

**CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS E
EN CERDOS FAENADOS EN ANTIOQUIA, COLOMBIA**

JORGE EDUARDO FORERO DUARTE

DIRECTOR: BERARDO DE JESÚS RODRÍGUEZ

CO-DIRECTOR: ALBEIRO LÓPEZ HERRERA

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORIAL: FRANCISCO JAVIER DÍAZ

**DOCTORADO DE CIENCIAS ANIMALES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

2015

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por la Financiación del Proyecto

A COLCIENCIAS-COLFUTURO : por la financiación y manejo de la beca 528.

A las instituciones Universidad de Antioquia, Universidad Nacional y Universidad Pontificia Bolivariana que soportaron con su infraestructura y logística el desarrollo del proyecto.

A mi comité tutorial: Al profesor Berardo Rodríguez por su acompañamiento, al Profesor Javier Díaz por sus cuidadosos análisis y recomendaciones y Al profesor Albeiro López por mantener la coherencia y cohesión del trabajo.

A la profesora Lina Andrea Gutiérrez de la UPB por los inmensos aportes críticos al trabajo y su apoyo incondicional.

Al Instituto Nacional de Salud Carlos III de España especialmente a la doctora Ana Avellón por todo su apoyo en mi estancia en su laboratorio.

A todos los estudiantes y profesores del grupo BIOGEM de los cuales no solo recibí cariño si no soporte logístico para desarrollar el trabajo.

A mis Amigos : Jaime, Daniel , Cristian, Juan, que sirvieron como válvula de escape.

A mi amigo Albeiro López Por que siempre ha tenido la lucidez para indicarme los momentos claves que han potenciado mi carrera investigativa. Para mí es motivo de orgullo haber sido formado por el Primer Virólogo Colombiano.

Dedicatoria
A mi esposa

RESUMEN GENERAL

El virus de la Hepatitis E (HEV) es un virus RNA de cadena sencilla y sentido positivo, considerado como uno de los agentes etiológicos más importantes de hepatitis aguda en humanos. Este virus está clasificado como el único miembro de la familia *Hepeviridae*, con cuatro genotipos principales de los cuales el genotipo 3 y 4 son zoonóticos y los cerdos son el reservorio más importante. En Colombia se ha encontrado evidencia serológica de exposición al virus en humanos pero se desconoce la situación epidemiológica y las características de la infección en los cerdos comercializados en el país.

Con el ánimo de determinar las características serológicas, histopatológicas moleculares y filogenéticas de la infección por HEV en cerdos beneficiados en las principales plantas de faenado de Antioquia, entre septiembre de 2011 y mayo de 2012 se recolectaron muestras de sangre, hígado y heces de cerdos en 5 plantas de faenado de Antioquia y se evaluó la seropositividad para anticuerpos tipo IgG e IgM en suero, la detección del genoma viral en heces e hígados, la presencia de lesiones histopatológicas, la inmunolocalización del antígeno ORF3 en hígado y la relación filogenética entre secuencias parciales y la del genoma completo de los virus detectados.

Los resultados muestran que el 100% de los cerdos evaluados presentaron anticuerpos tipo IgG mientras que la seropositividad para anticuerpos IgM fue del 82.06%. La presencia del genoma viral en las muestras de heces fue del 37.5% para el ORF1, mientras que la proporción de muestras positivas en hígados fue de 37,28% para la detección ORF1 y 23,69% para el ORF2. La detección por Inmunohistoquímica mostró que el 41.41% de los tejidos de hígado fueron positivos para la inmunolocalización de la proteína viral derivada del ORF3. El análisis histológico mostró un alta frecuencia de lesiones de tipo crónico y hubo asociación estadísticamente significativa entre la presencia del genoma y las

lesiones histopatológicas encontradas finalmente, la reconstrucción filogenética de las secuencias genéticas parciales y de la secuencia completa del virus, reveló que las variantes del HEV que circulan en las producciones porcinas Antioquia pertenecen al Genotipo 3a.

Para nuestro conocimiento es la primera vez que se caracteriza la infección por HEV en cerdos colombianos, lo que contribuye en gran medida al entendimiento de la dinámica de infección del virus y constituye un punto de referencia para adoptar medidas de vigilancia y control de la infección del HEV en el país.

OVERVIEW

The Hepatitis E virus (HEV) is a single stranded RNA virus and positive sense, considered one of the most important etiologic agents of acute hepatitis in humans. This virus is classified as the only member of the family Hepeviridae with four major genotypes, which genotype 3 and 4 are zoonotic and pigs are most important reservoir. In Colombia, has been found serologic evidence of exposure to the virus in humans but the epidemiological situation and the characteristics of the infection in pigs sold in the country is unknown.

With the aim of determining the serological s, histopathological molecular phylogenetic and characteristics of HEV infection in pigs slaughtered at slaughterhouses of Antioquia, between September 2011 and May 2012 blood samples, liver and pig feces were collected over 5 slaughterhouses of Antioquia and seropositivity for IgG and IgM antibodies in serum, detection of viral genome in feces and liver, presence of histological lesions, immunolocalization ORF3 antigen in liver and phylogenetic relationship of the partial sequences and complete genome of the virus were evaluated .

The results show that 100% of pigs tested, had IgG antibodies, while IgM seropositivity was 82.06%. The presence of the viral genome in the samples of

feces was 37.5% for ORF1, while the proportion of positive livers samples for ORF1 and ORF2 was 37.28% and 23.69% respectively. In addition, detection by immunohistochemistry showed that 41.41% of liver tissues were positive for immunolocalization of viral protein derived from ORF3. Histological analysis showed a high frequency of chronic injuries and statistically significant association between the presence of viral genome and the histopathological lesions was found. Finally, the phylogenetic reconstruction of partial and complete sequences of the virus revealed that HEV variants are circulating in Antioquia swine production and belong to genotype 3a.

To our knowledge this is the first time that HEV infection in Colombian pigs is characterized, contributing greatly to the understanding of the dynamics of virus infection and is a benchmark for measures of surveillance and control of infection HEV in the country.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	3
OVERVIEW	4
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	20
2.2. ESPECÍFICOS	20
3. HIPOTESIS	21
4. MARCO TEÓRICO.....	22
4.1. GENERALIDADES.....	22
4.2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS:	23
4.3. VARIANTES GENÉTICAS (GENOTIPOS):	23
4.4. PROTEÍNAS DEL HEV:	24
4.5. CICLO DE REPLICACIÓN DEL HEV:	25
4.6. PATOGÉNESIS DE LA HEPATITIS E EN HUMANOS	27
4.6.1. Rutas de transmisión y periodo de incubación en humanos.....	27
4.6.2. Curso de la infección y respuesta Inmune en humanos.	27
4.6.3. Manifestaciones Clínicas en humanos:	30
4.6.4. Hallazgos histopatológicos de la infección en humanos.....	31
4.6.5. Epidemiología de la enfermedad.....	32
4.7 PATOGÉNESIS DEL HEPATITIS E EN CERDOS	34
4.7.1. Rutas de transmisión y Periodo de incubación.....	34
4.7.2. Curso de la infección y respuesta inmune en cerdos.	35
4.7.3. Manifestaciones Clínicas en cerdos.	36
4.7.4. Hepatitis E como zoonosis.	37
4.7.5. Hallazgos histopatológicos de la infección en cerdos.....	38

4.7.6. Genotipos y distribución de HEV en cerdos	38
4.7.7. Epidemiología de la Infección en el Cerdo.	39
5. CAPITULO 1.	53
Evidencia serológica de infección por el Virus de Hepatitis E en cerdos faenados en Antioquia, Colombia.....	53
RESUMEN	54
ABSTRACT	54
5.1 INTRODUCCIÓN	56
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	58
5.2.1. Aspectos éticos.....	58
5.2.2. Muestreo y tamaño de muestra.....	58
5.2.3. Muestras de suero.	59
5.2.4. Análisis inmunoenzimático (ELISA indirecto) para detección de anticuerpos IgG e IgM específicos contra HEV.....	59
5.2.5. Estandarización de la prueba de ELISA indirecta modificada para la detección de anticuerpos tipo IgG e IgM.....	60
5.2.6. Estimación del valor de corte para la positividad de anticuerpos tipo IgG e IgM.	61
5.2.7. Métodos estadísticos.	61
5.3. RESULTADOS	62
5.3.1. Distribución de Frecuencia de anticuerpos específicos para HEV en suero de cerdos de Antioquia.	62
5.3.2. Seropositividad para anticuerpos IgM anti-HEV según la Planta de Beneficio	63
5.3.3. Seropositividad para anticuerpos IgM anti-HEV según la región de procedencia.	63
5.4. DISCUSIÓN	65
BIBLIOGRFIA.....	69
DATOS SUPLEMENTARIOS	74

6. CAPITULO 2	77
Detección del genoma del Virus de la Hepatitis E (VHE) en muestras de heces de cerdos beneficiados en plantas de faenado de Antioquia. Colombia	77
RESUMEN	78
ABSTRACT	78
6.1. INTRODUCCION	80
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	81
6.2.1. Toma de muestras	81
6.2.2. Extracción RNA y preparación de cDNA	81
6.2.3. PCR Anidada del ORF1 HEV	82
6.2.4. Análisis estadístico.	82
6.3. RESULTADOS	83
6.3.1. Detección del HEV en Heces de cerdos en plantas de beneficio	83
6.3.2. Detección del HEV en heces de cerdos según la procedencia.....	84
6.4. DISCUSION	86
BIBLIOGRAFIA	90
7. CAPITULO 3	94
Asociación entre lesiones histopatológicas y biomarcadores serológicos y moleculares de la infección por HEV	94
RESUMEN	95
ABSTRACT	95
7.1. INTRODUCCIÓN	97
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS	99
7.2.1. Diseño del estudio.	99
7.2.2. Muestras de suero.	99
7.2.3. Muestras de Hígado.....	99

7.2.4. Extracción de RNA. Preparación del cDNA.....	100
7.2.5. PCR Anidada del ORF1 y ORF2 del HEV.....	100
7.2.6. Análisis inmunoenzimático ELISA indirecto para detección de anticuerpos IgM específicos contra HEV.....	102
7.2.7. Histopatología.....	102
7.2.8. Inmunohistoquímica:	103
7.2.9. Análisis Estadístico.	104
7.3. RESULTADOS.....	104
7.3.1. Frecuencias de Detección de IgM en Suero y del genoma ORF1/ORF2 en Hígado y del antígeno ORF3 por Inmunohistoquímica.....	104
7.3.2. Frecuencia y grado de severidad de lesiones inflamatorias hepáticas	105
7.3.3. Concordancia y asociación entre las pruebas de laboratorio.....	108
7.3.4. Distribución de frecuencias de biomarcadores de infección en cerdos en las plantas de Beneficio.	108
7.3.5. Análisis de asociación entre la inflamación hepática con la detección del Genoma y la detección de antígeno ORF3.	110
7.3.6. Análisis de asociación entre la severidad de las lesiones con la detección del Genoma y la detección de antígeno ORF3.	111
7.4. DISCUSIÓN	111
BIBLIOGRAFIA	117
8. CAPITULO 4.....	122
Detección y caracterización molecular del Virus de la Hepatitis E en cerdos en edad de beneficio en Antioquia Colombia	122
RESUMEN	123
ABSTRACT	123
8.1. INTRODUCCIÓN	125
8.2. MATERIALES Y MÉTODOS	127
8.2.1. Cerdos y muestras.....	127

8.2.2. Extracción del RNA y PCR anidada.	128
8.2.3. Secuenciación y análisis filogenético	129
8.3. RESULTADOS.....	130
8.3.1. Detección del HEV ORF1. ORF2 y ORF2.1	130
8.3.2. Secuencia y análisis filogenético of HEV ORF1	131
8.3.3. Secuencias y análisis filogenético del HEV ORF2.....	134
8.3.4. Secuencias y análisis filogenético of HEV ORF2.1	137
8.4. DISCUSIÓN	141
BIBLIOGRAFIA	145
DATOS SUPLEMENTARIOS	149
9. CAPITULO 5	155
El análisis de las secuencias del genoma completo de cepas de virus de la hepatitis E (HEV) encontradas en cerdos en Antioquia, Colombia	155
RESUMEN	156
ABSTRACT	156
9.1. INTRODUCCIÓN	158
9.2. MATERIALES Y MÉTODOS	160
9.2.1. Muestras de heces.....	160
9.2.2. Extracción RNA y preparación de cDNA.	160
9.2.3. Diseño de los cebadores para la amplificación por bloques del genoma.....	161
9.2.5. Análisis filogenético	163
9.3. RESULTADOS.....	164
9.3.1. Verificación de la amplificación de las muestras en cada uno de los bloques... 164	
9.3.2. Ensamblaje de las bloques para determinación de las regiones codificantes del virus.....	165
9.3.3. Caracterización genética de la secuencia de los asilados colombianos.....	166

9.3.4. Análisis filogenético de las secuencias de las cepas colombianas	168
9.3.5. Polimorfismos en las secuencias de aminoácidos de las cepas colombianas...	170
9.4. DISCUSION	172
BIBLIOGRAFIA	176
DATOS SUPLEMENTARIOS	179
10. DISCUSION GENERAL	181

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Esquema del ciclo de replicación del HEV	26
Figura 4.2. Curso de la infección del HEV en Humanos.	28
Figura 4.3. Curso de infección del HEV.	36
Figura 5.1. Distribución de frecuencias de las DO ₄₅₀ para la detección de anticuerpos en cerdos muestreados.	62
Figura 5.2. Seroprevalencia para IgM en cerdos en edad de beneficio en Antioquia (Colombia).....	64
Figura DS5. 1.Control de la Variación de los valores de DO ₄₅₀ de Control Porcino Positivo (CPP).	76
Figura 6.1. Porcentaje de positividad de para la detección del genoma del HEV en heces según plantas de beneficio.	83
Figura 6.2. Porcentaje de positividad de para la detección del genoma del HEV en heces de cerdo según la región de procedencia.	85
Figura 7.1. Microfotografías de la marcación Inmunohistoquímica en hígados de cerdos para la detección del ORF3.	105
Figura 7.2. Microfotografías de los hígados de cerdo muestreados en las plantas de beneficio teñidas con H&E.	107
Figura 8.1. Representación esquemática de la ubicación de los segmentos del ORF1 y ORF2 del HEV amplificados.	129
Figura 8.2. Árbol filogenético para el ORF1.	133
Figura 8.3. Árbol filogenético para el ORF2.	136
Figura 8.4. Árbol filogenético para el ORF2.1	140
Figura DS8.1.Relación filogenética entre las secuencias colombianas para el ORF1.....	150
Figura DS8.2. Relación filogenética entre las secuencias colombianas para el ORF2.....	152
Figura DS8 3. Relación filogenética entre las secuencias colombianas para el ORF2.1.....	154

Figura 9.1. Representación Esquemática de los bloques de amplificación del HEV.	162
Figura 9.2. Ensamblaje del genoma completo para las secuencias obtenidas ...	166
Figura 9.3. Representación esquemática de los dominios conservados en la cepa SD718_SS_NE1.....	167
Figura 9.4. Resultado del análisis filogenético de genomas completos de VHE.	169
Figura 9.5. Polimorfismos en las secuencias de aminoácidos de las cepas colombianas.	171

LISTA DE TABLAS

Tabla 5. 1. Seropositividad para anticuerpos IgM anti-HEV según la Planta de Beneficio.....	63
Tabla 5. 2. Seropositividad para anticuerpos IgM anti-HEV según la región de procedencia.....	64
Tabla DS5.1. Repetividad de los ensayos de ELISA indirecta con conjugado anti-IgG Cerdo y anti-IgM Cerdo	74
Tabla 7. 1. Frecuencias de los biomarcadores de infección en los cerdos muestreados en las plantas de beneficio.	104
Tabla 7. 2. Frecuencia de tipos de inflamación hepática y grado de las lesiones en los cerdos en edad de beneficio en Antioquia.....	106
Tabla 7. 3. Comparación entre los biomarcadores de infección por el HEV y concordancia entre las pruebas de infección.	108
Tabla 7. 4. Distribución de biomarcadores de infección en los cerdos estudiados.	109
Tabla 7. 5. Análisis de asociación entre la inflamación hepática con la detección del Genoma por nRT-PCR y la detección de antígeno ORF3 por IHQ.	110
Tabla 7. 6. Análisis de asociación entre el grado de severidad de las lesiones con la detección del Genoma por nRT-PCR y la detección de antígeno ORF3 por IHQ	111
Tabla 8. 1. Secuencias de los cebadores usados para la detección del genoma del HEV.....	128
Tabla 8 2. Número de secuencias obtenidas en el estudio.	131
Tabla DS8 1. Secuencias del ORF1 obtenidas en el estudio con sus haplotipos representativos.....	149
Tabla DS8. 2. Secuencias del ORF2 obtenidas en el estudio con sus haplotipos representativos.....	151
Tabla DS8 3 Secuencias del ORF2.1 obtenidas en el estudio con sus haplotipos representativos.....	153

Tabla 9 1. Cebadores empleados para la amplificación del genoma completo del HEV	161
Tabla 9 2 Verificación de la amplificación de las muestras para cada uno de los bloques.....	164
Tabla DS 9 1. Marcadores Serológicos, moleculares e histológicos de los cerdos de donde se obtuvieron las muestras para secuenciación completa	179
Tabla DS 9 2. Porcentajes de identidad entre las cepas colombianas y las cepas del genotipo 3a.....	180

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Existen cinco tipos de virus que provocan hepatitis en humanos de los cuales el HEV es uno de los más importantes pues causa Hepatitis aguda de transmisión entérica en zonas endémicas y no endémicas. En el 1 al 4% de los casos de infección puede llevar a falla hepática fulminante, pero puede alcanzar el 20% en mujeres embarazadas. Junto a lo anterior el creciente número de reportes sobre hepatitis crónica asociada a la infección por HEV en pacientes inmunocomprometidos subrayan la importancia de este virus en la salud pública mundial (Aggarwal, 2013; Kmush *et al.*, 2013; Krain *et al.*, 2014; Teshale & Hu, 2011).

Se reconoce un solo serotipo de HEV y cuatro genotipos principales (numerados del 1 al 4). Los genotipos 1 y 2 infectan principalmente a humanos por transmisión fecal-oral, y predominan en las regiones endémicas, mientras que los genotipos 3 y 4 pueden infectar humanos y diferentes especies animales principalmente cerdos, por lo cual son considerados zoonóticos y aunque se han detectado estos genotipos en zonas no endémicas también circulan en zonas de alta endemicidad (Aggarwal, 2013; Meng, 2013).

