy JI, De Hoff P, et al. Wastewater sequencing reveals early cryptic SARS-CoV-2 variant transmission. *Nature*. 2022;609(7925):101-108. doi:10.1038/S41586-022-05049-6
268. Takuissu GR, Kenmoe S, Ebogo-Belobo JT, et al. Occurrence of Hepatitis A Virus in Water Matrices: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2023;20(2). doi:10.3390/IJERPH20021054/S1
269. Infante Urrios A. *Estudio de Las Características Clínico-Microbiológicas de Virus de La Hepatitis A [Tesis Doctoral]*. Universidad de Málaga; 2013.
270. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía. *Protocolo de Vigilancia y Alerta de La Hepatitis A*; 2011.
271. Stene-Johansen K, Tjon G, Schreier E, et al. Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *J Med Virol*. 2007;79(4):356-365. doi:10.1002/JMV.20781

272. Lin KY, Chen GJ, Lee YL, et al. Hepatitis A virus infection and hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-positive patients: A review. *World J Gastroenterol*. 2017;23(20):3589-3606. doi:10.3748/wjg.v23.i20.3589
273. Hernández E, de Castro V, Avellón A, et al. Brote de hepatitis A asociado a un manipulador de alimentos en Bizkaia, 2017. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37(9):569-573. doi:10.1016/J.EIMC.2019.01.011
274. Rezende G, Roque-Afonso AM, Samuel D, et al. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology*. 2003;38(3):613-618. doi:10.1053/JHEP.2003.50366
275. Lee HW, Chang DY, Moon HJ, et al. Clinical Factors and Viral Load Influencing Severity of Acute Hepatitis A. *PLoS One*. 2015;10(6). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0130728
276. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Foodborne viruses. *Curr Opin Food Sci*. 2016;8:110-119. doi:10.1016/J.COFS.2016.04.002
277. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *EMIS 2010: The European Men-Who-Have-Sex-With-Men Internet Survey*; 2010.
278. Gallian P, Barlet³ V, Mouna⁴ L, et al. Blood donation screening for hepatitis A virus. Published online 2015:1. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.21.1800237
279. Marosevic D, Belting A, Schönberger K, Carl A, Wenzel JJ, Brey R. Hepatitis A Outbreak in the General Population due to a MSM-Associated HAV Genotype Linked to a Food Handler, November 2017-February 2018, Germany. *Food Environ Virol*. 2019;11(2). doi:10.1007/S12560-019-09375-3
280. Chen GJ, Lin KY, Sun HY, et al. Incidence of acute hepatitis A among HIV-positive patients during an outbreak among MSM in Taiwan: Impact of HAV vaccination. *Liver International*. 2018;38(4):594-601. doi:10.1111/liv.13468
281. Latash J, Dorsinville M, Del Rosso P, et al. Notes from the Field: Increase in Reported Hepatitis A Infections Among Men Who Have Sex with Men — New York City, January–August 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;66(37):999-1000. doi:10.15585/MMWR.MM6637A7
282. Gozlan Y, Bar-Or I, Rakovsky A, et al. Ongoing hepatitis A among men who have sex with men (MSM) linked to outbreaks in Europe in Tel Aviv area, Israel, December 2016 – June 2017. *Eurosurveillance*. 2017;22(29):30575. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.29.30575
283. Rivas V, Barrera A, Pino K, et al. Hepatitis A outbreak since November 2016 affecting men who have sex with men (MSM) in Chile connected to the current outbreak in MSM in Europe, situation up to October 2017. *Eurosurveillance*. 2018;23(9). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.18-00060
284. Mariojoules J, Castro G, Pisano MB, et al. Hepatitis A outbreak affecting men who have sex with men (MSM) in central Argentina, occurred in July 2017–April 2018, later than the European outbreak. *Journal of Clinical Virology*. 2019;117:49-53. doi:10.1016/J.JCV.2019.05.014
285. Manor Y, Lewis M, Ram D, et al. Evidence for Hepatitis A Virus Endemic Circulation in Israel Despite Universal Toddler Vaccination Since 1999 and Low Clinical Incidence in All Age Groups. *J Infect Dis*. 2017;215(4):574-580. doi:10.1093/INFDIS/JIW611
286. Ramachandran S, Xia GL, Dimitrova Z, et al. Changing Molecular Epidemiology of Hepatitis A Virus Infection, United States, 1996-2019. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(6):1742-1745. doi:10.3201/EID2706.203036
287. Corpuz MVA, Buonerba A, Vigliotta G, et al. Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Science of The Total Environment*. 2020;745:140910. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.140910

288. Buonerba A, Corpuz MVA, Ballesteros F, et al. Coronavirus in water media: Analysis, fate, disinfection and epidemiological applications. *J Hazard Mater.* 2021;415:125580. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2021.125580
289. Rachida S, Taylor MB. Potentially Infectious Novel Hepatitis A Virus Strains Detected in Selected Treated Wastewater Discharge Sources, South Africa. *Viruses.* 2020;12(12). doi:10.3390/V12121468
290. La Rosa G, Della Libera S, Iaconelli M, et al. Surveillance of hepatitis A virus in urban sewages and comparison with cases notified in the course of an outbreak, Italy 2013. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1). doi:10.1186/1471-2334-14-419
291. Ouardani I, Turki S, Aouni M, Romalde JL. Detection and Molecular Characterization of Hepatitis A Virus from Tunisian Wastewater Treatment Plants with Different Secondary Treatments. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(13):3834. doi:10.1128/AEM.00619-16
292. Fantilli A, Cola G Di, Castro G, et al. Hepatitis A virus monitoring in wastewater: A complementary tool to clinical surveillance. *Water Res.* 2023;241:120102. doi:10.1016/J.WATRES.2023.120102
293. Bisseux M, Colombet J, Mirand A, et al. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Eurosurveillance.* 2018;23(7). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.7.17-00237
294. Rodriguez-Manzano J, Miagostovich M, Hundesa A, et al. Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in Eastern Spain by testing urban sewage samples. *J Water Health.* 2010;8(2):346-354. doi:10.2166/WH.2009.042
295. Pina S, Buti M, Jardí R, Clemente-Casares P, Jofre J, Girones R. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology.* 2001;82(12):2955-2963. doi:10.1099/0022-1317-82-12-2955/CITE/REFWORKS
296. Buonerba A, Corpuz MVA, Ballesteros F, et al. Coronavirus in water media: Analysis, fate, disinfection and epidemiological applications. *J Hazard Mater.* 2021;415. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2021.125580
297. Corpuz MVA, Buonerba A, Vigliotta G, et al. Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Sci Total Environ.* 2020;745. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.140910
298. Ouardani I, Turki S, Aouni M, Romalde JL. Detection and Molecular Characterization of Hepatitis A Virus from Tunisian Wastewater Treatment Plants with Different Secondary Treatments. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(13):3834. doi:10.1128/AEM.00619-16
299. Brooks HA, Gersberg RM, Dhar AK. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2005;127(2):109-118. doi:10.1016/J.JVIROMET.2005.03.017
300. Chigor VN, Okoh AI. Quantitative RT-PCR Detection of Hepatitis A Virus, Rotaviruses and Enteroviruses in the Buffalo River and Source Water Dams in the Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Environ Res Public Health.* 2012;9(11):4017. doi:10.3390/IJERPH9114017
301. Tiwari A, Phan N, Tandukar S, et al. Persistence and occurrence of SARS-CoV-2 in water and wastewater environments: a review of the current literature. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2022;29(57):85658. doi:10.1007/S11356-021-16919-3
302. van Herck K, Jacquet JM, van Damme P. Antibody persistence and immune memory in healthy adults following vaccination with a two-dose inactivated hepatitis A vaccine: Long-term follow-up at 15 years. *J Med Virol.* 2011;83(11):1885-1891. doi:10.1002/JMV.22200