Se estima que para el 2005 en África y Asia los genotipos 1 y 2 infectaron 20.1 millones de personas de las cuales 3.4 millones fueron asintomáticas, y que produjo cerca de 70.000 muertes en esa población, además de 3000 muertes de neonatos (Rein *et al.*, 2012). Aunque no existen datos certeros sobre el número de afectados exclusivamente por los genotipos zoonóticos en el mundo, es claro que el genotipo 3 se ha podido detectar en países de los cinco continentes mientras que el genotipo 4 frecuente en Asia, se ha detectado en pocos países de Europa (Francia Grecia y Bélgica) y África (Sudáfrica), pero no se ha reportado su presencia en países de América ni Oceanía (Kmush *et al.*, 2013; Rein *et al.*, 2012)

En Colombia, se ha detectado la presencia del virus en el 8.7% de pacientes con diagnóstico de hepatitis viral provenientes de nueve regiones diferentes del país (Peláez *et al.*, 2014). Particularmente en Antioquia, la región de mayor producción y consumo de carne de cerdo del país, dos estudios independientes revelaron que la presencia de anticuerpos IgG en trabajadores manipuladores de cerdos oscila entre 11,22% (Betacur *et al.*, 2013) y 15.7% (Gutiérrez *et al.*, 2015). Mientras que en población general se encontró una seroprevalencia 7.2% (Gutiérrez *et al.*, 2015).

La crianza de cerdos en Colombia constituye un renglón importante en la economía agropecuaria, principalmente en Antioquia, por lo cual en los últimos años los productores de cerdos han hecho un gran esfuerzo por mejorar la producción porcina elevando los estándares sanitarios en la producción, estándares que se podrían afectar por la falta de control derivada del desconocimiento de la presencia de virus zoonóticos como el HEV.

En Colombia existen reportes sobre la frecuencia de anticuerpos contra el HEV en humanos, pero en cerdos se desconoce su prevalencia, los genotipos que circulan, así como las relaciones filogenéticas que puedan existir entre ellos o con los descritos en otros países, ni cuál es su capacidad de causar daño en los cerdos que se producen en el país. Con el propósito de aportar al conocimiento de la dinámica de infección en los cerdos del país, el objetivo de este trabajo de investigación fue el de determinar las características serológicas, histológicas y filogenéticas de la infección por el Virus de la Hepatitis E (HEV) en cerdos faenados en las principales plantas de beneficio de Antioquia.

En este reporte, inicialmente se hace una revisión de la enfermedad en humanos para resaltar su importancia en la salud pública haciendo un paralelo con los datos más relevantes de la dinámica de infección en los cerdos. Luego, se reportan los datos obtenidos sobre la seropositividad de anticuerpos tipo IgM e IgG en suero, la excreción del virus en heces y la presencia del virus en hígados de cerdos en

edad de beneficio obtenidos en las cinco plantas de faenado porcino con mayor volumen en Antioquia en el periodo comprendido entre junio de 2011 y febrero de 2012.

Además se presenta el análisis histopatológico de las lesiones encontradas en tejido hepático y su asociación con la detección por inmunohistoquímica del antígeno ORF3 en los cerdos evaluados. Finalmente se hace el análisis filogenético de las variantes encontradas y la caracterización molecular de las regiones codificantes de una secuencia HEV obtenidas en los cerdos del estudio.

BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal, R. (2013).** Hepatitis E: Epidemiology and Natural History. *J Clin Exp Hepatol* **3**, 125–133.
- Betacur, C. a, M, M. & Portillo, S. (2013).** Seroprevalence of hepatitis E in swine farms workers in Aburra Valley 2011-2012. *Acta Médica Colomb* **38**, 68–70.
- Gutiérrez, C., Rodríguez, B., Suescún, J. P., Londoño, G. C., López, L. L., Herrera, A. L. & Builes, L. G. (2015).** Determinación de anticuerpos totales (IgG/IgM) e IgM específicos para el virus de la hepatitis E y detección molecular del virus en humanos con y sin exposición ocupacional a porcinos en 10 municipios de Antioquia. *Iatreia* **28**, 218–225.
- Kmush, B., Wierzba, T., Krain, L., Nelson, K. & Labrique, A. B. (2013).** Epidemiology of hepatitis e in low- and middle-income countries of Asia and Africa. *Semin Liver Dis* **33**, 15–29.
- Krain, L. J., Nelson, K. E. & Labrique, A. B. (2014).** Host immune status and response to hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev* **27**, 139–65.
- Meng, X.-J. (2013).** Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* **33**, 41–49.
- Peláez, D., Hoyos, M. C., Rendón, J. C., Mantilla, C., Ospina, M. C., Cortés-Mancera, F., Pérez, O. L., Contreras, Lady, Estepa, Y. & other authors. (2014).** Hepatitis E virus infection in patients with clinical diagnosis of viral hepatitis in Colombia. *Biomédica* **34**, 354–365.
- Rein, D. B., Stevens, G. a., Theaker, J., Wittenborn, J. S. & Wiersma, S. T. (2012).** The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology* **55**, 988–997.
- Teshale, E. H. & Hu, D. J. (2011).** Hepatitis E: Epidemiology and prevention. *World J Hepatol* **3**, 285–291.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar las características serológicas, histopatológicas moleculares, y filogenéticas de la infección del Virus de la Hepatitis E (HEV) en cerdos faenados en las principales plantas de beneficio de Antioquia

2.2. ESPECÍFICOS

2.2.1. Determinar la seropositividad de anticuerpos tipo IgG e IgM contra el HEV, en cerdos faenados en las principales plantas de beneficio de Antioquia.

2.2.2. Evaluar la presencia del genoma viral del HEV, en heces e hígados de cerdos faenados en las principales plantas de beneficio de Antioquia.

2.2.3 .Establecer la asociación entre los marcadores de infección y las lesiones histopatológicas presentes en hígados de cerdos faenados en Antioquia

2.2.4. Describir las características moleculares y filogenéticas de las secuencias del genoma del HEV presentes en cerdos faenados en las principales plantas de beneficio de Antioquia.

3. HIPOTESIS

3.1. Existe circulación del Virus de la Hepatitis E (HEV) en cerdos en edad de beneficio en Antioquia.

3.2. La infección con HEV en cerdos está asociada a la presencia de lesiones en el hígado.

3.3. El virus del HEV que circula en los cerdos en edad de beneficio pertenecen a un único linaje del genotipo 3.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES.

La Hepatitis E es una enfermedad causada por el virus de la Hepatitis E (HEV), que es el único miembro de la familia *Hepeviridae*, para el cual se han descrito cuatro genotipos, pero solo un serotipo. Los genotipos 1 y 2 infectan exclusivamente a humanos, mientras los genotipos 3 y 4 infectan cerdos y otras especies de mamíferos incluido los humanos (Aggarwal, 2013a; Kumar *et al.*, 2013). Las presentaciones clínicas de la enfermedad en humanos pueden variar dependiendo del grado de endemidad de las regiones donde se encuentra. En áreas con deficientes condiciones sanitarias y baja calidad de agua para consumo humano la infección es común y se presentan tanto brotes epidémicos como casos esporádicos de hepatitis aguda autolimitada, principalmente en adultos jóvenes y en mujeres embarazadas en las cuales la infección puede ser particularmente severa (Aggarwal, 2013a; Teshale & Hu, 2011).

Desde la descripción del virus en los cerdos (Meng *et al.*, 1997), ha habido un número creciente de reportes que vinculan a este animal como reservorio del virus y su participación en la aparición de casos esporádicos en países desarrollados donde la infección no es endémica. Los análisis genéticos y filogenéticos indican que las cepas que circulan entre humanos y cerdos tienen estrecha relación (Meng, 2010, 2012; Pavio *et al.*, 2015) reforzando la importancia que tienen los cerdos en la transmisión de la enfermedad. A continuación se describen aspectos generales de las características del virus, del desarrollo de la enfermedad en humanos y se revisarán las características generales de la infección en el cerdo.

4.2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS:

El HEV es un virus RNA, de cadena sencilla, de sentido positivo, de aproximadamente 7,3 kilobases (kb); en el extremo 5' posee un "cap" seguido de una región no traducida (Untranslated Regions: UTR) corta y tres marcos de lectura abierta (Open Reading Frame: ORF) parcialmente superpuestos: ORF1, ORF2 y ORF3. En el extremo 3' presenta otra UTR la cual finaliza en una cadena de 200 a 300 adeninas (Poli A) (Koonin *et al.*, 1992; Panda & Varma, 2013; Tsarev *et al.*, 1992). La cinética de expresión de las proteínas virales no es clara, pero su expresión durante la infección ha sido confirmada por la presencia de anticuerpos en humanos y animales infectados natural y experimentalmente (Holla *et al.*, 2013; Johnne *et al.*, 2014a; Khudyakov YuE *et al.*, 1994).

Experimentos desarrollados en monos infectados detectaron la presencia de dos RNAs subgenómicos de 2 y 3,7 Kb, que traducían las proteínas del ORF2 y ORF3 respectivamente (Tam *et al.*, 1997), sin embargo, estudios posteriores en cultivos celulares han encontrado que estas proteínas son traducidas a partir de un RNA subgenómico bicistrónico de 2,2 Kb (Graff *et al.*, 2006) donde los codones de iniciación para cada proteína están separados por algunos nucleótidos (Bouquet *et al.*, 2012; Graff *et al.*, 2006).

4.3. VARIANTES GENÉTICAS (GENOTIPOS):

Existen cuatro genotipos principales que pueden infectar humanos. Los genotipos 1 y 2 infectan únicamente a humanos, mientras que los genotipos 3 y 4 además de humanos pueden infectar los cerdos y otros animales mamíferos (Johnne *et al.*, 2014b) . Nuevas variantes genéticas del virus se han descrito en aves (Kwon *et al.*, 2012; Haqshenas *et al.*, 2001), murciélagos (Drexler *et al.*, 2012), peces (Batts *et al.*, 2011) y ratas (Johnne *et al.*, 2010) que según su grado de identidad genética podrían dar lugar a nuevos géneros de la familia *Hepeviridae*.

Aunque se acepta que el HEV se divide en cuatro genotipos, un estudio filogenético (Lu *et al.*, 2006) en el cual se analizaron 421 aislamientos a nivel mundial, propuso que el genotipo 1 estaba dividido en 5 subtipos, el genotipo 2 en dos subtipos y los genotipos 3 y 4 son los más diversos, en diez y siete subtipos respectivamente, lo cual demuestra la gran diversidad genética del virus (Lu *et al.*, 2006).

Análisis filogenéticos y de recombinación sobre 134 genomas de HEV secuenciados completamente han señalado tres sitios potencialmente significativos de recombinación intra e intergenotípica (Wang *et al.*, 2010) sugiriendo que la recombinación es rara pero posible entre virus humanos y de cerdo. Además de lo anterior, las altas tasas de mutación del los virus RNA, pueden contribuir a explicar la diversidad genética del virus (Holla *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2012).

4.4. PROTEÍNAS DEL HEV:

El ORF1 de aproximadamente 5kb, codifica para las proteínas no estructurales metiltransferasa (MT), proteasa (Pro), Helicasa (Hel) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), esta última responsable de la replicación del virus; además codifica para dos dominios Y y X cuyas funciones no están claras todavía (Holla *et al.*, 2013; Koonin *et al.*, 1992).

Las proteínas estructurales de la cápside están codificadas en el ORF2, el cual produce una proteína que se caracteriza por tener una señal de encapsidación seguida de una región rica en arginina y varios sitios de glicosilación, que aparentemente son esenciales en la formación de partículas infecciosas (Li *et al.*, 2005b; Mori & Matsuura, 2011). Se ha encontrado también que varios epítopes de esta proteína son importantes en la generación de anticuerpos neutralizantes (Sanford *et al.*, 2012; Shrestha *et al.*, 2007).

El ORF3 codifica para una fosfoproteína de aproximadamente 115 aminoácidos que está involucrada en la morfogénesis del virión y en la patogénesis viral (Koonin *et al.*, 1992; Okamoto, 2007) Esta proteína interactúa con proteínas del citoesqueleto (Okamoto, 2007; Zafrullah *et al.*, 1999) y con proteínas involucradas en la activación de la señalización celular; participa también en la exportación nuclear de α 1-microglobulina y sus precursores en el hepatocito (Tyagi *et al.*, 2004). Se ha mostrado que esta proteína, está presente en la superficie de los viriones recién formados y juega un papel importante en la salida del virión de la célula infectada (Nagashima *et al.*, 2011).

4.5. CICLO DE REPLICACIÓN DEL HEV:

Se conoce poco acerca de los receptores celulares y ligandos virales implicados en la adhesión del HEV a la célula. Se ha propuesto que las moléculas de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG por sus siglas en inglés) como los receptores putativos del virus, sin embargo los investigadores que propusieron que el virus entra a las células hepáticas a través de endocitosis mediada por clatrina, cuestionan su participación en la entrada del virión (Kapur *et al.*, 2012). Algunos estudios muestran que un péptido del ORF2 entre los aminoácidos 368 y 606 (Li *et al.*, 2005a) con la capacidad de formar partículas parecidas a virus (Virus like particle: VLP) de 23 nm, puede unirse a la membrana celular y penetrar en varios tipos celulares susceptibles a la infección del HEV como HepG2, HuH-7, PLC/PRF/5 y A549 (He *et al.*, 2008). El tratamiento de células con estas VLP es puede inhibir la infección con el virus (Zhang *et al.*, 2012), lo que sugiere que este péptido tiene un papel fundamental como ligando viral, sin embargo, los receptores celulares que se unen a este péptido de la cápside no se han identificado aún.

Uno de los modelos más aceptados para la replicación del HEV y la expresión de sus genes parte de las similitudes que tiene el virus con otros virus RNA de sentido positivo. Después que el virus entra a la célula permisiva, el RNA

genómico sale de la cápside (desencapsidación) y es directamente traducido en el citoplasma de la célula infectada para producir una poliproteína donde están las proteínas no estructurales codificadas por el ORF1 (Ansari *et al.*, 2000), después que esta poliproteína es procesada por proteasas celulares, la RdRp replica el genoma viral de sentido positivo formando intermediarios de RNA de sentido negativo que sirven tanto como molde para hacer copias sucesivas del RNA genómico, como para la síntesis de hebras de RNA subgenómico (Graff *et al.*, 2006). El RNA subgenómico es entonces traducido a las proteínas estructurales. Las proteínas de cápside empaquetan el genoma viral para ensamblar los nuevos viriones, que salen de la célula mediante mecanismos que no están bien definidos (Figura 4.1) (Nagashima *et al.*, 2011) y aunque falta confirmación experimental directa de este modelo de replicación existen algunos hallazgos que soportan el modelo (Chandra *et al.*, 2008; Panda & Varma, 2013)

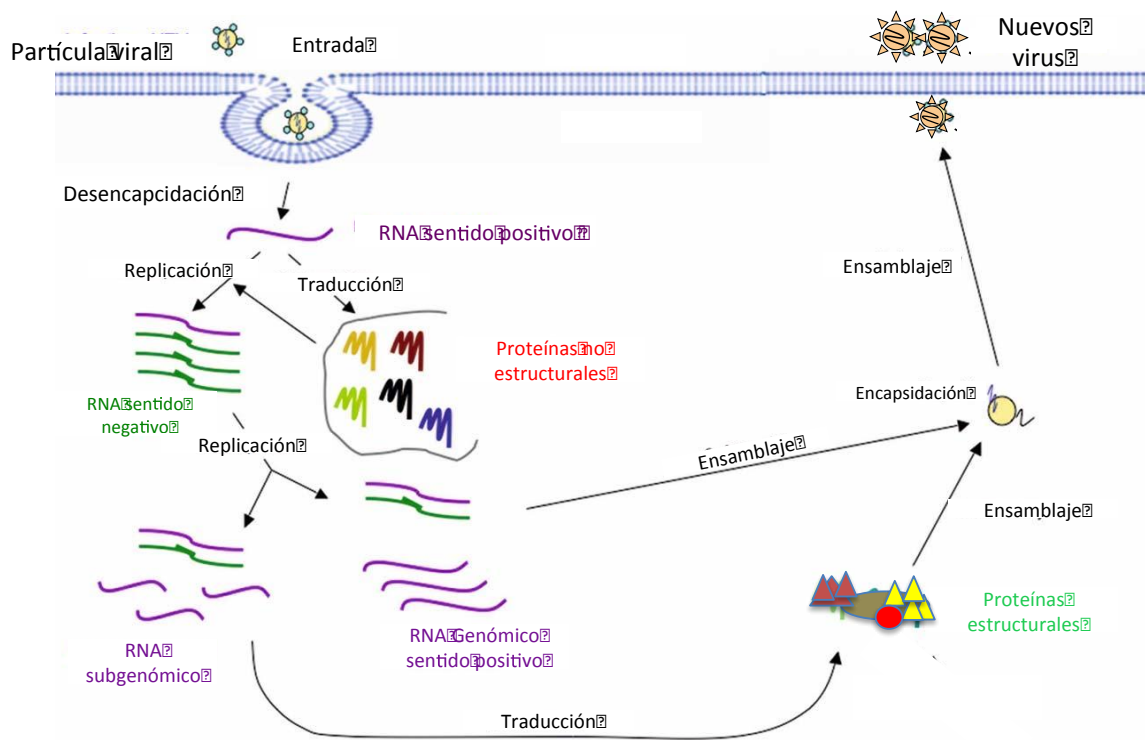


Figura 4.1. Esquema del ciclo de replicación del HEV
(Adaptado de Chandra *et al.*, 2008)

4.6. PATOGÉNESIS DE LA HEPATITIS E EN HUMANOS

4.6.1. Rutas de transmisión y periodo de incubación en humanos

Se han reportado cuatro rutas de transmisión. (i) Trasmisión fecal-oral debido a la contaminación de las fuentes de agua potable; (ii) trasmisión a partir de alimentos (carne/hígado o vegetales contaminados); (iii) transfusión de productos sanguíneos infectados; (iv) transmisión vertical (materno-fetal). De estos la primera es la más común, y en algunos casos, particularmente en áreas no endémicas y casos esporádicos en regiones endémicas, no es posible establecer la ruta de adquisición del virus (Aggarwal & Naik, 2009; Aggarwal, 2011; Maier, 1992)

El periodo de incubación en humanos, después de la exposición oral, oscila entre 4 a 5 semanas, aunque en brotes epidémicos se ha reportado la presentación de los síntomas en periodos de 2 a 10 semanas después de la ingestión de agua contaminada (Khuroo, 2011; Twum-Barima Asante, 2003). En estudios de trasmisión experimental en primates no humanos se presenta una elevación de las enzimas hepáticas 42-46 días después de la ingestión del virus y en hembras de mono embarazadas puede variar de una a dos semanas hasta cuatro a cinco (Krawczynski *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2004; Tsarev *et al.*, 1995)

4.6.2. Curso de la infección y respuesta inmune en humanos.

Los anticuerpos tipo inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG) en respuesta a la infección aparecen de forma temprana, usualmente al mismo tiempo de la presentación de los síntomas de forma parecida a la infección por el virus de la hepatitis A (HAV), así el diagnóstico usualmente se puede hacer en el momento de la presentación de la enfermedad. En los humanos con hepatitis E la IgM comienza a producirse justo antes de la aparición de los niveles más altos de ALT y alcanza su título máximo al mismo tiempo que la ALT tiene su máxima actividad (Aggarwal & Jameel, 2011; Chandra *et al.*, 2010, 2008). Los IgM específicos desaparecen aproximadamente 4 a 5 meses dentro de la fase convaleciente de la enfermedad.