303. Bian GL, Ma R, Dong HJ, et al. Long-term clinical observation of the immunogenicity of inactivated hepatitis A vaccine in children. *Vaccine*. 2010;28(30):4798-4801. doi:10.1016/J.VACCINE.2010.04.096
304. Bovier PA, Bock J, Ebengo TF, et al. Predicted 30-year protection after vaccination with an aluminum-free virosomal hepatitis A vaccine. *J Med Virol*. 2010;82(10):1629-1634. doi:10.1002/JMV.21883
305. Victor JC, Monto AS, Surdina TY, et al. Hepatitis A Vaccine versus Immune Globulin for Postexposure Prophylaxis. *N Engl J Med*. 2007;18:1685-1694. doi:10.1056/NEJMoa070546
306. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: Prevention of Hepatitis A After Exposure to Hepatitis A Virus and in International Travelers. Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2007;56(41):1080-1084.
307. Wang XY, Xu ZY, Ma JC, et al. Long-term immunogenicity after single and booster dose of a live attenuated hepatitis A vaccine: results from 8-year follow-up. *Vaccine*. 2007;25(3):446-449. doi:10.1016/J.VACCINE.2006.08.004
308. Mao JS, Chai SA, Xie RY, et al. Further evaluation of the safety and protective efficacy of live attenuated hepatitis A vaccine (H2-strain) in humans. *Vaccine*. 1997;15(9):944-947. doi:10.1016/S0264-410X(96)00304-0
309. Zao YL, Meng ZD, Xu ZY, et al. H2 strain attenuated live hepatitis A vaccines: Protective efficacy in a hepatitis A outbreak. *World J Gastroenterol*. 2000;6(6):829. doi:10.3748/WJG.V6.I6.829
310. Shouval D. *The Immunological Basis for Immunization Series: Module 18: Hepatitis A.*; 2011.
311. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Prevention of Hepatitis A Through Active or Passive Immunization: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. December 1996:1-30.
312. Wasley A, Fiore A, Bell BP. Hepatitis A in the Era of Vaccination. doi:10.1093/epirev/mxj012
313. Dagan R, Leventhal A, Anis E, Slater P, Ashur Y, Shouval D. Incidence of hepatitis A in Israel following universal immunization of toddlers. *JAMA*. 2005;294(2):202-210. doi:10.1001/JAMA.294.2.202
314. Domínguez Á, Salleras L, Carmona G, Batalla J. Effectiveness of a mass hepatitis A vaccination program in preadolescents. *Vaccine*. 2003;21(7-8):698-701. doi:10.1016/S0264-410X(02)00583-2
315. Zhuang GH, Pan XJ, Wang XL. A cost-effectiveness analysis of universal childhood hepatitis A vaccination in China. *Vaccine*. 2008;26(35):4608-4616. doi:10.1016/J.VACCINE.2008.05.086
316. Andani A, van Damme P, Bunge EM, Salgado F, van Hoorn RC, Hoet B. One or two doses of hepatitis A vaccine in universal vaccination programs in children in 2020: A systematic review. *Vaccine*. 2022;40(2):196-205. doi:10.1016/J.VACCINE.2021.01.038
317. Levine H, Kopel E, Anis E, Givon-Lavi N, Dagan R. The impact of a national routine immunisation programme initiated in 1999 on Hepatitis A incidence in Israel, 1993 to 2012. *Euro Surveill*. 2015;20(7). doi:10.2807/1560-7917.ES2015.20.7.21040
318. Villena R, Paul Wilhelm J, Calvo X, et al. Opinión del comité consultivo de inmunizaciones de la sociedad Chilena de infectología en relación a los brotes de hepatitis A en Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 2017;34(4):371-373. doi:10.4067/S0716-10182017000400371



319. Valenzuela MT, Jacobs RJ, Arteaga O, Navarrete MS, Meyerhoff AS, Innis BL. Cost-effectiveness of universal childhood hepatitis A vaccination in Chile. *Vaccine*. 2005;23(32):4110-4119. doi:10.1016/J.VACCINE.2005.03.021
320. Espul C, Benedetti L, Linares M, et al. Seven-year follow-up of the immune response after one or 2 doses of inactivated hepatitis A vaccine given at 1 year of age in the Mendoza Province of Argentina. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(11):2707-2712. doi:10.1080/21645515.2017.1358326
321. Urueña A, González JE, Rearte A, et al. Single-dose universal hepatitis A immunization in one-year-old children in Argentina: High prevalence of protective antibodies up to 9 years after vaccination. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2016;35(12):1339-1342. doi:10.1097/INF.0000000000001322
322. Kernéis S, Desaint C, Brichtler S, et al. Long-term persistence of humoral immunity after hepatitis A vaccination in HIV-infected adults. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;57(3). doi:10.1097/QAI.0B013E31821FDEC3
323. Gozlan Y, Bar-Or I, Volnowitz H, et al. Lessons from intensified surveillance of viral hepatitis A, Israel, 2017 and 2018. *Eurosurveillance*. 2021;26(6). doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.6.2000001
324. Association of Public Health Laboratories. Hepatitis A Virus Testing and Resources. Published 2021. https://www.aphl.org/programs/infectious_disease/Pages/Viral-Hepatitis.aspx
325. Suk JE, Van Cangh T, Beauté J, et al. The interconnected and cross-border nature of risks posed by infectious diseases. *Glob Health Action*. 2014;7(1). doi:10.3402/GHA.V7.25287
326. Enkirch T, Eriksson R, Persson S, et al. Hepatitis A outbreak linked to imported frozen strawberries by sequencing, Sweden and Austria, June to September 2018. *Euro Surveill*. 2018;23(41). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.41.1800528
327. Ruscher C, Faber M, Werber D, et al. Resurgence of an international hepatitis A outbreak linked to imported frozen strawberries, Germany, 2018 to 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(37):1. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.37.1900670
328. Vilaplana TG, Leeman D, Balogun K, et al. Hepatitis A outbreak associated with consumption of dates, England and Wales, January 2021 to April 2021. *Euro Surveill*. 2021;26(20). doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.20.2100432
329. Wang H, Zheng H, Cao J, et al. Genetic Diversity of Hepatitis A Virus in China: VP3-VP1-2A Genes and Evidence of Quasispecies Distribution in the Isolates. *PLoS One*. 2013;8(9):74752. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0074752
330. Método para la detección de genomas en cuasiespecies virales mediante microchips de ADN. Organización Mundial de la Propiedad Intelectual.
331. Crance JM, Lévêque F, Chousterman S, Jouan A, Trépo C, Deloince R. Antiviral activity of recombinant interferon- α on hepatitis A virus replication in human liver cells. *Antiviral Res*. 1995;28(1):69-80. doi:10.1016/0166-3542(95)00039-O
332. Berthillon P, Crance JM, Leveque F, et al. Inhibition of the expression of hepatitis A and B viruses (HAV and HBV) proteins by interferon in a human hepatocarcinoma cell line (PLC/PRF/5). *J Hepatol*. 1996;25(1):15-19. doi:10.1016/S0168-8278(96)80322-9
333. Yoshiba M, Inoue K, Sekiyama K. Interferon for hepatitis A. *Lancet*. 1994;343(8892):288-289. doi:10.1016/S0140-6736(94)91132-0
334. Kanda T, Wu S, Kiyohara T, et al. Interleukin-29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunol*. 2012;25(5):379-386. doi:10.1089/VIM.2012.0021
335. Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Okitsu K, Fujiwara K, Yokosuka O. Internal ribosomal entry-site activities of clinical isolate-derived hepatitis A virus and



- inhibitory effects of amantadine. *Hepatology Research*. 2010;40(4):415-423. doi:10.1111/J.1872-034X.2010.00617.X
336. Jiang W, Muhammad F, Ma P, Liu X, Long G. Sofosbuvir inhibits hepatitis A virus replication in vitro assessed by a cell-based fluorescent reporter system. *Antiviral Res*. 2018;154:51-57. doi:10.1016/J.ANTIVIRAL.2018.04.007
337. Widell A, Hansson BG, Öberg B, Nordenfelt E. Influence of twenty potentially antiviral substances on in vitro multiplication of hepatitis a virus. *Antiviral Res*. 1986;6(2):103-112. doi:10.1016/0166-3542(86)90030-6
338. Chaudhary RK, Andonov AP. Effect of ribavirin on hepatitis A virus replication in vitro. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*. 1992;3(2):67. doi:10.1155/1992/531837
339. Blaum BS, Wünsche W, Benie AJ, et al. Functional binding of hexanucleotides to 3C protease of hepatitis A virus. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(7):3042. doi:10.1093/NAR/GKR1152
340. Lall MS, Ramtohl YK, James MNG, Vederas JC. Serine and threonine beta-lactones: a new class of hepatitis A virus 3C cysteine proteinase inhibitors. *J Org Chem*. 2002;67(5):1536-1547. doi:10.1021/JO0109016
341. Morris TS, Frommann S, Shechosky S, et al. In vitro and ex vivo inhibition of hepatitis A virus 3C proteinase by a peptidyl monofluoromethyl ketone. *Bioorg Med Chem*. 1997;5(5):797-807. doi:10.1016/S0968-0896(97)88649-X
342. Konduru K, Kaplan GG. Determinants in 3Dpol Modulate the Rate of Growth of Hepatitis A Virus. *J Virol*. 2010;84(16):8342. doi:10.1128/JVI.01470-09
343. Kanda T, Sasaki R, Masuzaki R, Matsumoto N, Ogawa M, Moriyama M. Cell Culture Systems and Drug Targets for Hepatitis A Virus Infection. *Viruses*. 2020;12(5). doi:10.3390/V12050533



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

10. ANEXOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ANEXO 1. MATERIAL COMPLEMENTARIO AL TEXTO

Anexo A1.1. Relación de centros de Atención Primaria asociados al HUVV.

Alhaurín El Grande

Alhaurín de la Torre

Álora

Carihuela

Cártama Estación

Churriana

Cruz del Humilladero

Delicias

El Cónsul

Huelin

La Luz

Portada Alta

San Andrés - Torcal

Teatinos

Tiro Pichón

Torremolinos

ANEXO A1.2. Aprobación del Comité de ética.



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Comité de Ética de la Investigación Provincial de Málaga

Dra. Dña. Gloria Luque Fernández, Secretaria del CEI Provincial de Málaga

CERTIFICA:

Que en la sesión de CEI de fecha: 28/07/2022 ha evaluado el proyecto de Investigación: "Caracterización epidemiológica y molecular del virus de la hepatitis A".

Este Comité lo considera ética y metodológicamente correcto.

La composición del CEI en esta sesión es la siguiente:

- D^o. Ana Díaz Ruiz (Licenciada en Derecho)
- Dra. Marta Blasco Alonso (Obst. y Ginecología)
- Dr. José Leiva Fernández (Médico Familia)
- Dra. M^a Dolores López Carmona (Medicina Interna)
- D^o. Inmaculada Doña Díaz (Alergología)
- Dra. Gloria Luque Fernández (Investigación)
- Dr. Juan Carlos Navarro Barrios (Psiquiatría, Centro de Salud El
- Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga (Laboratorio)
- Dña. Carmen López Gálvez del Postigo (Miembro Lego)
- Dra. Encarnación Blanco Reina (Farmacología Clínica)
- Dr. Jesús López del Peral (Esp.Protec.Datos)
- Dra. Elena Sánchez Yáñez
- Dra. M^a Carmen Vela Márquez (Farmacéutica Distrito)
- Dr. Andrés Fontalba Navas (UGC Salud Mental)