Los anticuerpos IgG se producen un poco después que los IgM y los títulos se incrementan a través de la fase aguda de la enfermedad hasta la fase convaleciente (Ver figura 2), permaneciendo en títulos altos de 1 a 5 años después de la resolución de los síntomas: los IgM anti HEV parecen declinar a través del tiempo más rápidamente que los IgG anti HAV; en algunos casos los IgG pueden ser detectados después de 14 años de la presentación de la enfermedad, sin embargo, la posibilidad de una repetida exposición no puede ser descartada (Aggarwal & Jameel, 2011; Chandra *et al.*, 2008; Holla *et al.*, 2013).

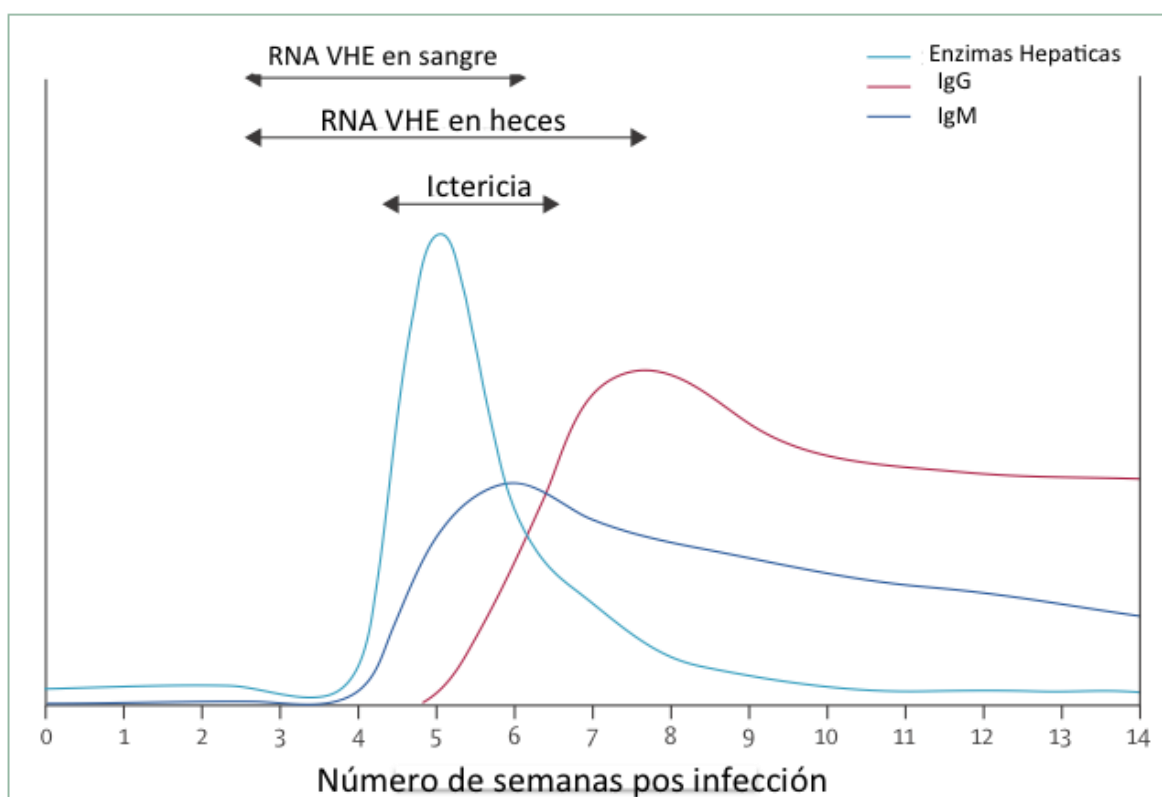


Figura 4.2. Curso de la infección del HEV en Humanos.
(Adaptado de Kamar *et al.*, 2012)

La respuesta de anticuerpos a antígenos virales individuales es muy variable, debido principalmente a diferencias tanto específicas de cepa como a la respuesta individual de cada paciente. Así por ejemplo después de alcanzar altos niveles durante la fase aguda los IgG específicos para las proteínas del ORF2, disminuyen rápidamente sobre los 6 a 12 meses y podrían no persistir a niveles

protectores (Schwartz *et al.*, 1994; Srivastava *et al.*, 2011) Por otro lado, en una proporción de pacientes, la respuesta a las proteínas del ORF3 no genera títulos detectables contra los antígenos, mientras que otros presentan anticuerpos reactivos contra estas proteínas durante muchos años (Khudyakov & Kamili, 2011).

Poco se conoce acerca de la respuesta inmune mediada por células en humanos, reciente evidencia sugiere que la respuesta inmune celular se da principalmente en pacientes con infección aguda, pues linfocitos de estos pacientes son sensibles a péptidos específicos de HEV. La respuesta de células T específicas disminuye a lo largo de la fase convaleciente y pueden jugar un papel importante la patogénesis de la infección aguda y en la recuperación de la enfermedad (Suneetha *et al.*, 2012).

Un estudio reciente evaluó la frecuencia y el estado de activación de células NK y NKT, así como la actividad citotóxica de las células NK presentes en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de pacientes con hepatitis E y en controles sanos. En 14 pacientes de 41, los estudios se repitieron durante el período de convalecencia. Los resultados mostraron que los pacientes tienen menos porcentaje que los controles: células NK (8,9% frente a 11,2%) y las células NKT (8,7% frente a 13,6%). Los marcadores de activación estaban presentes en una gran proporción de las células NK en los pacientes (43,5% frente a 15,5%) y las células NKT (41,5% frente a 12,8%). La citotoxicidad de las células NK fue similar en pacientes y controles. Durante la convalecencia, todos los parámetros se normalizaron. Las alteraciones en el número de células NK y NKT y el estado de activación durante la hepatitis E aguda sugieren un papel importante de estas células en la patogénesis de la enfermedad (Srivastava *et al.*, 2008).

Otros estudios, han mostrado una expansión de de CD4+ en pacientes comparado con los controles (Srivastava *et al.*, 2007). Sin embargo, las proporciones de CD4+/CD69+ y CD8+/CD69+ productores de interferón gamma (INF γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleuquina 4 (IL-4) permanecieron sin ningún

cambio después del estímulo con proteínas del ORF2. La disminución de INF γ y TNF α producidos por células T en pacientes con Hepatitis E, después de la activación policlonal con PMA e ionomicina sugieren un inherente defecto en la activación de células T en individuos infectados (Srivastava *et al.*, 2007). La limitada actividad inmune en el compartimiento periférico puede resultar de la migración y secuestro de las células inmunes en el hígado (Srivastava *et al.*, 2011).

Aggarwal *et al.*, (2007) caracterizaron la respuesta proliferativa de linfocitos en pacientes y controles sanos usando péptidos del ORF2 y el ORF3, encontrando un aumento en las células mononucleares en los pacientes comparados con los controles principalmente con los péptidos del ORF2.

4.6.3. Manifestaciones Clínicas en humanos:

La presentación habitual se caracteriza por ictericia, coluria, acolia, malestar general, náuseas, vómitos y fiebre; suele durar entre 1 a 6 semanas, aunque también puede cursar de forma asintomática. En zonas endémicas afecta sobre todo a personas entre 14 y 40 años, mientras que en países desarrollados afecta más a personas de mediana edad, principalmente varones (Aggarwal & Jameel, 2011; Aggarwal, 2013b; Sarin & Kumar, 2012). En zonas endémicas tiene baja mortalidad (0,07-0,6%), siendo mayor en los países en desarrollo por la presencia de otras enfermedades. En mujeres embarazadas afectadas el riesgo de fallo hepático fulminante y la mortalidad es mayor, situándose entre el 15-25% (Acharya, 2013; Khuroo *et al.*, 1981; Kumar *et al.*, 2004; Navaneethan *et al.*, 2008).

Hasta hace relativamente poco tiempo se consideraba que el HEV solo producía cuadros agudos que generalmente evolucionaban hacia la curación espontánea, sin precisar más tratamiento que el sintomático. Sin embargo, en los últimos años se ha observado el desarrollo de hepatitis crónica por HEV. Los casos descritos en los que esto sucede corresponden a pacientes inmunodeprimidos, ya sea por haber sido sometidos a un trasplante de órgano sólido, padecer un linfoma, haber

recibido un trasplante de medula ósea, estar infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o ser pacientes tratados con glucocorticoides e inmunodepresores por enfermedades autoinmunes, entre otros (Koenecke *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Parvez, 2013).

4.6.4. Hallazgos histopatológicos de la infección en humanos.

Los estudios sobre epidemias de HEV han generado importante información acerca de la patología de la enfermedad sobretodo en las presentaciones agudas. Los hallazgos histopatológicos en humanos son de dos tipos principales: (1) hepatitis aguda típica y (2) una variante colestásica. En este último caso, las características importantes incluyen la éstasis en canalículos biliares (coléctasis), y una gran proliferación de conductillos biliares. También hay coléctasis prominente en la zona centroacinar (Mechnik *et al.*, 2001; Peron *et al.*, 2007), cambios degenerativos en los hepatocitos y áreas focales de necrosis, menos comunes que en el tipo no colestásico. Las células de Kupffer que contienen gránulos de lipofucsina son prominentes. Los espacios portales se expanden; los leucocitos polimorfonucleares son visibles en los infiltrados del tracto portal, pero predominan los linfocitos, se puede ver además flebitis de venas porta y central, infiltraciones en intralobulares de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos (Malcolm *et al.*, 2007).

En el tipo de infección HEV no colestásico, se observa necrosis focal de hepatocitos, degeneración de los hepatocitos y la formación de cuerpos acidófilos. Una característica morfológica importante es áreas focales de necrosis intralobulares de los hepatocitos con acumulaciones importantes de macrófagos y activación de las células Kupffer en presencia de linfocitos (Mechnik *et al.*, 2001).

La severidad histológica de la hepatitis en humanos es variable. En una epidemia bien documentada (Gupta & Smetana, 1957; Sarin & Kumar, 2012) el 78% las biopsias, se establecieron distintas categorías que llegaron a clasificarse hasta moderadamente grave. En los casos mortales de hepatitis aguda severa se presenta histológicamente una necrosis de hepatocitos submasiva o masiva. No

se han descrito manifestaciones histológicas crónicas en sujetos inmunocompetentes (Gupta & Smetana, 1957; Sarin & Kumar, 2012).

En los casos agudos de infección por HEV en humanos, la microscopía electrónica revela un considerable polimorfismo de los hepatocitos. Algunos hepatocitos muestran degeneración en forma de globo, vesiculación de la envoltura perinuclear y del retículo endoplasmático rugoso, mientras que otros hepatocitos muestran disminución y condensación del citoplasma y de las organelas celulares para formar un patrón de telaraña. En los casos fulminantes de la infección, los canalículos biliares se dilatan y se observa un estasis biliar tanto intracanicular como intracitoplasmático (Agrawal *et al.*, 2012; Malcolm *et al.*, 2007)

4.6.5. Epidemiología de la enfermedad

4.6.5.1. Presentación en Regiones Endémicas

En estas regiones los brotes epidémicos suceden usualmente con algunos pocos años de diferencia. Tales brotes se han observado en India, China, en las regiones sureste y central de Asia, el medio este, norte y algunas partes del oeste de África. En Norte América, específicamente en México se dieron dos pequeños brotes entre 1986 y 1987, pero desde entonces no se han vuelto a reportar brotes epidémicos. Los brotes son frecuentemente grandes y afecta de cientos a miles de personas, la mayoría de estos asociados al consumo de agua contaminada (Chandra *et al.*, 2008; Dalton *et al.*, 2008; Miyamura, 2011; Sarin & Kumar, 2012).

Los brotes frecuentemente se presentan después de un periodo de lluvias fuertes e inundaciones, las cuales favorecen la mezcla de excretas humanas con las fuentes de agua potable (Sarin & Kumar, 2012). Algunos brotes pueden ocurrir en meses de tiempo seco, posiblemente debido a que la corriente de los ríos disminuye, favoreciendo la concentración de contaminantes fecales. En el sureste de Asia, por ejemplo se presentan recurrentes epidemias asociadas con la disposición de excretas en las riveras de los ríos y donde se usa ésta agua para el beber, cocinar y para la higiene personal. Estas prácticas proveen condiciones que permiten la continua contaminación fecal de las aguas (Nakano *et al.*, 2012).

Los brotes de hepatitis E se han asociados con altas tasas de presentación y mortalidad entre mujeres embarazadas en el tercer trimestre, en las cuales puede llegar a una tasa del 25% de mortalidad, debido a la presentación de fallo hepático fulminante (Aggarwal, 2013b; Pal *et al.*, 2005; Wedemeyer *et al.*, 2012; Sharapov *et al.*, 2009). La carga hormonal y el estado inmunológico de las mujeres embarazadas han sido asociados con esta presentación, pero los factores específicos no están bien establecidos (Kar, 2012; Khuroo *et al.*, 1981; Navaneethan *et al.*, 2008).

4.6.5.2. Presentación en regiones no endémicas.

En regiones no endémicas, donde no se han reportado grandes brotes de la enfermedad en humanos, la infección explica únicamente una minoría de los casos de hepatitis aguda. Hasta hace pocos los casos reportados eran asociados a viajes de los pacientes a zonas endémicas, sin embargo, algunos casos recientes o pequeñas serie de presentación de la enfermedad en estos países, se han relacionado con la transmisión de virus autóctonos en regiones como USA, Europa y en países desarrollados del Asia y del Pacífico (Aggarwal, 2013b; Amon *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 1999). En estas regiones se sospechó que la diseminación era zoonótica, pues algunos estudios mostraron que aislados de HEV de humanos estaban relacionados genéticamente con los aislados encontrados en cerdos de la región (Aggarwal, 2013b; Amon *et al.*, 2006; Meng, 2011, 2013; Meng *et al.*, 1998; Ruggeri *et al.*, 2013). Estos hallazgos fueron corroborados por trabajos experimentales que demostraron infección en cerdos con virus aislados de humanos e infección de primates con cepas aisladas en cerdos. En estas regiones la ruta de transmisión reportada es el consumo de carne contaminada y cocida inadecuadamente principalmente de jabalí y otros animales silvestres (Dalton *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013; Meng, 2010; Ruggeri *et al.*, 2013).

4.7 PATOGÉNESIS DEL HEPATITIS E EN CERDOS

4.7.1. Rutas de transmisión y Periodo de incubación.

Se asume que de forma natural, el cerdo se infecta por vía oro-fecal. De hecho se ha demostrado experimentalmente esta ruta de infección usando cerdos libres de patógenos específicos (SPF). Una vez que los animales se infectan por la vía oral, el virus se replica en el tracto digestivo y llega al hígado, presuntamente a través de la vena porta, donde se replica en los hepatocitos y se excreta en bilis y heces (Choi & Chae, 2003).

Los estudios epidemiológicos iniciales indicaban que los cerdos de 2 a 4 meses de edad eran los que básicamente estaban infectados por el HEV. No obstante, trabajos recientes han detectado el virus en lechones de un mes de edad (de Deus *et al.*, 2007), lo que inicia el debate sobre la transmisión del virus a edades muy tempranas. Se sospecha que las cerdas podrían ser una causa significativa de infección para los lechones, sea por transmisión vertical u horizontal (de Deus *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta el momento no se han publicado evidencias de la transmisión del virus de la cerda a su descendencia.

La transmisión horizontal del HEV ha sido experimentalmente demostrada. No obstante, existe la duda sobre la eficacia de esta transmisión. Aunque parece muy efectiva en el campo, experimentalmente esta efectividad solamente se consigue cuando los cerdos se infectan vía intravenosa y consiguen excretar grandes cantidades de virus (Bouwknegt *et al.*, 2008; Satou & Nishiura, 2007). En cambio, cuando los animales son desafiados vía oro-nasal, la infección de cerdos por contacto sucede de forma esporádica (Bouwknegt *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 2009a; Satou & Nishiura, 2007).

Por otro lado, hasta el momento no se ha evidenciado la existencia de transmisión vertical del HEV cuando se infectan cerdas gestantes experimentalmente, aunque sí son capaces de infectarse y seroconvertir (Kasorndorkbua *et al.*, 2003). En este

mismo experimento, tampoco se observó mortalidad en las hembras gestantes, tal como se ha descrito en mujeres.

4.7.2. Curso de la infección y respuesta inmune en cerdos.

En una granja convencional, la dinámica de infección por el HEV es muy similar a la de otros agentes víricos (de Deus *et al.*, 2008) (Figura 4.3). Una elevada proporción de animales adultos son seropositivos y los lechones lactantes presentan anticuerpos IgG e IgA anti-HEV adquiridos de forma pasiva. Estos anticuerpos tienen una duración variable dependiendo de la cantidad de anticuerpos maternos transferidos (Meng *et al.*, 1997). Lechones nacidos de madres con títulos de anticuerpos muy elevados pueden ser seropositivos hasta las nueve semanas de edad (de Deus *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 1997).

Una vez que los animales pierden los anticuerpos maternos, se infectan y la seroconversión se da entre las 12 y 14 semanas de edad, aproximadamente (Figura 4.3). La seroconversión se caracteriza por la aparición primero de IgA e IgM anti-HEV alrededor de las 12 semanas de edad y una semana después por la aparición de IgG anti-HEV. Los IgM se pueden detectar durante un periodo de 5 a 7 semanas, mientras que los IgG duran hasta la edad del sacrificio (de Deus *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 1997). Se desconoce, no obstante, la duración de los IgG una vez que el animal se ha infectado de forma natural. La detección de IgM habitualmente está relacionada con la presencia de virus en sangre (viremia), lo que significa que este tipo de anticuerpo es indicativo de la fase aguda de la infección.