Málaga, a 2 de agosto de 2022

Fdo.: Dra. Gloria Luque Fernández
Secretaria del CEI

ANEXO A1.3. Resultados del análisis genotípico realizado con HAV Genotyping tool 1.0.

name	begin	length	end	BLAST	BLAST score	refseq	reverse complement	type	type support	subtype	subtype support
20_HAV_Malaga	2923	509	3433	Hepatitis A virus	97.81746	NC_001489	false	IA	100.0	IA_ac	100.0
4_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	94.047615	NC_001489	false	IA	100.0	IA_ac	100.0
26_HAV_Malaga	2923	511	3433	Hepatitis A virus	91.30435	NC_001489	false	IA	100.0	IA_ad	93.0
27_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	90.51383	NC_001489	false	IA	95.0	Could not assign	
22_HAV_Malaga	2922	510	3433	Hepatitis A virus	94.70588	NC_001489	false	IA	97.0	Could not assign	
14_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	94.83102	NC_001489	false	IA	94.0	IA_ab	100.0
15_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	94.0	IA_ab	100.0
2_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	95.0	IA_ab	100.0
24_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	97.0	IA_ab	100.0
23_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	98.0	IA_ab	100.0
11_HAV_Malaga	2923	368	3291	Hepatitis A virus	95.027626	NC_001489	false	IA	95.0	IA_ab	97.0
13_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.62698	NC_001489	false	IA	99.0	IA_ab	100.0
6_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	97.0	IA_ab	100.0
10_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	98.0	IA_ab	100.0
8_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	94.0	IA_ab	99.0
21_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	98.0	IA_ab	100.0
7_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	96.0	IA_ab	100.0
1_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	97.0	IA_ab	100.0
3_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	97.0	IA_ab	100.0
16_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.82539	NC_001489	false	IA	97.0	IA_ab	100.0
18_HAV_Malaga	2923	510	3433	Hepatitis A virus	96.62698	NC_001489	false	IA	97.0	IA_ab	100.0
17_HAV_Malaga	2923	511	3433	Hepatitis A virus	90.29703	NC_001489	false	Unassigned			
12_HAV_Malaga	2923	292	3215	Hepatitis A virus	96.969696	NC_001489	false	Unassigned			
9_HAV_Malaga	2923	217	3140	Hepatitis A virus	96.74796	NC_001489	false	IA	71.0	Could not assign	
5_HAV_Malaga	2923	274	3197	Hepatitis A virus	95.93023	NC_001489	false	Unassigned			

ANEXO A1.4. Resultados obtenidos de FindModel. Ajustes de máxima probabilidad de 24 modelos diferentes de sustitución de nucleótidos.

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
T92+G	84	7656.128	6991.395	-3411.346	n/a	0.86	2.01	0.305	0.305	0.195	0.195	0.049	0.031	0.132	0.049	0.132	0.031	0.049	0.207	0.031	0.207	0.049	0.031
HKY+G	86	7662.243	6981.700	-3404.481	n/a	0.85	2.04	0.310	0.301	0.144	0.246	0.048	0.023	0.167	0.050	0.098	0.040	0.050	0.204	0.040	0.210	0.048	0.023
TN93+G	87	7664.731	6976.283	-3400.764	n/a	0.86	2.03	0.310	0.301	0.144	0.246	0.048	0.023	0.140	0.049	0.119	0.039	0.049	0.249	0.039	0.176	0.048	0.023
T92+G+I	85	7666.050	6993.412	-3411.346	0.00	0.86	2.01	0.305	0.305	0.195	0.195	0.049	0.031	0.132	0.049	0.132	0.031	0.049	0.207	0.031	0.207	0.049	0.031
HKY+G+I	87	7672.165	6983.718	-3404.481	0.00	0.85	2.04	0.310	0.301	0.144	0.246	0.048	0.023	0.167	0.050	0.098	0.040	0.050	0.204	0.040	0.210	0.048	0.023
TN93+G+I	88	7674.652	6978.300	-3400.764	0.00	0.86	2.03	0.310	0.301	0.144	0.246	0.048	0.023	0.140	0.049	0.119	0.039	0.049	0.249	0.039	0.176	0.048	0.023
GTR+G	90	7689.992	6977.831	-3398.512	n/a	0.86	2.03	0.310	0.301	0.144	0.246	0.058	0.022	0.141	0.060	0.120	0.031	0.048	0.250	0.035	0.177	0.038	0.020
T92+I	84	7692.042	7027.309	-3429.303	0.33	n/a	1.92	0.305	0.305	0.195	0.195	0.051	0.032	0.130	0.051	0.130	0.032	0.051	0.204	0.032	0.204	0.051	0.032
GTR+G+I	91	7699.914	6979.849	-3398.512	0.00	0.86	2.03	0.310	0.301	0.144	0.246	0.058	0.022	0.141	0.060	0.120	0.031	0.048	0.250	0.035	0.177	0.038	0.020
HKY+I	86	7700.369	7019.827	-3423.544	0.33	n/a	1.94	0.310	0.301	0.144	0.246	0.050	0.024	0.164	0.052	0.096	0.041	0.052	0.200	0.041	0.206	0.050	0.024
TN93+I	87	7703.419	7014.972	-3420.108	0.33	n/a	1.92	0.310	0.301	0.144	0.246	0.049	0.024	0.141	0.051	0.114	0.040	0.051	0.238	0.040	0.178	0.049	0.024
K2+G	83	7703.826	7046.998	-3440.155	n/a	0.90	1.94	0.250	0.250	0.250	0.250	0.042	0.042	0.165	0.042	0.165	0.042	0.042	0.165	0.042	0.165	0.042	0.042
K2+G+I	84	7713.748	7049.015	-3440.155	0.00	0.90	1.94	0.250	0.250	0.250	0.250	0.042	0.042	0.165	0.042	0.165	0.042	0.042	0.165	0.042	0.165	0.042	0.042
GTR+I	90	7728.505	7016.345	-3417.769	0.33	n/a	1.92	0.310	0.301	0.144	0.246	0.061	0.021	0.142	0.063	0.115	0.035	0.046	0.240	0.034	0.179	0.042	0.020
K2+I	83	7735.971	7079.143	-3456.228	0.33	n/a	1.88	0.250	0.250	0.250	0.250	0.043	0.043	0.163	0.043	0.163	0.043	0.043	0.163	0.043	0.163	0.043	0.043
T92	83	7769.772	7112.944	-3473.128	n/a	n/a	1.82	0.305	0.305	0.195	0.195	0.052	0.034	0.128	0.052	0.128	0.034	0.052	0.200	0.034	0.200	0.052	0.034
HKY	85	7778.264	7105.626	-3467.452	n/a	n/a	1.82	0.310	0.301	0.144	0.246	0.052	0.025	0.161	0.054	0.094	0.043	0.054	0.196	0.043	0.202	0.052	0.025
TN93	86	7779.430	7098.887	-3463.075	n/a	n/a	1.83	0.310	0.301	0.144	0.246	0.051	0.024	0.138	0.053	0.113	0.042	0.053	0.235	0.042	0.174	0.051	0.024
GTR	89	7804.001	7099.745	-3460.477	n/a	n/a	1.83	0.310	0.301	0.144	0.246	0.063	0.023	0.140	0.065	0.114	0.036	0.049	0.237	0.035	0.175	0.044	0.020
K2	82	7809.440	7160.517	-3497.923	n/a	n/a	1.80	0.250	0.250	0.250	0.250	0.045	0.045	0.161	0.045	0.161	0.045	0.045	0.161	0.045	0.161	0.045	0.045
JC+G	82	7910.502	7261.580	-3548.454	n/a	0.99	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+G+I	83	7920.424	7263.596	-3548.454	0.00	0.99	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+I	82	7937.670	7288.748	-3562.039	0.32	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC	81	8004.005	7362.988	-3600.167	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083

NOTE.— Models with the lowest BIC scores (Bayesian Information Criterion) are considered to describe the substitution pattern the best. For each model, AICc value (Akaike Information Criterion, corrected), Maximum Likelihood value (*lnL*), and the number of parameters (including branch lengths) are also presented [1]. Non-uniformity of evolutionary rates among sites may be modeled by using a discrete Gamma distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionarily invariable (+I). Whenever applicable, estimates of gamma shape parameter and/or the estimated fraction of invariant sites are shown. Assumed or estimated values of transition/transversion bias (*R*) are shown for each model, as well. They are followed by nucleotide frequencies (*f*) and rates of base substitutions (*r*) for each nucleotide pair. Relative values of instantaneous *r* should be considered when evaluating them. For simplicity, sum of *r* values is made equal to 1 for each model. For estimating ML values, a tree topology was automatically computed. The analysis involved 42 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. There were a total of 515 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 [2].