El pico de infección se observa especialmente entre las 12 y las 15 semanas de edad (Figura 3), momento en los que el HEV se puede detectar, además de en sangre, en bilis, nódulos linfáticos mesentéricos, hígado y heces en más del 50% de los animales infectados. A esa edad también es posible observar lesiones hepáticas que varían de leves a moderadas; en ningún caso se observan lesiones macroscópicas significativas y que sean causa de sintomatología clínica en el cerdo (de Deus *et al.*, 2008).

No obstante, estudios experimentales han demostrado que el HEV en el cerdo se replica en otros órganos aparte del hígado (Williams *et al.*, 2001) como intestino delgado, colon y nódulos linfáticos. El virus también puede detectarse en el epitelio de los conductos biliares, así como en el intestino delgado y en el grueso, en los nódulos linfáticos, las tonsilas, el bazo y los riñones de animales infectados de forma natural (Choi & Chae, 2003).

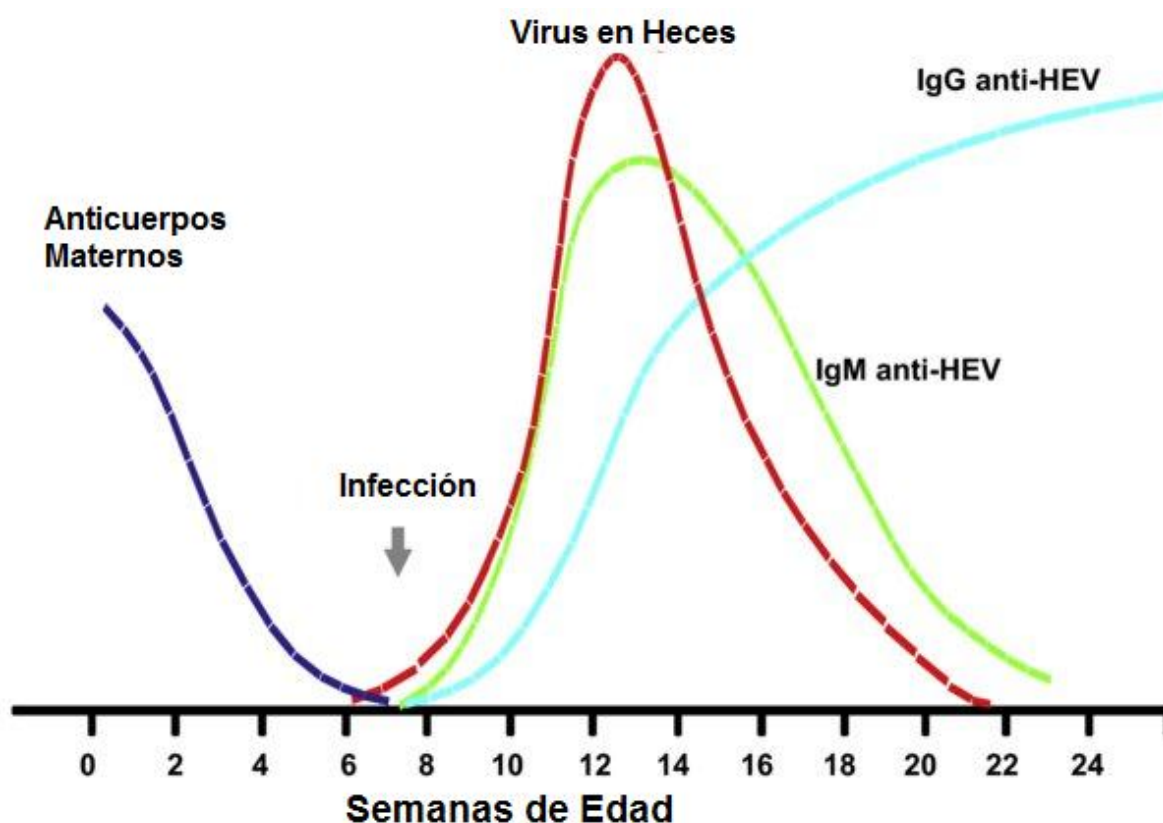


Figura 4.3. Curso de infección del HEV.
(adaptada de: Pavio *et al.* 2010).

4.7.3. Manifestaciones Clínicas en cerdos.

Salvo un único reporte de infección experimental en cerdos donde se observó ictericia en los animales infectados (Balayan *et al.*, 1990) la infección por el HEV, sea natural o experimental, cursa sin signos clínicos aparentes (Hagiwara *et al.*,

2007; Halbur *et al.*, 2001; Sanford *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha observado que al infectar cerdos con cepas tanto humanas como porcinas del HEV puede inducir a un ligero incremento en las enzimas hepáticas (Bouwknegt *et al.*, 2009; Halbur *et al.*, 2001) acompañado de un incremento también ligero, del tamaño de los nódulos linfáticos mesentéricos (Halbur *et al.*, 2001).

4.7.4. Hepatitis E como zoonosis.

La identificación y caracterización de el primer aislado de HEV en cerdos en Estados Unidos (Meng *et al.*, 1997) llevó a configurar el concepto de zoonosis, desde el reporte inicial en 1997 muchos trabajos se han desarrollado para establecer la presencia del virus en cerdos en diferentes países, donde los hallazgos han postulado a los cerdos como uno de los principales reservorios de la infección en regiones no endémicas (Pavio *et al.*, 2010).

Los virus identificados en cerdos son del genotipo 3 y 4 y han sido asociados como causa de las presentaciones esporádicas en dichas regiones. Análisis filogenéticos de las secuencias genómicas de los virus aislados en cerdos han sido relacionados con los genotipos 3 y 4 encontrado en humanos, estudios seroepidemiológicos han mostrado que en el medio este de los Estados Unidos hay una amplia presencia del virus y que cerca del 80 al 100% de los cerdos en granjas están infectados (Feagins *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2002).

Varios reportes en países en vía de desarrollo y en países desarrollados indican que la infección en cerdos es común en todo el mundo, estos hallazgos dan cuenta de una fuente importante de virus para respaldar el concepto de infección zoonótica (Feagins *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2002; Kantala *et al.*, 2015; Krumbholz *et al.*, 2013; dos Santos *et al.*, 2009).

Un estudio encontró la presencia del RNA viral del genotipo 3 y 4 en 7 de 363 hígados empacados y comercializados en carnicerías locales japonesas. Estos aislados fueron genéticamente muy parecidos a aquellos encontrados en humanos de la región (Meng *et al.*, 1998). En Estados Unidos (USA) el RNA del genotipo 3 fue aislado en 11 de 127 empaques comerciales de hígado de cerdo (Feagins *et*

al., 2008). En Japón una gran proporción de pacientes infectados con el virus admitieron haber ingerido hígado de cerdo crudo o de baja cocción (Mizuo *et al.*, 2005; Yazaki *et al.*, 2003).

La hepatitis E es considerada como una enfermedad zoonótica y los cerdos y otras especies son considerados los reservorios (Meng, 2010). Se ha demostrado que las personas que manipulan estos animales tales como trabajadores de granjas porcinas y veterinarios tanto en países en vía de desarrollo como en países desarrollados tienen un incremento en el riesgo de padecer la infección (Aggarwal, 2013a; Dalton *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013).

4.7.5. Hallazgos histopatológicos de la infección en cerdos

Histológicamente se observa hepatitis multifocal linfoplasmocítica, de leve a moderada (da Costa Lana *et al.*, 2014; Martín *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 1997). Las lesiones hepáticas están relacionadas con el pico de detección del virus en bilis y en nódulo linfático mesentérico (de Deus *et al.*, 2007) y con altos valores de densidad óptica de IgG e IgM anti-HEV (de Deus *et al.*, 2008).

4.7.6. Genotipos y distribución de HEV en cerdos

Las secuencias del HEV porcino son muy heterogéneas y pertenecen a los genotipos 3 o 4 (Holla *et al.*, 2013; Okamoto, 2007). El genotipo 3 del HEV ha sido identificado mayoritariamente en cerdos de países industrializados, donde la enfermedad es esporádica en el hombre, como Norteamérica, Europa y países desarrollados de Asia (Okamoto, 2007). El genotipo 4 ha sido identificado principalmente en cerdos de países asiáticos, en los que la enfermedad es endémica en humanos, como India, Japón y Taiwán (Holla *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2006; Okamoto, 2007). Las cepas de HEV humanas y porcinas del mismo país suelen estar relacionadas entre sí, son habitualmente del mismo genotipo y tienden a presentar una elevada identidad nucleotídica (Machnowska *et al.*, 2014; Meng, 2010; Meng *et al.*, 1997; Mirazo *et al.*, 2012).

4.7.7. Epidemiología de la Infección en el Cerdo.

La seroprevalencia frente al HEV en el cerdo varía según el país, la granja y la edad del animal, y puede llegar a ser muy elevada (>90%) en áreas geográficas donde la enfermedad no es endémica en la especie humana (Di Bartolo *et al.*, 2011; Berto *et al.*, 2012; Krumbholz *et al.*, 2013; Seminati *et al.*, 2008; Steyer *et al.*, 2011).

Aunque el porcentaje de cerdos infectados con el HEV varía con la edad, se ha visto que el virus puede ser detectado en animales de 1 a 22 semanas de edad (Casas *et al.*, 2009b; Clayson *et al.*, 1995; de Deus *et al.*, 2007, 2008), con mayor prevalencia entre los tres y los cuatro meses de vida (Casas *et al.*, 2011; de Deus *et al.*, 2008). La mayor prevalencia de infección observada en estas edades está relacionada con la disminución de los anticuerpos maternos y con el incremento de la probabilidad de que los animales se infecten debido a la contaminación fecal del ambiente, del alimento y del agua (de Deus *et al.*, 2008).

Los estudios sobre HEV en cerdos de Europa, Asia, Oceanía, África y América han evidenciado porcentajes variables en las piaras alrededor del mundo, alcanzando hasta el 100% de positividad para anticuerpos tipo IgG en diversas granjas estudiadas (Di Bartolo *et al.*, 2011; Conlan *et al.*, 2012; Kaba *et al.*, 2013; Ruggeri *et al.*, 2013). En cerdos únicamente se ha detectado los genotipos 3 y 4 siendo el genotipo 4 frecuente en Japón y China pero se ha reportado en algunos cerdos de Europa, mientras que el genotipo 3 del HEV se ha identificado en cerdos naturalmente infectados en los cinco continentes (van der Honing, van Coillie, Antonis, & van der Poel, 2011; Berto *et al.*, 2012; Geng *et al.*, 2013; Urayama *et al.*, 2010;).

Al igual que los estudios en cerdos de otros continentes, en América la seroprevalencia de HEV es variable. En Canadá se encontró anticuerpos en 59.4% de los cerdos estudiados con seroprevalencias que variaron entre 38.3-88.85% en diferentes regiones del país (Yoo *et al.*, 2001). En Estados Unidos, dos trabajos independientes reportaron positividad en 34.5% y 71.4% de los animales

estudiados y del 100% de las granjas involucradas (considerando como positiva la granja donde se detecto al menos un animal positivo) (Meng et al., 1997; Withers et al., 2002). Otros trabajos en Latinoamérica han mostrado prevalencias de 80% en México (Cooper et al., 2005), 22.7% en Argentina (Munné et al., 2006), 81% en Brasil (Guimarães et al., 2005) y 5% en Chile (Reinhardt et al., 2003).

Todos estos estudios han demostrado que el HEV porcino es ubicuo, tanto en países en vías de desarrollo como en países industrializados (Lu et al., 2006; Okamoto, 2007).

BIBLIOGRAFIA

- Acharya, S. K. (2013).** Hepatitis E and Acute Liver Failure in Pregnancy. *J Clin Exp Hepatol* **3**, 213–224.
- Aggarwal, R., Shukla, R., Jameel, S., Agrawal, S., Puri, P., Gupta, V. K., Patil, A. P. & Naik, S. (2007).** T-cell epitope mapping of ORF2 and ORF3 proteins of human hepatitis e virus. *J Viral Hepat* **14**, 283–292.
- Aggarwal, R. (2011).** Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res* **161**, 15–22.
- Aggarwal, R. (2013a).** Hepatitis E: Epidemiology and Natural History. *J Clin Exp Hepatol* **3**, 125–133.
- Aggarwal, R. (2013b).** Hepatitis E: Clinical presentation in disease-endemic areas and diagnosis. *Semin Liver Dis* **33**, 30–40.
- Aggarwal, R. & Jameel, S. (2011).** Hepatitis E. *Hepatology* **54**, 2218–2226.
- Aggarwal, R. & Naik, S. (2009).** Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 1484–1493.
- Agrawal, V., Rawat, A., Aggarwal, R., Goel, A. & Naik, S. (2012).** Histological and immunohistochemical features in fatal acute fulminant hepatitis E. *Indian J Pathol Microbiol* **55**, 22.
- Amon, J. J., Drobeniuc, J., Bower, W. A., Magaña, J. C., Escobedo, M. A., Williams, I. T., Bell, B. P. & Armstrong, G. L. (2006).** Locally acquired hepatitis E virus infection, El Paso, Texas. *J Med Virol* **78**, 741–746.
- Ansari, I. H., Nanda, S. K., Durgapal, H., Agrawal, S., Mohanty, S. K., Gupta, D., Jameel, S. & Panda, S. K. (2000).** Cloning, sequencing, and expression of the hepatitis E virus (HEV) nonstructural open reading frame 1 (ORF1). *J Med Virol* **60**, 275–283.
- Balayan, M. S., Usmanov, R. K., Zamyatina, N. A., Djumalieva, D. I. & Karas, F. R. (1990).** Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol* **32**, 58–59.
- Di Bartolo, I., Ponterio, E., Castellini, L., Ostanello, F. & Ruggeri, F. M. (2011).** Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol* **149**, 330–338.

- Batts, W., Yun, S., Hedrick, R. & Winton, J. (2011).** A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res* **158**, 116–123.
- Berto, A., Backer, J. a, Mesquita, J. R., Nascimento, M. S., Banks, M., Martelli, F., Ostanello, F., Angeloni, G., Di Bartolo, I. & other authors. (2012).** Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes* **190**, 1–6.
- Bouquet, J., Cherel, P. & Pavio, N. (2012).** Genetic characterization and codon usage bias of full-length Hepatitis E virus sequences shed new lights on genotypic distribution, host restriction and genome evolution. *Infect Genet Evol* **12**, 1842–1853. Elsevier B.V.
- Bouwknegt, M., Frankena, K., Rutjes, S. A., Wellenberg, G. J., Husman, A. M. D. R., Poel, W. H. M. Van Der & Jong, M. C. M. De. (2008).** Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res*.
- Bouwknegt, M., Rutjes, S. a, Reusken, C. B. E. M., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M. C. M., de Roda Husman, A. M. & Poel, W. H. M. Van Der. (2009).** The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* **5**, 7.
- Casas, M., Pina, S., de Deus, N., Peralta, B., Martín, M. & Segalés, J. (2009a).** Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels. *Vet Microbiol* **138**, 78–84.
- Casas, M., Pujols, J., Rosell, R., de Deus, N., Peralta, B., Pina, S., Casal, J. & Martín, M. (2009b).** Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Vet Microbiol* **135**, 248–252.
- Casas, M., Cortés, R., Pina, S., Peralta, B., Allepuz, A., Cortey, M., Casal, J. & Martín, M. (2011).** Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet Microbiol* **148**, 27–34.
- Chandra, N. S., Sharma, A., Malhotra, B. & Rai, R. R. (2010).** Dynamics of HEV viremia, fecal shedding and its relationship with transaminases and antibody response in patients with sporadic acute hepatitis E. *Virology* **7**, 213–220.
- Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M. & Jameel, S. (2008).** Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* **33**, 451–464.
- Choi, C. & Chae, C. (2003).** Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J Hepatol* **38**, 827–832.

- Clayson, E. T., Innis, B. L., Myint, K. S., Narupiti, S., Vaughn, D. W., Giri, S., Ranabhat, P. & Shrestha, M. P. (1995).** Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* **53**, 228–232.
- Conlan, J. V, Vongxay, K., Jarman, R. G., Gibbons, R. V, Lunt, R. a, Fenwick, S., Thompson, R. C. A. & Blacksell, S. D. (2012).** Serologic study of pig-associated viral zoonoses in Laos. *Am J Trop Med Hyg* **86**, 1077–1084.
- Cooper, K., Huang, F. F., Batista, L., Rayo, C. D., Bezanilla, J. C., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2005).** Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol* **43**, 1684–1688.
- Da Costa Lana, M. V., Gardinali, N. R., da Cruz, R. A. S., Lopes, L. L., Silva, G. S., Júnior, J. G. C., de Oliveira, A. C. S., de Almeida Souza, M., Colodel, E. M. & other authors. (2014).** Evaluation of hepatitis E virus infection between different production systems of pigs in Brazil. *Trop Anim Health Prod* **46**, 399–404.
- Dalton, H. R., Hunter, J. G. & Bendall, R. P. (2013).** Hepatitis E. *Curr Opin Infect Dis* **26**, 471–478.
- Dalton, H. R., Bendall, R., Ijaz, S. & Banks, M. (2008).** Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* **8**, 698–709.
- De Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martín, M. & Segalés, J. (2007).** Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol* **119**, 105–114.
- De Deus, N., Casas, M., Peralta, B., Nofrarías, M., Pina, S., Martín, M. & Segalés, J. (2008).** Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* **132**, 19–28.
- Drexler, J. F., Seelen, a., Corman, V. M., Fumie Tateno, a., Cottontail, V., Melim Zerbinati, R., Gloza-Rausch, F., Klose, S. M., Adu-Sarkodie, Y. & other authors. (2012).** Bats Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus within the Family Hepeviridae. *J Virol* **86**, 9134–9147.
- Feagins, A. R., Opriessnig, T., Guenette, D. K., Halbur, P. G. & Meng, X. J. (2008).** Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig

livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol* **123**, 32–37.

Geng, Y., Zhao, C., Fan, J., Harrison, T. J., Zhang, H., Lian, H., Geng, K. & Wang, Y. (2013). Genotype analysis of hepatitis e virus from sporadic hepatitis e cases in Northern China. *Infect Genet Evol* **20**, 413–417.

Graff, J., Torian, U., Nguyen, H. & Emerson, S. U. (2006). A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* **80**, 5919–5926.

Guimarães, F. R., Saddi, T. M., Vitral, C. L., Pinto, M. a., Gaspar, A. M. C. & Souto, F. J. D. (2005). Hepatitis E virus antibodies in swine herds of Mato Grosso State, Central Brazil. *Brazilian J Microbiol* **36**, 223–226.