Abbreviations: GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

ANEXO A1.5. Pruebas con diferentes topologías

Se emplearon los siguientes comandos para probar las dos topologías surgidas a partir de las dos aproximaciones filogenéticas y abarcar las tres secuencias:

```
MrBayes > execute archivo.nex
MrBayes > constraint clustering = 20_HAV_Malaga 4_HAV_Malaga MF805872
(idéntica a RIVM- HAV16- 090)
MrBayes> constraint noclustering negative = 20_HAV_Malaga 4_HAV_Malaga
MF805872 (identical to RIVM- HAV16- 090)
```

Hipótesis 1. Topología considerando el agrupamiento de las cepas 20 y 4 HAV Malaga con la cepa original holandesa RIVM-HAV-090

Run	Arithmetic mean	Harmonic mean
1	-3441.03	-3467.47
2	-3437.91	-3470.62
TOTAL	-3438.56	-3469.97

Hipótesis 2. Topología considerando agrupamientos independientes con las cepas 20 y 4 HAV Malaga, y la cepa original holandesa RIVM-HAV-090

Run	Arithmetic mean	Harmonic mean
1	-3435.67	-3475.03
2	-3439.09	-3467.36
TOTAL	-3436.33	-3474.34

$2\log_e(B_{12}) = 2 * (-3469.97 - (-3474.34)) = 8.74$, donde B_{12} es el factor de Bayes. De acuerdo a la siguiente tabla:

$2\log_e(B_{12})$	B_{12}	Evidence against H_2
0 to 2	1 to 3	Not worth more than a bare mention
2 to 6	3 to 20	Positive
6 to 10	20 to 150	Strong
> 10	> 150	Very strong

Interpretación del factor de Bayes (B_{12}). Basado en (Kass y Raftery, 1995).

Por lo tanto, existe evidencia sólida en contra de la segunda hipótesis (en comparación con H1), es decir, contra una rama separada entre cepas locales (20 HAV Málaga y 4 HAV Málaga) y la cepa holandesa.

ANEXO 2. ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

ANEXO 2.1. Artículo publicado en Journal of Clinical Medicine (JCM).



Article

Unusual Surge of Acute Hepatitis A Cases in 2016 and 2017 in Malaga, Southern Spain: Characterization and Relationship with Other Concurrent European Outbreaks

Paula Bardón De Tena¹, Silvana Teresa Tapia Paniagua², José Alberto Vico Sevilla³, Encarnación Clavijo^{2,4}, Eduardo Martínez Manzanares² and Carmen María Gonzalez-Domenech^{2,*}

- ¹ Microbiology Unit, Hospital de Puerto Real, 11510 Cádiz, Spain; paula.bardon@hotmail.com
² Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Malaga, Avenue Louis Pasteur w/n, 29010 Malaga, Spain; stapia@uma.es (S.T.T.P.); eclavijo@uma.es (E.C.); emmanzanares@uma.es (E.M.M.)
³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain; javs0007@correo.ugr.es
⁴ Infectious Diseases and Clinical Microbiology Unit, Virgen de la Victoria Hospital, 29010 Malaga, Spain
* Correspondence: cmgodo@uma.es



Citation: Bardón De Tena, P.; Tapia Paniagua, S.T.; Vico Sevilla, J.A.; Clavijo, E.; Martínez Manzanares, E.; Gonzalez-Domenech, C.M. Unusual Surge of Acute Hepatitis A Cases in 2016 and 2017 in Malaga, Southern Spain: Characterization and Relationship with Other Concurrent European Outbreaks. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 6613. <https://doi.org/10.3390/jcm12206613>

Academic Editor: Francesco Azzaroli

Received: 5 September 2023

Revised: 3 October 2023

Accepted: 17 October 2023

Published: 19 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: We aimed to describe the Hepatitis A virus (HAV) cases that arose in Malaga (Spain) in 2016 and 2017 when the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) reported several outbreaks among men who have sex with men (MSM). Therefore, we conducted a retrospective study gathering demographic, clinical, and immunological data from the acute HAV patients attending our hospital between March 2016 and December 2017. Additionally, VP1/P2A region was amplified from serum samples, sequenced, and genotyped. We finally performed a phylogenetic analysis, including the HAV strains from the other European outbreaks. A total of 184 HAV cases were reported, with the highest number in March 2017. The cohort mostly comprised Spaniards (81.0%), males (84.8%), and MSM (72.3%), with a median age of 33.0 years (interquartile range (IQR) = 25.0–43.0). Most patients exhibited symptoms. In addition, a successful amplification and sequencing of the VP1/P2A region was performed in 25 out of 106 serum samples (23.6%). All the sequences belonged to the genotype IA, and 20 were phylogenetically related to VRD_521_2016, first described in the United Kingdom (UK). In conclusion, HAV cases emerged in Malaga in 2016 and 2017, showing an epidemic character phylogenetically related to the predominant strain first detected in the UK. Characteristics of the cohort were similar to those from the European outbreaks.

Keywords: HAV; outbreak; MSM; molecular epidemiology

1. Introduction

The Hepatitis A virus (HAV) is a non-enveloped RNA virus with a positive-sense, single-stranded genome belonging to the genus *Hepatovirus* and family *Picornaviridae* [1]. HAV infection can either be asymptomatic or show a wide assortment of clinical manifestations, ranging from mild in children to acute and severe hepatitis, most common in adults. There are rarely case reports of fulminant hepatic failure and subsequent death as a complication of acute HAV infection [2]. HAV is transmitted through different routes, mainly the fecal–oral route or by consuming contaminated food and water, but also by sexual interaction [3–5].