Gupta, D. N. & Smetana, H. F. (1957). The histopathology of viral hepatitis as seen in the Delhi epidemic (1955-56). *Indian J Med Res* **45**, 101–113. Not Available.

Hagiwara, K., Iwabu, Y., Kanai, Y., Miyasho, T., Daidoji, T., Yunoki, M., Tsujikawa, M., Ohkubo, Y., Yasue, H. & Ikuta, K. (2007). Distribution and Propagation of Hepatitis E Virus in Experimentally Infected Swine. *Open Vet Sci J* **1**, 1–6.

Halbur, P. G., Kasorndorkbua, C., Gilbert, C., Guenette, D., Potters, M. B., Purcell, R. H., Emerson, S. U., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2001). Comparative Pathogenesis of Infection of Pigs with Hepatitis E Viruses Recovered from a Pig and a Human. *J Clin Microbiol* **39**, 918–923.

Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H. & Meng, X. J. (2001). Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* **82**, 2449–2462.

He, S., Miao, J., Zheng, Z., Wu, T., Xie, M., Tang, M., Zhang, J., Ng, M. H. & Xia, N. (2008). Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. *J Gen Virol* **89**, 245–249.

Holla, R. P., Ahmad, I., Ahmad, Z. & Jameel, S. (2013). Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* **33**, 3–14.

Van der Honing, R. W. H., van Coillie, E., Antonis, A. F. G. & van der Poel, W. H. M. (2011). First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through Swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One* **6**, 6–11.

- Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2002).** Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol*.
- Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R. G., Machnowska, P., Sachsenröder, J., Nickel, P. & Hofmann, J. (2014a).** An ORF1-rearranged hepatitis e virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *J Viral Hepat* **21**, 447–456.
- Johne, R., Plenge-Bönig, A., Hess, M., Ulrich, R. G., Reetz, J. & Schielke, A. (2010).** Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* **91**, 750–758.
- Johne, R., Dremsek, P., Reetz, J., Heckel, G., Hess, M. & Ulrich, R. G. (2014b).** Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol* **27**, 212–229.
- Kaba, M., Moal, V., Gérolami, R. & Colson, P. (2013).** Epidemiology of mammalian hepatitis E virus infection. *Intervirology* **56**, 67–83.
- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.-S., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H. R., Hoofnagle, J. H., Nelson, K. E. & Purcell, R. H. (2012).** Hepatitis E. *Lancet* **379**, 2477–2488.
- Kantala, T., Heinonen, M., Oristo, S., von Bonsdorff, C.-H. & Maunula, L. (2015).** Hepatitis E Virus in Young Pigs in Finland and Characterization of the Isolated Partial Genomic Sequences of Genotype 3 HEV. *Foodborne Pathog Dis* **12**, 253–260.
- Kapur, N., Thakral, D., Durgapal, H. & Panda, S. K. (2012).** Hepatitis e virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J Viral Hepat* **19**, 436–448.
- Kar, P. (2012).** Hepatitis E Virus Infection During Pregnancy : Why Is The Disease Stormy ? *Med Updat* **22**, 459–462.
- Kasorndorkbua, C., Halbur, P., Guenette, D., Buitenwerf, R., Royer, R. L. & Meng, X. J. (2003).** Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res* **67**, 303–306.
- Khudyakov YuE, Favorov, M. O., Jue, D. L., Hine, T. K. & Fields, H. A. (1994).** Immunodominant antigenic regions in a structural protein of the hepatitis E virus. *Virology* **198**, 390–393.

- Khudyakov, Y. & Kamili, S. (2011).** Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res* **161**, 84–92.
- Khuroo, M. S., Teli, M. R., Skidmore, S., Sofi, M. a & Khuroo, M. I. (1981).** Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med* **70**, 252–255.
- Khuroo, M. S. (2011, October).** Discovery of hepatitis E: The epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res*.
- Koenecke, C., Pischke, S., Heim, A., Raggub, L., Bremer, B., Raupach, R., Buchholz, S., Schulz, T., Manns, M. P. & other authors. (2012).** Chronic hepatitis E in hematopoietic stem cell transplant patients in a low-endemic country? *Transpl Infect Dis* **14**, 103–106.
- Koonin, E. V, Gorbalenya, a E., Purdy, M. a, Rozanov, M. N., Reyes, G. R. & Bradley, D. W. (1992).** Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8259–8263.
- Krawczynski, K., Meng, X.-J. & Rybczynska, J. (2011).** Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. *Virus Res* **161**, 78–83.
- Krumbholz, A., Joel, S., Neubert, A., Dremsek, P., Dürrwald, R., Johne, R., Hlinak, A., Walther, M., Lange, J. & other authors. (2013).** Age-related and regional differences in the prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in pigs in Germany. *Vet Microbiol* **167**, 394–402.
- Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J. B. & Murthy, N. S. (2004).** Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynecol Obstet* **85**, 240–244.
- Kumar, S., Subhadra, S., Singh, B. & Panda, B. K. (2013).** Hepatitis E virus: The current scenario. *Int J Infect Dis* **17**, 228–233.
- Kwon, H. M., Sung, H. W. & Meng, X.-J. (2012).** Serological prevalence, genetic identification, and characterization of the first strains of avian hepatitis E virus from chickens in Korea. *Virus Genes* **45**, 237–245.
- Lee, Y. H., Ha, Y., Ahn, K. K. & Chae, C. (2009).** Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet J* **179**, 417–421.
- Li, S.-W., Zhang, J., He, Z.-Q., Gu, Y., Liu, R.-S., Lin, J., Chen, Y.-X., Ng, M.-H. & Xia, N.-S. (2005a).** Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. *J Biol Chem* **280**, 3400–3406.

- Li, T., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y., Wang, J. C., Engvall, H., Hammar, L., Xing, L. & Cheng, R. H. (2005b).** Essential Elements of the Capsid Protein for Self-Assembly into Empty Virus-Like Particles of Hepatitis E Virus. *J Virol* **79**, 12999–13006.
- Lu, L., Li, C. & Hagedorn, C. H. (2006).** Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* **16**, 5–36.
- Machnowska, P., Ellerbroek, L. & Johne, R. (2014).** Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Vet Microbiol* **168**, 60–68.
- Maier, K. P. (1992).** Hepatitis A to E: symptoms, clinical aspects, prognosis. *Schweiz Rundsch Med Prax* **81**, 791–792.
- Malcolm, P., Dalton, H., Hussaini, H. S. & Mathew, J. (2007).** The histology of acute autochthonous hepatitis E virus infection. *Histopathology* **51**, 190–194.
- Martín, M., Segalés, J., Huang, F. F., Guenette, D. K., Mateu, E., de Deus, N. & Meng, X. J. (2007).** Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Vet Microbiol* **122**, 16–24.
- Mechnik, L., Bergman, N., Attali, M., Beergabel, M., Mosenkis, B., Sokolowski, N. & Malnick, S. (2001).** Acute hepatitis E virus infection presenting as a prolonged cholestatic jaundice. *J Clin Gastroenterol* **33**, 421–422.
- Meng, X. J. (2010).** Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* **140**, 256–265.
- Meng, X. J. (2012).** Emerging and Re-emerging Swine Viruses. *Transbound Emerg Dis* **59**, 85–102.
- Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J. & Emerson, S. U. (1997).** A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9860–9865.
- Meng, X. J., Halbur, P. G., Shapiro, M. S., Govindarajan, S., Bruna, J. D., Mushahwar, I. K., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (1998).** Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* **72**, 9714–9721.

- Meng, X. J. (2011).** From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* **161**, 23–30.
- Meng, X. J., Dea, S., Engle, R. E., Friendship, R., Lyoo, Y. S., Sirinarumitr, T., Urairong, K., Wang, D., Wong, D. & other authors. (1999).** Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* **59**, 297–302.
- Meng, X.-J. (2013).** Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* **33**, 41–49.
- Mirazo, S., Ramos, N. & Arbiza, J. (2012).** Molecular epidemiology of Hepatitis E virus (HEV) in South America current status. *Virus Rev Res*.
- Miyamura, T. (2011).** Hepatitis E virus infection in developed countries. *Virus Res* **161**, 40–46.
- Mizuo, H., Yazaki, Y., Sugawara, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T. & Okamoto, H. (2005).** Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* **76**, 341–349.
- Mori, Y. & Matsuura, Y. (2011, October).** Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res*.
- Munné, M. S., Vladimirovsky, S., Otegui, L., Castro, R., Brajterman, L., Soto, S., Guarnera, E., Molina, V., Monfellano, M. & other authors. (2006).** Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol* **78**, 1579–1583.
- Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, Tanaka, T., Yamada, K., Nishizawa, T. & Okamoto, H. (2011).** A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J Gen Virol* **92**, 269–278.
- Nakano, T., Okano, H., Kobayashi, M., Ito, K., Ohmori, S., Nomura, T., Kato, H., Ayada, M., Nakano, Y. & other authors. (2012).** Molecular epidemiology and genetic history of European-type genotype 3 hepatitis E virus indigenized in the central region of Japan. *Infect Genet Evol* **12**, 1524–1534.
- Navaneethan, U., Al Mohajer, M. & Shata, M. T. (2008).** Hepatitis E and pregnancy: Understanding the pathogenesis. *Liver Int* **28**, 1190–1199.
- Okamoto, H. (2007).** Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* **127**, 216–228.

- Pal, R., Aggarwal, R., Naik, S. R., Das, V., Das, S. & Naik, S. (2005).** Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* **20**, 1094–101.
- Panda, S. K. & Varma, S. P. K. (2013).** Hepatitis E: Molecular Virology and Pathogenesis. *J Clin Exp Hepatol* **3**, 114–124.
- Parvez, M. K. (2013).** Chronic Hepatitis E Infection : Risks and Controls. *Intervirology* 213–216.
- Pavio, N., Meng, X.-J. & Renou, C. (2010).** Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* **41**, 46–66.
- Pavio, N., Meng, X.-J. & Doceul, V. (2015).** Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr Opin Virol* **10**, 34–41.
- Peron, J.-M., Danjoux, M., Kamar, N., Missouri, R., Poirson, H., Vinel, J.-P., Mansuy, J.-M., Bureau, C., Izopet, J. & other authors. (2007).** Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. *Virchows Arch* **450**, 405–410.
- Reinhardt, G., Ibarra, H., Riedemann, S. & Vega, I. (2003).** Estudio serológico preliminar de hepatitis E en cerdos en Chile. *Arch Med Vet* **35**, 233–236.
- Ruggeri, F. M., Di Bartolo, I., Ponterio, E., Angeloni, G., Trevisani, M. & Ostanello, F. (2013).** Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol* **36**, 331–344.
- Sanford, B. J., Dryman, B. a., Huang, Y.-W. W., Feagins, A. R., LeRoith, T. & Meng, X.-J. J. (2011).** Prior infection of pigs with a genotype 3 swine hepatitis E virus (HEV) protects against subsequent challenges with homologous and heterologous genotypes 3 and 4 human HEV. *Virus Res* **159**, 17–22. Elsevier B.V.
- Sanford, B. J., Opriessnig, T., Kenney, S. P., Dryman, B. a., Córdoba, L. & Meng, X. J. (2012).** Assessment of the cross-protective capability of recombinant capsid proteins derived from pig, rat, and avian hepatitis E viruses (HEV) against challenge with a genotype 3 HEV in pigs. *Vaccine* **30**, 6249–6255.
- Dos Santos, D. R. L., Vitral, C. L., de Paula, V. S., Marchevsky, R. S., Lopes, J. F., Gaspar, A. M. C., Saddi, T. M., Júnior, N. C. D. M., Guimarães, F. D. R. & other authors. (2009).** Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J* **182**, 474–80.

- Sarin, S. K. & Kumar, M. (2012).** Hepatitis E. In *Zakim Boyer's Hepatol*, Sixth Edit., pp. 605–628. Edited by T. D. Boyer, M. P. Manns & A. J. Sanyal. Richmond: Elsevier.
- Satou, K. & Nishiura, H. (2007).** Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. *BMC Vet Res* **3**, 9–18.
- Schwartz, E., Ilan, Y. & Galun, E. (1994).** Hepatitis E virus infection. *Harefuah* **127**, 249–251.
- Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N. & Martin, M. (2008).** Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* **175**, 130–132.
- Sharapov, M. B., Favorov, M. O., Yashina, T. L., Brown, M. S., Onischenko, G. G., Margolis, H. S. & Chorba, T. L. (2009).** Acute viral hepatitis morbidity and mortality associated with hepatitis E virus infection: Uzbekistan surveillance data. *BMC Infect Dis* **9**, 35–43.
- Shrestha, M. P., Scott, R. M., Joshi, D. M., Mammen, M. P., Thapa, G. B., Thapa, N., Myint, K. S. A., Fourneau, M., Kuschner, R. A. & other authors. (2007).** Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* **356**, 895–903.
- Shukla, P., Nguyen, H. T., Faulk, K., Mather, K., Torian, U., Engle, R. E. & Emerson, S. U. (2012).** Adaptation of a Genotype 3 Hepatitis E Virus to Efficient Growth in Cell Culture Depends on an Inserted Human Gene Segment Acquired by Recombination. *J Virol* **86**, 5697–5707.
- Srivastava, R., Aggarwal, R., Bhagat, M. R., Chowdhury, A. & Naik, S. (2008).** Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. *J Viral Hepat* **15**, 910–916.
- Srivastava, R., Aggarwal, R., Sachdeva, S., Alam, M. I., Jameel, S. & Naik, S. (2011).** Adaptive immune responses during acute uncomplicated and fulminant hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* **26**, 306–311.
- Srivastava, R., Aggarwal, R., Jameel, S., Puri, P., Gupta, V. K., Ramesh, V. S., Bhatia, S. & Naik, S. (2007).** Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral Immunol* **20**, 56–65.
- Steyer, A., Naglič, T., Močilnik, T., Poljšak-Prijatelj, M. & Poljak, M. (2011).** Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: prevalence

and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage. *Infect Genet Evol* **11**, 1732–1737.

Suneetha, P. V., Pischke, S., Schlaphoff, V., Grabowski, J., Fytli, P., Gronert, A., Bremer, B., Markova, A., Jaroszewicz, J. & other authors. (2012). Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology* **55**, 695–708.

Tam, a W., White, R., Yarbough, P. O., Murphy, B. J., McAtee, C. P., Lanford, R. E. & Fuerst, T. R. (1997). In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* **238**, 94–102.

Teshale, E. H. & Hu, D. J. (2011). Hepatitis E: Epidemiology and prevention. *World J Hepatol* **3**, 285–291.

Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Rippey, M. K., Zack, P., Shapiro, M. & Purcell, R. H. (1995). Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J Infect Dis* **172**, 31–37.

Tsarev, S. A., Emerson, S. U., Reyes, G. R., Tsareva, T. S., Legters, L. J., Malik, I. A., Iqbal, M., Purcell, R. H., Legters, L. J. & other authors. (1992). Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 559–563.

Twum-Barima Asante, M. (2003). *Hepatitis E - Virus (HEV): Comparative evaluation of IgG antibody assays in a low-endemicity setting.* Johann Wolfgang Goethe-Universität.

Tyagi, S., Surjit, M., Roy, A. K., Jameel, S. & Lal, S. K. (2004). The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific α 1-microglobulin and its precursor α 1- microglobulin/bikunin precursor (AMBP) and expedites their export from the hepatocyte. *J Biol Chem* **279**, 29308–29319.

Urayama, T., Sapsutthipas, S., Tsujikawa, M., Yamashita, A., Nishigaki, H., Ibrahim, M. S., Hagiwara, K., Yunoki, M., Yasunaga, T. & other authors. (2010). Full-Length Sequences of One Genotype 4 and Three Genotype 3 Hepatitis E Viruses in Fecal Samples from Domestic Swine in Japan. *Open Vet Sci J* **4**, 11–19.

Wang, H., Zhang, W., Ni, B., Shen, H., Song, Y., Wang, X., Shao, S., Hua, X. & Cui, L. (2010). Recombination analysis reveals a double recombination event in hepatitis E virus. *Viol J* **7**, 129.

- Wedemeyer, H., Pischke, S. & Manns, M. P. (2012).** Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* **142**, 1388–1397.
- Williams, T. P. E., Kasorndorkbua, C., Halbur, P. G., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2001).** Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model. *Society* **39**, 3040–3046.
- Withers, M. R., Correa, M. T., Morrow, M., Stebbins, M. E., Seriwatana, J., Webster, W. D., Boak, M. B. & Vaughn, D. W. (2002).** Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg* **66**, 384–388.
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y. & Okamoto, H. (2003).** Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* **84**, 2351–2357.
- Yoo, D., Willson, P., Pei, Y., Hayes, M. A., Deckert, A., Dewey, C. E., Friendship, R. M., Yoon, Y., Gottschalk, M. & other authors. (2001).** Prevalence of Hepatitis E Virus Antibodies in Canadian Swine Herds and Identification of a Novel Variant of Swine Hepatitis E Virus. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 1213–1219.
- Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Kumar, R., Panda, S. K. & Jameel, S. (1999).** Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol* **73**, 4074–4082.
- Zhang, J., Li, S. W., Wu, T., Zhao, Q., Ng, M. H. & Xia, N. S. (2012).** Hepatitis E virus: Neutralizing sites, diagnosis, and protective immunity. *Rev Med Virol* **22**, 339–349.

5. CAPITULO 1.

Evidencia serológica de infección por el Virus de Hepatitis E en cerdos faenados en Antioquia, Colombia

Serological evidence of Hepatitis E Virus infection in Antioquia, Colombia slaughtered pigs

Jorge E. Forero D^{1,2} PhD(c), Cristian Gutiérrez¹ PhD(c), Jaime Parra S¹ Ph.D,
Guillermo Correa L¹ Ph.D, Berardo Rodríguez² Ph.D, Lina A Gutiérrez B³, Albeiro
López-Herrera¹ Ph.D.

1 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias.
Departamento de Producción Animal, Grupo Biodiversidad y Genética Molecular
BIOGEM. Calle 59A No.63-020, Autopista Norte, Bloque 50, Piso 3, Oficina 310.
Medellín, Colombia.

2 Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Laboratorio de
Patología Animal, Grupo de Investigación en Patobiología QUIRON, Carrera 75
No. 65-87, Bloque 47-134. Medellín, Colombia.

3 Universidad Pontificia Bolivariana, Facultad de Medicina, Escuela de Ciencias de
la Salud, Grupo Biología de Sistemas, Calle 78B N°72A-109, Medellín, Colombia.

*Correspondencia: jforeroduarte@gmail.com

RESUMEN

El Virus de la hepatitis E es un virus zoonótico que está tomando relevancia mundial por su impacto creciente en la salud pública. En Colombia se desconoce la prevalencia en el ganado porcino a pesar de que se ha reportado evidencia serológica en humanos. El objetivo de esta investigación fue determinar la evidencia serológica de la infección por HEV en cerdos faenados en Antioquia, departamento donde se produce y consume la mayor cantidad de carne de cerdo en Colombia. Para esto, entre septiembre de 2011 y mayo de 2012, se obtuvieron muestras de sangre de cerdos en cinco plantas de faenado, cuatro de ellas ubicadas en el Valle de Aburrá y una en la subregión Norte del departamento de Antioquia, las cuales fueron evaluadas mediante un estuche comercial de ELISA para el diagnóstico de HEV en humanos y fue adaptado para la detección de anticuerpos tipo IgG e IgM en cerdos. Se encontró una seropositividad de 100.0% para anticuerpos tipo IgG en 1000 muestras evaluadas y de 82.06% para anticuerpos tipo IgM en 740 muestras. Estos resultados indican que todos los cerdos en edad de faenado en Antioquia, han estado expuestos al virus en algún momento de su proceso productivo y que además una alta proporción de estos puede tener infección reciente. Es importante generar nuevas investigaciones que conduzcan caracterizar la dinámica epidemiológica de la infección por HEV en humanos y porcinos, para implementar las medidas necesarias en salud animal y salud pública que sirvan para mantener el control de la infección en el país.

Palabras clave: Anticuerpos IgM e IgG ELISA, Hepevirus, cerdos, zoonosis.

ABSTRACT

The hepatitis E virus is a zoonotic virus is taking global relevance for its growing impact on public health. In Colombia the prevalence is unknown in pigs although

serological evidence has been reported in humans. The objective of this research was to determine the serological evidence of HEV infection in pigs slaughtered in Antioquia department with the largest production and consumption of pork in Colombia. For this, between September 2011 and May 2012, blood samples from pigs were obtained in five slaughterhouses, four of them located in the Aburrá Valley and one located in the northern subregion of the department of Antioquia, which were evaluated by a commercial ELISA kit for the diagnosis of human HEV and was adapted for the detection of IgG and IgM antibodies in pigs. 100.0% seropositivity for IgG antibody samples assessed in 1000 and 82.06% for IgM antibodies were found in 740 samples. These results indicate that all age slaughtered pigs in Antioquia, have been exposed to the virus at some point in the production process and also a high proportion of these may have recent infection. It is important to generate new research leading characterize the epidemiological dynamics of HEV infection in humans and pigs, to implement the necessary measures in animal and public health that serve to maintain control of infection in the country.

Key words: IgG and IgM antibodies, ELISA, Hepevirus, pigs zoonosis.

5.1 INTRODUCCIÓN

La Hepatitis E es una enfermedad hepática aguda en humanos causada por el Virus de la Hepatitis E (HEV). Aunque este tipo de hepatitis presenta una distribución global, en algunos países de África y Asia se presentan brotes epidémicos asociados a contaminación de fuentes de aguas para consumo, mientras que en otras regiones como Europa y Estados Unidos se presentan brotes esporádicos asociados al consumo de alimentos crudos o mal cocidos (Aggarwal, 2013; Meng, 2013). Se estima que en el mundo cada año hay 20 millones de infecciones en humanos, cerca de tres millones de casos de hepatitis aguda y 57.000 muertes relacionadas a la Hepatitis E (Aggarwal, 2013; Kamar *et al.*, 2014; Meng, 2010; Rein *et al.*, 2012). La mayoría de las veces la enfermedad es auto limitada en el humano; sin embargo, puede llegar a ser extremadamente grave en mujeres embarazadas, con una mortalidad para esta población que puede superar el 20% (Kumar *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2005).

Se reconocen cuatro principales genotipos de HEV en mamíferos. Los genotipos 1 y 2 están restringidos a los humanos mientras que los genotipos 3 y 4 pueden infectar, además de humanos otras especies, principalmente el cerdo (Johne *et al.*, 2014; Teshale & Hu, 2011). El genotipo 1 se ha encontrado principalmente en India, mientras que el genotipo 2 se ha detectado en varios países de África y también en México. El genotipo 3 presenta una distribución mundial, mientras que el genotipo 4 se encuentra frecuentemente en países asiáticos como China y Japón (Aggarwal & Naik, 2009; Kumar *et al.*, 2013)

En Latinoamérica, la primera evidencia serológica del virus en humanos se encontró en Venezuela en 1994 (Pujol *et al.*, 1994); posteriormente en otras investigaciones sobre seroprevalencia de HEV en países de la región, se encontraron porcentajes variables en las distintas poblaciones humanas estudiadas, los cuales no superan el 20% (Echevarría *et al.*, 2013).

Adicionalmente, el genoma viral se ha detectado en humanos en Argentina, Brasil, Bolivia y Uruguay (Dell'Amico *et al.*, 2011; Mirazo *et al.*, 2013; Munné *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2009), donde se ha podido identificar el genotipo 3; no obstante, en Venezuela y Argentina se ha encontrado el genotipo 1 (Gutiérrez *et al.*, 2012; Mirazo *et al.*, 2014).

La alta identidad genética entre los genotipos detectados en cerdos y humanos (Ma *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012) y la infección experimental con los genotipos de cerdos en primates no humanos han establecido al cerdo como un reservorio para la transmisión zoonótica del virus (Meng, 2013).

Los estudios serológicos en cerdos, muestran una amplia distribución del virus en las piaras del mundo. En USA las granjas positivas alcanzan el 41% (Dong *et al.*, 2011), el 90% en Nueva Zelanda (Garkavenko *et al.*, 2001), el 100% en México (Cooper *et al.*, 2005) y el 98% en España (Seminati *et al.*, 2008). Los estudios realizados en Latinoamérica han reportado la circulación de HEV en cerdos de Argentina (Meng, 2013; Munné *et al.*, 2006, 2014), Brasil (Paiva *et al.*, 2007), Chile (Ibarra *et al.*, 1997), Costa Rica (Kase *et al.*, 2008) y México (Cooper *et al.*, 2005).

La producción porcina es parte importante del sector pecuario de Colombia, con un impacto positivo sobre la economía, no solo por favorecer al sector pecuario, sino por constituirse en una fuente de empleo en el País (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural *et al.*, 2012). Antioquia es el departamento colombiano con mayor producción y consumo de carne de cerdo, pues aporta aproximadamente el 45% de la producción total del País (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural *et al.*, 2012).

La Hepatitis E es una zoonosis considerada como un problema de salud pública mundial; donde el cerdo es su principal reservorio sin embargo, en Colombia, salvo algunos esfuerzos aislados por entender su epidemiología en humanos, no se han realizado trabajos para establecer el estatus serológico para HEV en los cerdos que se crían en el país, por esta razón el objetivo del presente trabajo fue

determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM en cerdos beneficiados en plantas de faenado del departamento de Antioquia.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Aspectos éticos.

Este estudio fue realizado de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Acta CEMED-226, del 14 de octubre de 2011).

5.2.2. Muestreo y tamaño de muestra.

El muestreo se realizó en los cerdos beneficiados entre septiembre de 2011 y mayo de 2012, en cinco plantas de faenado, cuatro de ellas ubicadas en el Valle de Aburrá y una en la subregión Norte del departamento de Antioquia, las cuales se identificaron en el presente estudio con letras de la A a la E, con el fin de guardar confidencialidad. Las plantas seleccionadas reciben la mayor parte de la producción de cerdos de Antioquia. El número promedio de animales beneficiados por día durante los seis meses previos al inicio del estudio fue de 450, 200, 400, 800 y 400 porcinos para las plantas A, B, C, D y E, respectivamente.

Tomando como base el tamaño muestral requerido para estimar la seropositividad en las regiones de Antioquia que benefician cerdos en estas plantas, con un nivel de confianza del 95% y un error máximo de 3%, se evaluaron en total 1000 muestras, con afijación por planta proporcional al promedio diario de beneficio de los últimos seis meses. Dentro de cada planta, se empleó un muestreo por cuotas, donde cada cuota se calculó proporcionalmente al número de animales beneficiados por subregión de procedencia. En cada planta, los cerdos fueron seleccionados de manera sistemática con inicio aleatorio.

Los animales incluidos en el muestreo fueron identificados por lugar de procedencia, clasificados como sanos y aprobados para beneficio y posterior

comercialización, según el proceso de inspección sanitaria pre y postmórtem realizado por los médicos veterinarios responsables de cada planta de beneficio.

5.2.3. Muestras de suero.

Las muestras de sangre de los cerdos fueron obtenidas en la línea de faenado posteriormente a la insensibilización del animal, en el momento de la exanguinación. Se tomaron aproximadamente 10 ml de sangre por animal en tubos estériles de 15 ml. Las muestras se almacenaron a 4°C para su transporte al laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, donde fueron centrifugadas inmediatamente a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, para la obtención del suero, el cual fue almacenado a -20°C hasta su análisis.

5.2.4. Análisis inmunoenzimático (ELISA indirecto) para detección de anticuerpos IgG e IgM específicos contra HEV.

Para la detección de anticuerpos tipo IgG contra HEV en cerdos, se empleó el kit comercial de ELISA indirecto HEV-IgAB (Dia.Pro-DiagnosticBioprobes, Italia) para la detección dual de anticuerpos tipo IgG e IgM en suero humano, en el cual se remplazó el conjugado anti-humano del estuche, por un anticuerpo conjugado de cabra anti-IgG de cerdo (Thermo Fisher ScientificInc, USA) a la dilución recomendada por el fabricante (1:5000), acorde a la metodología usada por otros investigadores (Paiva *et al.*, 2007).

Como control negativo porcino (CNP) se utilizó (por triplicado) un suero de lechón recién nacido que no ingirió calostro para evitar la presencia de anticuerpos maternos; y como control positivo porcino (CPP) se empleó una muestra del estudio que mostró altos valores de DO en la ELISA. En cada uno de los platos en los que se evaluaron sueros porcinos y para efectos de control de calidad interno de cada ensayo, se incluyeron los controles recomendados y proporcionados por

el fabricante: un control negativo (CN), un control positivo (CP) y dos calibradores (C) evaluados con el conjugado anti-humano del estuche.

Para la detección de anticuerpos tipo IgM contra HEV en cerdos, se empleó la misma estrategia anterior, pero usando un estuche comercial de ELISA indirecto HEV-IgM (Dia.Pro-DiagnosticBioprobes, Italia) remplazando el conjugado anti-IgM humano por un anticuerpo conjugado de cabra anti-IgM de cerdo (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) en una dilución 1:5000 recomendada por el fabricante. Se utilizó como CNP una muestra de suero lechón recién nacido con las características antes mencionadas y como CPP una muestra de suero de un cerdo al que previamente se le detectó excreción en heces mediante RT PCR para la región ORF1 de HEV. Para efectos de control de calidad interno de cada ensayo, se incluyeron los controles recomendados y proporcionados por el fabricante: tres CN y un CP evaluados con el conjugado anti-humano del estuche.

Las microplacas de los estuches utilizados en el presente estudio, estaban recubiertas con antígenos sintéticos específicos de HEV derivados de las regiones ORF2 y ORF3 de los 4 genotipos según lo descrito por el fabricante. Las lecturas de DO fueron obtenidas en un lector de ELISA (Biotek, USA) con un filtro a 450 nm.

5.2.5. Estandarización de la prueba de ELISA indirecta modificada para la detección de anticuerpos tipo IgG e IgM.

Para asegurar el funcionamiento adecuado de los inmunoensayos modificados con los conjugados anti-cerdo, se evaluó inicialmente una muestra de suero de cerdo positivo para IgG anti-HEV caracterizada y evaluada en un estudio previo (Munné *et al.*, 2006), gentilmente donada por la Dra. Munné (Laboratorio Nacional de Referencia para las hepatitis virales INEI ANLIS “Carlos Malbrán” de Argentina). Este suero fue positivo con el punto de corte seleccionado en este proyecto, pero los ensayos preliminares indicaron que la lectura de Densidad Óptica a 450 nm (DO_{450}) para el suero positivo argentino fue dos veces menor que las DO_{450} de algunas muestras colombianas (datos no mostrados), por esta

razón, y debido a que el volumen del suero positivo donado era insuficiente para ser usado como control positivo en todos los ensayos, se utilizaron los CPP y CNP descritos anteriormente.

La repetitividad de los ensayos de ELISA modificada anti-IgG e IgM de cerdo, se realizaron seis ensayos consecutivos en días diferentes, con dos operarios distintos y bajo las mismas condiciones de laboratorio, un Coeficiente de Variación (CV) menor del 20% en los valores brutos de absorbancia, se consideró adecuado para aceptar la repetitividad de la prueba (Ver Datos Suplementarios).

5.2.6. Estimación del valor de corte para la positividad de anticuerpos tipo IgG e IgM.

La obtención del punto de corte para la positividad de anticuerpos tipo IgG e IgM se realizó con base en la desigualdad de Chebyshev (Chernick, 2011), la cual establece que cualquiera que sea la distribución probabilística de una variable aleatoria, no más de $(1/k^2)$ % de los valores de dicha distribución se encontrarán a más de k desviaciones estándar de la media. Para controlar la probabilidad de falsos positivos, se fijó en 0.0102 la probabilidad máxima tolerable, lo cual corresponde a punto de corte dado por el valor medio de las lecturas de los controles negativos más 7 desviaciones estándar. Usando este criterio los puntos de corte fueron 0.220 y 0.545 para IgG e IgM respectivamente.

5.2.7. Métodos estadísticos.

Para el análisis de seropositividad de HEV en cerdos en las plantas de beneficio y según la subregión geográfica, se estimaron las frecuencias de los datos, los intervalos de confianza (con un nivel de confianza del 95%) y las diferencias entre proporciones (con base en la prueba exacta de Fisher), con un nivel de confianza del 95%; se consideran significativos valores de $p < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados usando las herramientas del programa GraphPadPrisma 5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Distribución de Frecuencia de anticuerpos específicos para HEV en suero de cerdos de Antioquia.

En la figura 5.1 se muestra la distribución de frecuencias para los anticuerpos IgG e IgM de los cerdos muestreados en el estudio, con sus respectivos puntos de corte que reflejan la positividad encontrada en las plantas de beneficio.

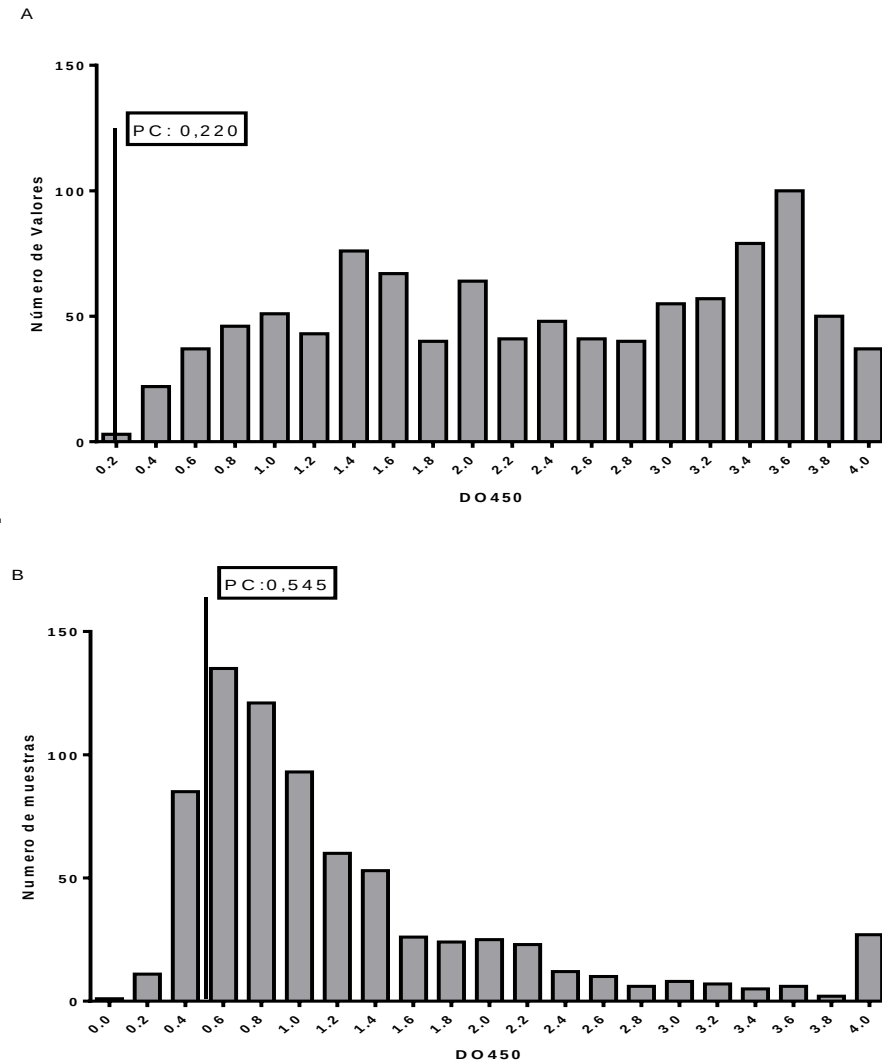


Figura 5.1. Distribución de frecuencias de las DO₄₅₀ para la detección de anticuerpos en cerdos muestreados.

A: Distribución de 1000 muestras de suero de cerdos evaluados para IgG, con punto de corte (PC) en 0,220. **B:** Distribución de 775 muestras de suero de cerdos evaluadas para IgM, con punto de corte (PC) en 0.545.

La frecuencia de positividad encontrada en los sueros de los porcinos muestreados en las plantas de beneficio de Antioquia, con los puntos de corte estimados en el estudio para la detección de anticuerpos IgG e IgM fue de 100% y 82.06%, respectivamente.

5.3.2. Seropositividad para anticuerpos IgM anti-HEV según la Planta de Beneficio

La positividad para IgM en cada planta de beneficio presentó valores que oscilaron entre 74.49% y 87.98% (Tabla 5.1), cuando se comparó la positividad por pares de plantas se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre la planta A con las plantas B y E (valores $p=0.0067$ y $p=0.0042$ respectivamente), y no hubo diferencia de la planta A con las C y D.

Tabla 5.1. Seropositividad para anticuerpos IgM anti-HEV según la Planta de Beneficio.

Planta	N(+)	% Positividad	IC
A	183(161)	87.98	92.31-82.37
B	98(73)	74.49	82.76-64.69
C	149(124)	83.22	88.84-76.24
D	188(159)	84.57	89.42-78.60
E	157(125)	75.78	82.27-68.32
Total	775(636)	82.06	84.70-79.18

N: Número de animales muestreados. (+) Número de animales positivos. IC: intervalos de confianza del 95% para la proporción de animales positivos.