Vaccination, sanitation, and clean drinking water are the main public health interventions underlying the decreased rate of HAV cases worldwide [6,7]. However, the drop in the HAV incidence is paradoxical: The older the infected person, the more severe the disease, increasing the morbidity [6,8]. Outbreaks occasionally appear in places of low seroprevalence but with a high proportion of susceptible individuals, mainly due to risk groups like men who have sex with men (MSM) and travelers to endemic areas [8–11].



ORIGINAL PAPERS

Outbreak of acute hepatitis A in the health area served by the Hospital Universitario Virgen de la Victoria (HUVV): a change in epidemiology

Alejandro José García-Ferreira¹, Aida Ortega-Alonso¹, Julia Cobos-Rodríguez¹, Paula Bardón-de-Tena², Miguel Calderón-Cid³, Alberto García-García¹, M.^a Dolores García-Escaño¹, Ramiro Alcántara-Benítez¹, Encarnación Clavijo-Frutos², Miren García-Cortés¹ y Raúl J. Andrade¹

¹Digestive Diseases Clinical Management Unit. Institute of Biomedical Research in Málaga (IBIMA). Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Málaga, Spain. ²CIBER of Hepatic and Digestive Diseases (CIBERehd). Spain. ³Microbiology and Parasitology, and ⁴Preventive Medicine and Epidemiology Clinical Management Units. Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Málaga, Spain

Received: 24/08/2017 · Accepted: 05/01/2018

Correspondence: Alejandro José García Ferreira. Digestive Diseases Clinical Management Unit. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA). Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Campus de Teatinos, s/n. 29010 Málaga, Spain. e-mail: alejandrogarciaferreira89@gmail.com

ABSTRACT

In 2016, an outbreak of hepatitis A was identified in the Málaga province among patients with specific epidemiological characteristics, which were predominantly males. This is a report of 51 subjects with acute hepatitis A and a mean age of 35.7 years, 90% were male and 55% of cases were men who had had sex with other men within the last two months. Half of them required hospitalization for significant coagulopathy at diagnosis and no cases progressed to fulminant failure or encephalopathy. Four patients had ascites at the time of diagnosis. This outbreak adds to those reported in the United Kingdom and the Netherlands with a similar number of cases and epidemiology. These studies highlight the importance of epidemiological surveillance, the need for vaccination in this particular at risk population and the need for informative campaigns in order to prevent this disease.

Key words: Hepatitis A. Epidemiology. Sexually transmitted diseases. Men who have sex with men.

INTRODUCTION

Hepatitis A virus (HAV) usually induces a self-limited acute infectious illness in humans. Transmission is mainly via the fecal-oral route due to contaminated water and food, and may also occur due to person-to-person contact. Sexual transmission has been associated with epidemic outbreaks among men who have sex with men (MSM) since 1980 (1), some of these cases in Spain (2-4). However, recent reports suggest that this is related to the European hepatitis A outbreak in 2016 (5). Outbreaks have also been reported in parenteral drug users in association with infected fomites blood transfusion recipients (6). Infection is usually asymp-

tomatic or mild in children and more severe in adults. The mean incubation period is 28 days and infectiveness peaks during the second half of the incubation period when patients are still asymptomatic. Most cases are deemed as noncontagious from one week after jaundice onset. Diagnosis relies on serologic testing, and the presence of anti-HAV immunoglobulin M (IgM) or HAV-RNA are indicative of an acute infection (7). No specific therapy is available for acute infection with HAV. Stringent hygiene measures, avoidance of risky contact and vaccination of exposed individuals have proven effective to prevent new cases. Both active and passive immunization are effective when administered within two weeks after exposure (8).

Improved hygienic and healthcare conditions in Spain have contributed to a reduced fecal-oral viral transmission. During 2008-2009, a significant outbreak via water transmission was recorded in our health area. No relevant outbreaks were recorded until 2016, when cases notably increased during the last few months of the year. This situation persists as of today, as reported by the World Health Organization (9). This may result from a lower number of immunized individuals but also from increasing sexual transmission.

The goal of the study was to describe an epidemic outbreak of hepatitis A in our setting with epidemiological and clinical characteristics of cases and to assess potential changes in viral transmission mechanisms.

García-Ferreira AJ, Ortega-Alonso A, Cobos-Rodríguez J, Bardón-de-Tena P, Calderón-Cid M, García-García A, García-Escaño MD, Alcántara-Benítez R, Clavijo-Frutos E, García-Cortés M, Andrade RJ. Outbreak of acute hepatitis A in the health area served by the Hospital Universitario Virgen de la Victoria (HUVV): a change in epidemiology. Rev Esp Enferm Dig 2018;110(6):380-385.

DOI: 10.17235/reed.2018.5207/2017

AJ García Ferreira y A Ortega Alonso have equally contributed to the present manuscript.