5.3.3. Seropositividad para anticuerpos IgM anti-HEV según la región de procedencia.

Según los datos obtenidos de la procedencia de los cerdos, se identificó que los animales muestreados provenían de 6 de las 9 subregiones del departamento de Antioquia (Figura 5.2). La frecuencia de cerdos positivos y los intervalos de confianza para la detección de anticuerpos IgM anti HEV según las subregiones se muestran en la Tabla 5.2. El porcentaje de cerdos positivos para IgM fluctuó entre 77.78% para la subregión Occidente y 88.89% para la subregión Nordeste (Figura 5.2, pero no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las

regiones analizadas.

Tabla 5.2. Seropositividad para anticuerpos IgM anti-HEV según la región de procedencia.

Subregión	N(+)	%	IC
Valle de Aburra	165(132)	80.00	85.81-73.08
Norte	405(336)	82.96	86.50-78.94
Occidente	54(42)	77.78	87.96-64.40
Suroeste	84(71)	84.52	91.49-74.99
Oriente	49(39)	79.59	89.76-65.66
Nordeste	18(16)	88.89	98.62-65.29
Total	775(636)	82.06	84.70-79.18

N: Número de animales muestreados. (+) Número de animales positivos. IC: intervalos de confianza del 95% para la proporción de animales positivos.

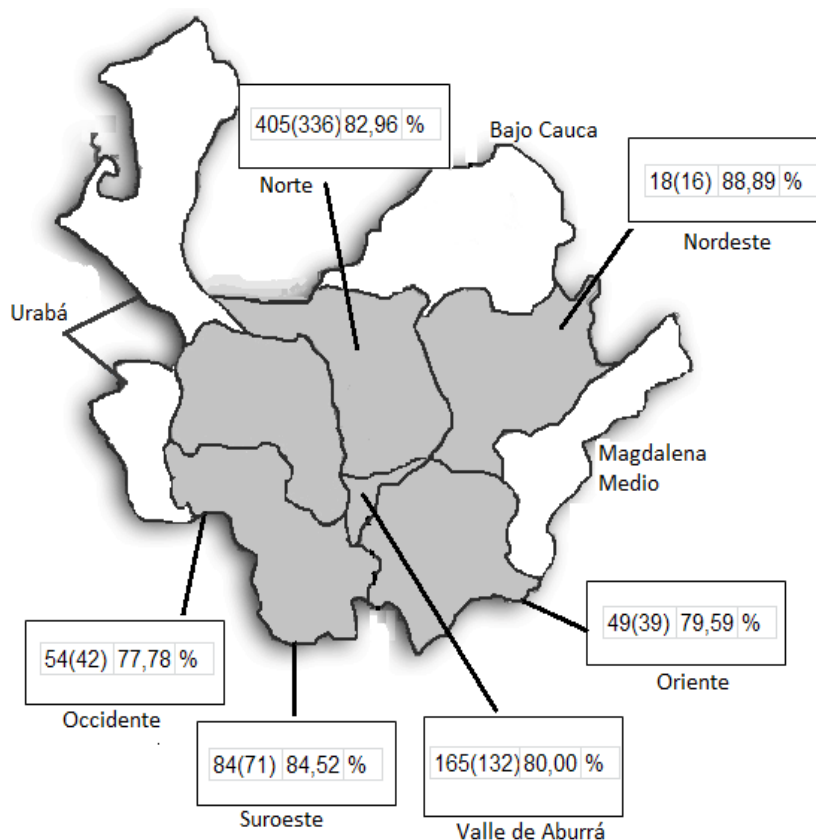


Figura 5.2. Seroprevalencia para IgM en cerdos en edad de beneficio en Antioquia (Colombia).

Resaltados en gris se indican las subregiones de procedencia de los cerdos muestreados. Sobre el nombre cada subregión se indicada el número de cerdos obtenidos seguido, entre paréntesis, del número de cerdos positivos y el porcentaje de positividad para IgM.

5.4. DISCUSIÓN

Los estudios de infección natural en cerdos a nivel mundial muestran que estos se infectan después que han disminuido los títulos de anticuerpos maternos tipo IgG, entre las semana 8-10 de vida; luego seroconvierten aproximadamente entre las semana 14 a 17 semanas (Meng *et al.*, 1997; Seminati *et al.*, 2008), sin embargo, los anticuerpos propios tipo IgG pueden ser detectados en una proporción alta de los cerdos en la edad de beneficio (de Deus *et al.*, 2008) que es aproximadamente 22 semanas de vida en la porcicultura de Antioquia (Díaz *et al.*, 2011).

La detección de anticuerpos tipo IgG en cerdos en edad de beneficio tomadas en las plantas de faenado alrededor del mundo es variable, por ejemplo se han reportado prevalencias del 31% (1069/6565) en Francia (Rose *et al.*, 2011), 29.0% (51/175) en Escocia (Crossan *et al.*, 2014), 59.5% en Canadá (Yoo *et al.*, 2001), 71.2% (178/275), en Madagascar (Temmam *et al.*, 2013), China 79.4% (127/162) (Li *et al.*, 2009) 87%(40/46) en Italia (Di Bartolo *et al.*, 2011).

Los resultados para la frecuencia de cerdos positivos a IgG anti-HEV en cerdos faenados en Antioquia y muestreados en este estudio están claramente por encima de los reportados en otras partes del mundo e indican que todos los animales que llegaron a las plantas de faenado de Antioquia en el periodo de estudio estuvieron expuestos al HEV en algún momento en el proceso de producción.

Se desconoce la razón por la cual la proporción de cerdos seropositivos para IgG en edad de beneficio fue alta, sin embargo, podría estar relacionada a una alta circulación del virus entre los cerdos estudiados (Seminati *et al.*, 2008), a las

condiciones de cría como mezcla de edades en las granjas atendidas por el mismo operario, la alta densidad de animales en los corrales que pueden incrementar el riesgo de presentar anticuerpos a la edad de sacrificio, (Walachowski *et al.*, 2014), además el transporte y reagrupación de animales de diferentes granjas en corrales de ceba, entre otras.

Los anticuerpos IgM anti HEV, como en muchas enfermedades virales, sugieren infección reciente y por lo general en los cerdos infectados naturalmente por el HEV, aparecen dos semanas antes de la presentación de anticuerpos propios tipo IgG y disminuyen 4 a 7 semanas después de la infección, es decir, que entre las semanas 15-17 de vida hay una gran proporción de animales positivos para IgM pero en la edad de sacrificio esta proporción suele disminuir (de Deus *et al.*, 2008). A pesar de esto, es posible encontrar animales con anticuerpos tipo IgM anti-HEV en la edad de beneficio que en cerdos de algunas piaras puede alcanzar hasta el 100% de positividad (Casas *et al.*, 2011; Seminati *et al.*, 2008).

En la literatura mundial solamente hay disponibles dos estudios donde reportan la prevalencia de anticuerpos tipo IgM obtenidos al momento de beneficio en plantas de faenado. En el primero realizado cuatro plantas de beneficio en Bavaria (Alemania), se obtuvieron 516 muestras de suero de las cuales 36 (7%) fueron positivas (Wacheck *et al.*, 2012). En el segundo, de 176 muestras obtenidas un programa de vigilancia e investigación de la industria porcícola de Escocia, se reportaron 65 positivas (29%) (Crossan *et al.*, 2014). Mientras que para el presente estudio se encontró 82.2 % de positividad en los animales evaluados.

Al Igual que para IgG, la diferencia en estas prevalencias puede estar relacionada con la relativa baja densidad de animales por corral con la que se suele criar los cerdos en otros países lo cual reduce la presión de infección dentro de la piara (Bouwknegt *et al.*, 2008; Rose *et al.*, 2011). También se ha reportado que las granjas dedicadas a la etapa de finalización tienen más probabilidad de tener animales positivos a IgG (Rose *et al.*, 2011).

En este estudio no fue posible obtener información sobre los factores de manejo al que los cerdos estudiados estuvieron sometidos y quizá la diferencia observada en las plantas estudiadas podría estar relacionada con el flujo de animales procedentes de las subregiones con mayor positividad, pues es improbable que haya un aumento en el porcentaje de cerdos IgM positivos por la permanencia tan corta de los cerdos en cada planta antes del beneficio.

No existe una prueba de oro para la detección del HEV ni en humanos ni en cerdos, varios estudios han reportado que la variación en las prevalencias puede estar asociada al sistema de detección de anticuerpos en términos de los tipos antígeno y anticuerpo utilizado (Baechlein *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Pezzoni *et al.*, 2014), los cuales pueden influir en el resultado. Por esta razón los resultados de los estudios de seroprevalencia hasta el presente, incluyendo este, deben analizarse con precaución.

La carne de cerdo y en particular los hígados hacen parte importante de la dieta en algunos sectores de la población colombiana. El alto porcentaje de infección reciente en los cerdos en las plantas de beneficio sugiere que los hígados comercializados en Antioquia podrían estar contaminados con el virus, por lo que es recomendable tomar la precaución de consumirlos luego de un buen proceso de cocción, pues se ha demostrado que el virus se inactiva a temperaturas por encima de 70°C durante 10 minutos (Feagins *et al.*, 2008; Yunoki *et al.*, 2008).

La alta seropositividad de anticuerpos tipo IgG e IgM encontrados en este estudio indica que el virus está circulando en las producciones porcinas del departamento de Antioquia y que una proporción considerable de los animales en edad de sacrificio podrían estar excretando virus al ambiente, lo cual debe motivar la atención de la comunidad científica para realizar estudios sobre la dinámica de dispersión del virus en el país y alertar a las autoridades sanitarias para implementar medidas de vigilancia y control que permitan evitar la transmisión del HEV entre las producciones porcinas del país.

Esta es la primera evidencia serológica de la presencia de HEV en cerdos en edad de beneficio en Colombia, por lo que debe motivar a la comunidad científica del país a continuar los estudios para caracterizar la infección de este virus no solo en producciones porcinas de otras regiones colombianas sino también en aspectos relevantes en la dinámica de infección del HEV en el país.

BIBLIOGRFIA

- Aggarwal, R. (2013).** Hepatitis E: Epidemiology and Natural History. *J Clin Exp Hepatol* **3**, 125–133.
- Aggarwal, R. & Naik, S. (2009).** Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 1484–1493.
- Baechlein, C., Schielke, A., Johne, R., Ulrich, R. G., Baumgaertner, W. & Grummer, B. (2010).** Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet Microbiol* **144**, 187–191. Elsevier B.V.
- Di Bartolo, I., Ponterio, E., Castellini, L., Ostanello, F. & Ruggeri, F. M. (2011).** Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol* **149**, 330–338.
- Bouwknegt, M., Frankena, K., Rutjes, S. A., Wellenberg, G. J., Husman, A. M. D. R., Poel, W. H. M. Van Der & Jong, M. C. M. De. (2008).** Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res*.
- Casas, M., Cortés, R., Pina, S., Peralta, B., Allepuz, A., Cortey, M., Casal, J. & Martín, M. (2011).** Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet Microbiol* **148**, 27–34.
- Chen, X., Zhang, Q., He, C., Zhang, L., Li, J., Zhang, W., Cao, W., Lv, Y. G., Liu, Z. & other authors. (2012).** Recombination and natural selection in hepatitis E virus genotypes. *J Med Virol* **84**, 1396–1407.
- Chernick, M. R. (2011).** *The Essentials of Biostatistics for Physicians, Nurses, and Clinicians*, 1st edn. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Cooper, K., Huang, F. F., Batista, L., Rayo, C. D., Bezanilla, J. C., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2005).** Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol* **43**, 1684–1688.
- Crossan, C., Grierson, S., Thomson, J., Ward, A., Nunez-Garcia, J., Banks, M. & Scobie, L. (2014).** Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiol Infect* 1–4.
- Dell'Amico, M. C., Cavallo, A., Gonzales, J. L., Bonelli, S. I., Valda, Y., Pieri, A., Segundo, H., Ibañez, R., Mantella, A. & other authors. (2011).** Hepatitis

E virus genotype 3 in humans and swine, Bolivia. *Emerg Infect Dis* **17**, 1488–1490.

De Deus, N., Casas, M., Peralta, B., Nofrarias, M., Pina, S., Martín, M. & Segalés, J. (2008). Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* **132**, 19–28.

Díaz, C. A., Rodriguez, M. N., Vera, V. J., Ramírez, G., Casas, G. A. & Mogollón, J. D. (2011). Characterization of pig farms in the main swine producing regions of Colombia. *Rev Colomb Ciencias Pecu* **24**, 131–144.

Dong, C., Meng, J., Dai, X., Liang, J.-H., Feagins, a. R., Meng, X.-J., Belfiore, N. M., Bradford, C., Corn, J. L. & other authors. (2011). Restricted Enzooticity of Hepatitis E Virus Genotypes 1 to 4 in the United States. *J Clin Microbiol* **49**, 4164–4172.

Echevarría, J. M., González, J. E., Lewis-Ximenez, L. L., Dos Santos, D. R. L., Munné, M. S., Pinto, M. A., Pujol, F. H. & Rodríguez-Lay, L. A. (2013). Hepatitis E virus infection in Latin America: A review. *J Med Virol* **85**, 1037–1045.

Feagins, A. R., Opriessnig, T., Guenette, D. K., Halbur, P. G. & Meng, X. J. (2008). Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol* **123**, 32–37.

Garkavenko, O., Obriadina, A., Meng, J., Anderson, D. a, Benard, H. J., Schroeder, B. a, Khudyakov, Y. E., Fields, H. a & Croxson, M. C. (2001). Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* **65**, 525–529.

Gutiérrez, C., Sanchez, D., Montalvo, M. C., Pujol, F. H., Rodriguez, L. A., Pinto, B., Chacon, E. P. & Guzman, M. G. (2012). Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. *J Med Virol* **84**, 1025–1029.

Ibarra, H., Riedemann, S., Reinhardt, G., Frieck, P., Siegel, F., Toledo, C., Calvo, M. & Froösner, G. (1997). [Prevalence of hepatitis E virus antibodies in blood donors and other population groups in southern Chile]. *Rev Med Chil* **125**, 275—278.

Johne, R., Dremsek, P., Reetz, J., Heckel, G., Hess, M. & Ulrich, R. G. (2014). Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol* **27**, 212–229.

- Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F. & Izopet, J. (2014).** Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev* **27**, 116–138.
- Kase, J. A., Correa, M. T., Luna, C. & Sobsey, M. D. (2008).** Isolation, detection and characterization of swine hepatitis E virus from herds in Costa Rica. *Int J Environ Health Res* **18**, 165–176. England.
- Kumar, S., Subhadra, S., Singh, B. & Panda, B. K. (2013).** Hepatitis E virus: The current scenario. *Int J Infect Dis* **17**, 228–233.
- Li, W., She, R., Wei, H., Zhao, J., Wang, Y., Sun, Q., Zhang, Y., Wang, D. & Li, R. (2009).** Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. *Vet Microbiol* **133**, 75–83.
- Ma, H., Geng, Y., Li, Z., Harrison, T. J., Huang, W., Zhao, C. & Wang, Y. (2013).** Analysis of the complete genome sequences of one swine and two human hepatitis E virus genotype 4 strains isolated in Beijing, China. *Infect Genet Evol* **18**, 42–7. Elsevier B.V.
- Meng, X. J. (2010).** Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* **140**, 256–265.
- Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J. & Emerson, S. U. (1997).** A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9860–9865.
- Meng, X.-J. (2013).** Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* **33**, 41–49.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, DANE & SIPSA. (2012).** La carne de cerdo en el mundo. *Boletín Mens INSUMOS Y FACTORES Prod* 1–5.
- Mirazo, S., Mainardi, V., Ramos, N., Gerona, S., Rocca, A. & J, A. (2014).** Indigenous Hepatitis E Virus Genotype 1. *Emerg Infect Dis* **20**, 171–173.
- Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C. & Arbiza, J. (2013).** Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res* **173**, 364–370.
- Munné, M. S., Altabert, N. R., M, L. O. O., Vladimirovsky, S. N., Moreira, R., María, P., Espul, C., Manzur, A., Soto, S. S. & other authors. (2014).** Updating the knowledge of hepatitis E : new variants and higher prevalence of anti-HEV in Argentina. *Ann Hepatol* **13**, 496–502.

- Munné, M. S., Vladimirovsky, S., Otegui, L., Castro, R., Brajterman, L., Soto, S., Guarnera, E., Molina, V., Monfellano, M. & other authors. (2006).** Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol* **78**, 1579–1583.
- Paiva, H. H., Tzaneva, V., Haddad, R. & Yokosawa, J. (2007).** Molecular characterization of swine hepatitis E virus from Southeastern Brazil. *Brazilian J Microbiol* **38**, 693–698.
- Pal, R., Aggarwal, R., Naik, S. R., Das, V., Das, S. & Naik, S. (2005).** Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol* **20**, 1094–101.
- Pezzoni, G., Caminiti, A., Stercoli, L., Grazioli, S., Galletti, G., Santi, A., Tamba, M. & Brocchi, E. (2014).** Comparison of three in-house ELISAs for the detection of hepatitis E virus infection in pigs under field conditions. *J Virol Methods* **207**, 95–103.
- Pujol, F. H., Favorov, M. O., Marcano, T., Esté, J. A., Magris, M., Liprandi, F., Khudyakov, Y. E., Khudyakova, N. S. & Fields, H. A. (1994).** Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. *J Med Virol* **42**, 234–236.
- Rein, D. B., Stevens, G. a., Theaker, J., Wittenborn, J. S. & Wiersma, S. T. (2012).** The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology* **55**, 988–997.
- Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., Madec, F. & Pavio, N. (2011).** High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **34**, 419–427.
- Dos Santos, D. R. L., Vitral, C. L., de Paula, V. S., Marchevsky, R. S., Lopes, J. F., Gaspar, A. M. C., Saddi, T. M., Júnior, N. C. D. M., Guimarães, F. D. R. & other authors. (2009).** Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J* **182**, 474–80.
- Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N. & Martin, M. (2008).** Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* **175**, 130–132.
- Temmam, S., Besnard, L., Andriamandimby, S. F., Foray, C., Rasamoelina-Andriamanivo, H., Héraud, J.-M., Cardinale, E., Dellagi, K., Pavio, N. & other authors. (2013).** High prevalence of hepatitis E in humans and pigs and

evidence of genotype-3 virus in swine, Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* **88**, 329–338.

Teshale, E. H. & Hu, D. J. (2011). Hepatitis E: Epidemiology and prevention. *World J Hepatol* **3**, 285–291.

Wacheck, S., Werres, C., Mohn, U., Dorn, S., Soutschek, E., Fredriksson-Ahomaa, M. & Märklbauer, E. (2012). Detection of IgM and IgG Against Hepatitis E Virus in Serum and Meat Juice Samples from Pigs at Slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog Dis* **9**, 655–660.

Walachowski, S., Dorenlor, V., Lefevre, J., Lunazzi, A., Eono, F., Merbah, T., Eveno, E., Pavio, N. & Rose, N. (2014). Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France. *Epidemiol Infect* **142**, 1934–1944.

Wang, H., He, Y., Shen, Q., Wang, X., Yang, S., Cui, L., Ren, L., Sun, G., Hua, X. & other authors. (2012). Complete Genome Sequence of the Genotype 4 Hepatitis E Virus Strain Prevalent in Swine in Jiangsu Province, China, Reveals a Close Relationship with That from the Human Population in This Area. *J Virol* **86**, 8334–8335.

Yoo, D., Willson, P., Pei, Y., Hayes, M. A., Deckert, A., Dewey, C. E., Friendship, R. M., Yoon, Y., Gottschalk, M. & other authors. (2001). Prevalence of Hepatitis E Virus Antibodies in Canadian Swine Herds and Identification of a Novel Variant of Swine Hepatitis E Virus. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 1213–1219.

Yunoki, M., Yamamoto, S., Tanaka, H., Nishigaki, H., Tanaka, Y., Nishida, A., Adan-Kubo, J., Tsujikawa, M., Hattori, S. & other authors. (2008). Extent of hepatitis E virus elimination is affected by stabilizers present in plasma products and pore size of nanofilters. *Vox Sang* **95**, 94–100.

DATOS SUPLEMENTARIOS

DS5.1. Repetitividad y consistencia de las pruebas de ELISA indirecta modificadas para la detección de anticuerpos tipo IgG e IgM.

El análisis de repetitividad se basó en la evaluación de las dispersiones de los resultados de las DO obtenidas mediante el CV, la desviación estándar (DE) y el error estándar (EE). Las gráficas de control de Levey Jennings fueron construidas a partir de los datos de DO utilizando el programa de Excel (Microsoft office 2007).

Una vez determinada las diluciones óptimas de conjugado y de las muestras para el ensayo, se procedió a evaluar la repetitividad de la prueba mediante la evaluación del CPP en 6 ensayos independientes con dos operarios distintos. Los valores obtenidos del CV para el CPP fueron de 3.86% y 18.88% para IgG e IgM respectivamente (**Tabla DS5.1**). El CV para los CNP no tiene relevancia para la evaluación de la repetitividad de la prueba, puesto que el CV al ser un coeficiente inversamente proporcional a la media aritmética, cuando está toma valores cercanos a cero, el coeficiente tenderá a infinito.

Tabla DS5.1. Repetitividad de los ensayos de ELISA indirecta con conjugado anti-IgG Cerdo y anti-IgM Cerdo

DO ₄₅₀ Conjugado anti IgG cerdo*			DO ₄₅₀ Conjugado anti IgM cerdo*	
No	CNP	CPP	CNP	CPP
1 ^a	0.035	3.351	0.228	1.378
2 ^b	0.021	3.196	0.202	0.832
3 ^a	0.070	3.466	0.147	0.918
4 ^b	0.036	3.170	0.144	1.050
5 ^b	0.075	3.444	0.14	1.165
6 ^b	0.078	3.421	0.151	1.265
X	0.051	3.346	0.1687	1.101
DE	0.023	0.118	0.037	0.2079
EE	0.009	0.045	0.0151	0.08489
CV	46.92%	3.86%	21.93%	18.88%

*Dilución 1:5000; ^aValores **Tabla DS5.2** obtenidos por uno de los operarios. ^bpruebas que fueron realizadas por el segundo operario. Cada una de las 6 pruebas se realizó bajo las mismas condiciones pero

en días diferentes. **CNP**: Control Negativo Porcino; **CPP**: Control Positivo Porcino; **X**: Promedio; **DE**: Desviación Estándar; **EE**: Error Estándar; **CV** Coeficiente de variación

Los valores de DO_{450} de los CPP en cada uno de los montajes de las pruebas para los dos anticuerpos, fueron controlados a lo largo del estudio mediante gráficos de Levey-Jennings como lo muestra la **Figura DS5.1**, los valores obtenidos en cada una de las determinaciones no excedieron el valor promedio en más de dos DE tanto para IgG como IgM. De igual manera se observó que todos los controles del kit funcionaron dentro de los parámetros definidos por el fabricante en cada una de las pruebas realizadas (datos no mostrados).

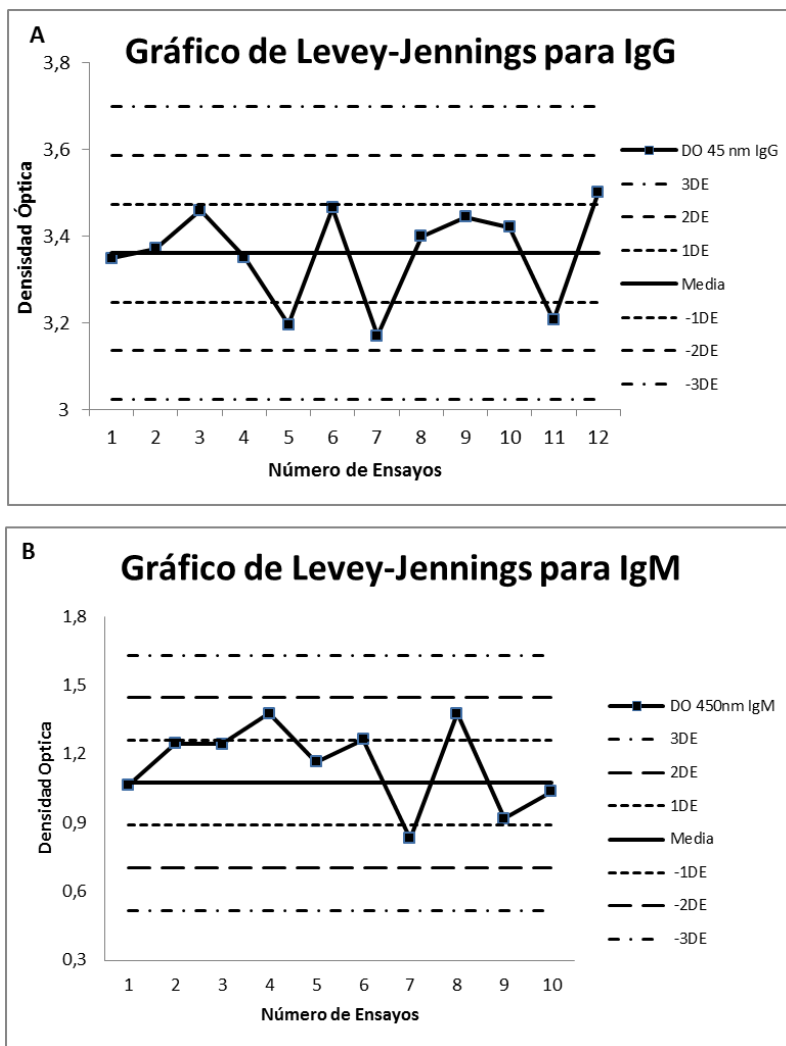


Figura DS5. 1. Control de la Variación de los valores de DO_{450} de Control Porcino Positivo (CPP).

A: Gráfico de Levey-Jennings para 12 determinaciones en diferentes días de CPP para IgG. **B:** Gráfico de Levey-Jennings para 10 determinaciones en diferentes días de CPP para IgM. **DE:** Desviación estándar.

6. CAPITULO 2

Detección del genoma del Virus de la Hepatitis E (VHE) en muestras de heces de cerdos beneficiados en plantas de faenado de Antioquia. Colombia

Detection of hepatitis E virus (HEV) genome in pig feces samples from slaughterhouses in Antioquia. Colombia.

Jorge Eduardo Forero D.^{1*} Ph.D. Cristian Camilo Gutiérrez. Ph.D(c) Jaime Eduardo Parra S.¹ Ph.D. Guillermo Correa L.¹ Ph.D. Berardo de Jesús Rodríguez.² Ph.D. Lina Andrea Gutiérrez B.³ Ph.D. Albeiro López-Herrera.¹ Ph.D.

1 Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Producción Animal. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Calle 59A No.63-020. Autopista Norte. Bloque 50. Piso 3. Oficina 310. Medellín. Colombia.

2 Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Laboratorio de Patología Animal. Grupo de Investigación en Patobiología QUIRON. Carrera 75 No. 65-87. Bloque 47-134. Medellín. Colombia.

3 Universidad Pontificia Bolivariana. Facultad de Medicina. Escuela de Ciencias de la Salud. Grupo Biología de Sistemas. Calle 78B N°72A-109. Medellín. Colombia.

*Correspondencia: jforeroduarte@gmail.com

RESUMEN

El Virus de la Hepatitis E (HEV) es uno de los agentes causales de enfermedad hepática aguda en humanos, aunque también puede llevar a hepatitis crónica en pacientes inmunocomprometidos. Existen cuatro genotipos que generan enfermedad en humanos: los genotipos 1 y 2 asociados a brotes epidémicos por consumo de aguas contaminadas y los genotipos 3 y 4 de transmisión zoonótica, donde el cerdo es el principal reservorio viral, están implicados en brotes esporádicos en países desarrollados. En Colombia existe evidencia serológica de la infección en humanos, sin embargo no se conoce lo suficiente sobre la epidemiología de la enfermedad en el país. Con el fin de determinar si los cerdos en edad de beneficio en Antioquia están excretando virus al ambiente, 300 muestras de heces de cerdos procedentes de distintas regiones de Antioquia, fueron obtenidas en cinco plantas de faenado del departamento y se determinó la presencia del genoma del HEV por medio NRT-PCR del ORF1. El porcentaje de positividad encontrado en los cerdos estudiados fue del 37.5%. Se encontró además que los cerdos que provenían de la subregión Noreste y Suroriente de Antioquia presentaron el menor (14.3%) y mayor (70.0%) porcentaje de muestras positivas respectivamente para el ORF1. Estos resultados indican que el HEV está circulando en las diferentes subregiones productoras de cerdos de Antioquia y que además los cerdos faenados para consumo humano en Antioquia en la edad de beneficio están excretando el HEV en heces, lo que los convierte en una fuente potencial de infección tanto para otros cerdos como para humanos.

Palabras clave: Porcinos. Virus de la Hepatitis E. nNRT-PCR. Zoonosis.

ABSTRACT

The Hepatitis E virus (HEV) is one of the causative agents of acute liver disease in humans. but can also lead to chronic hepatitis in immunocompromised patients. There are four genotypes that generate disease in humans: genotypes 1 and 2

associated with outbreaks due to consumption of contaminated water and genotypes 3 and 4 of zoonotic transmission, where pigs are the main viral reservoir, are involved in sporadic outbreaks in developed countries. In Colombia there is serological evidence of infection in humans and pigs, but not enough is known about the infection in Colombian domestic pigs. In order to determine whether pigs at slaughter age in Antioquia are excreting virus into the environment, 300 stool samples of pigs from different regions of Antioquia, were obtained at five slaughterhouses and the presence of the HEV genome was assessed by nNRT-PCR of ORF1. The percentage of positivity found in pigs studied was 37.5%. It was further found that pigs coming from the Northeast and Southeast of Antioquia sub-region had the lowest (14.3%) and highest (70.0%) percentage of positive samples respectively for ORF1. These results indicate that HEV is circulating in the different pig producing subregions of Antioquia and also that pigs slaughtered for human consumption in Antioquia are excreting HEV in feces, making them a potential source of infection both other pigs to humans.

Keywords: Swine. Virus. Hepatitis E. nNRT-PCR. Zoonoses

6.1. INTRODUCCION

Las características clínicas y epidemiológicas del Virus de la Hepatitis E (HEV, por su sigla del inglés) tanto en zonas endémicas como no endémicas y el creciente rango de hospederos donde se ha podido demostrar la presencia de diferentes variantes del HEV han mostrado la importancia que este virus tiene para la salud pública mundial (Johns *et al.*, 2012; Mirazo *et al.*, 2014; Pavio *et al.*, 2015). Particularmente en América Latina, se ha reportado la circulación del virus en diferentes países; en Argentina se ha detectado el genoma del virus en cerdos de diferentes provincias, con un alto grado de homología de secuencia de nucleótidos a las cepas de HEV de humanos de ese país (Munné *et al.*, 2006). Por otra parte, en una comunidad rural boliviana se detectó la presencia del genotipo 3 de HEV en cerdos y en humanos con una homología del 76% en nucleótidos y el 92% en aminoácidos (Dell'Amico *et al.*, 2011). Así mismo, en Brasil (dos Santos *et al.*, 2011), Venezuela (Gutiérrez *et al.*, 2012), Uruguay (Mirazo *et al.*, 2013), Chile (Ibarra *et al.*, 2006; Reinhardt *et al.*, 2003), Perú (Vildosola *et al.*, 2000), han reportado la presencia del virus en diferentes tipos de poblaciones humanas y animales.

La elevada presencia de HEV en cerdos en diferentes países (Casas *et al.*, 2009; Pavio *et al.*, 2015; Rose *et al.*, 2011), las altas tasas de propagación del virus entre los cerdos (Bouwknegt *et al.*, 2008; Satou & Nishiura, 2007), la transmisión del virus hacia los humanos (Meng *et al.*, 1997; Tei *et al.*, 2004) y la alta homología entre genotipos que infectan humanos y cerdos (Lu *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 1997; Tei *et al.*, 2004) demuestran que los cerdos son uno de los reservorios más importantes de HEV para la infección de humanos.

A pesar de que hay estudios en Colombia que muestran evidencia serológica de la infección en humanos (Betancur *et al.*, 2013; Peláez *et al.*, 2014) y que además el genoma viral se puede detectar en hígados de esta especie en granjas de cerdo y expendios de carne (Gutiérrez *et al.*, 2014; Gutiérrez-Vergara *et al.*, 2015), se

desconoce si los cerdos que llegan a beneficio están en capacidad de excretar virus al ambiente, poniendo en riesgo la carne para consumo humano, los trabajadores de la cadena porcícola y la población general. El objetivo de este trabajo fue detectar el genoma viral en heces de cerdos al momento del beneficio en Antioquia, el principal productor de carne de cerdo del país.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Toma de muestras

Las muestras de heces de 300 cerdos (5.6 % de error. 95% de confianza y una prevalencia estimada del 50%), que pasaron inspección veterinaria de las respectivas plantas de faenado y con edad aproximada de 22 semanas, fueron tomadas al azar en 5 plantas de faenado porcino de Antioquia (Nombradas de la A-E para mantener su confidencialidad), durante el periodo comprendido entre septiembre de 2011 y mayo de 2012, teniendo en cuenta el volumen de sacrificio diario de cada planta y proporcionalmente al municipio de procedencia de los animales. Las muestras de heces se colectaron al inicio del faenado, directamente del esfínter anal de cada animal, se rotularon debidamente, se llevaron refrigeradas al laboratorio y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

6.2.2. Extracción RNA y preparación de cDNA

Las muestras de heces se resuspendieron en 10 ml de un tampón de sales de fosfato (PBS) estéril tratado con DEPC a una concentración de 10% (p/v) la suspensión se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. 140µl del sobrenadante se sometieron a extracción de RNA mediante el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN. Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue guardado en -80°C hasta su utilización. El cDNA fue preparado a partir de 5µl de RNA, utilizando el estuche comercial RevertAid Enzyme Mix (Fermentas. USA) siguiendo las indicaciones del fabricante y usando como iniciador de la retrotranscripción hexanucleótidos al azar (random hexamer)

(Fermentas. USA). La retrotranscripción se incubó a 25°C por 10 min. luego a 43.5°C por 60 min. y finalmente a 72°C por 5 min.

6.2.3. PCR Anidada del ORF1 HEV

Un fragmento de 170 pares de bases del ORF 1 se amplificó mediante una PCR anidada según lo descrito por otros investigadores (Fogeda *et al.*, 2009) con ligeras modificaciones. Brevemente, 3µl de cDNA se sometieron a una primera ronda de amplificación usando una mezcla maestra que contenía: 2.5µl de Buffer (10X). 2µl de MgCl₂ (50mM). 1µl de (20µM de cada dNTP). 2µl (10µM) de cada uno de los cebadores (ORF-1F 5'CCAYCAGTTYATHAAGGCTCC3'; ORF-1R5' TACCAVCGCTGRACRTC3'), 0.2µl de Taq DNA polimerasa 5U/µl (Bioline.USA), a un volumen final de 25µl. El perfil de amplificación fue el siguiente: se desnaturalizó inicialmente a 94°C por 4 min. y luego se amplificó por 39 ciclos a 94°C por 38 seg. 51 °C por 45 seg y 72°C por 60 seg, con una extensión final a 72°C por 4min.

Para la segunda ronda de PCR se utilizaron 3µl del producto de amplificación de la primera ronda, con una solución y volumen final idéntico a la de la primera ronda. pero variando los cebadores por ORF1 FN 5'CTCCTGGCRTCWACTGC3'; ORF1 RN 5'GGRTGRTTCCAI*ARVACY)TC3'.(*I:inosina). El perfil de temperaturas de la PCR fue: desnaturalización inicial a 95°C por 3min, con 35 ciclos a 94°C por 35seg, 48°C por 30seg y a 72°C por 60seg., con una extensión final a 72°C por 3min.

Los fragmentos amplificados fueron verificados en gel de agarosa al 2.5% usando EZ-Vision (Amresco. USA) como agente intercalante. Se uso como control positivo un cDNA obtenido de una muestra de heces positiva, gentilmente donado por la doctora Munné del Laboratorio Nacional de Referencia Hepatitis Virales at INEI - Anlis "Dr. Carlos G. Malbrán Buenos Aires Argentina.

6.2.4. Análisis estadístico.

Para el análisis de positividad de HEV en heces de cerdos en las plantas de beneficio y según la subregión de procedencia, se calcularon las frecuencias de

los datos, los intervalos de confianza (con un nivel de confianza del 95%) y las diferencias entre proporciones (con base en la prueba exacta de Fisher), con un nivel de confianza del 95%; se consideran significativos valores de $p < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados usando las herramientas del programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software. Inc. USA).

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Detección del HEV en Heces de cerdos en plantas de beneficio

La detección molecular del HEV en las muestras de heces obtenidas en las cinco plantas de beneficio mostró que el 37.5 % de las muestras de heces estudiadas fueron positivas para el ORF1 (Figura 6.1).

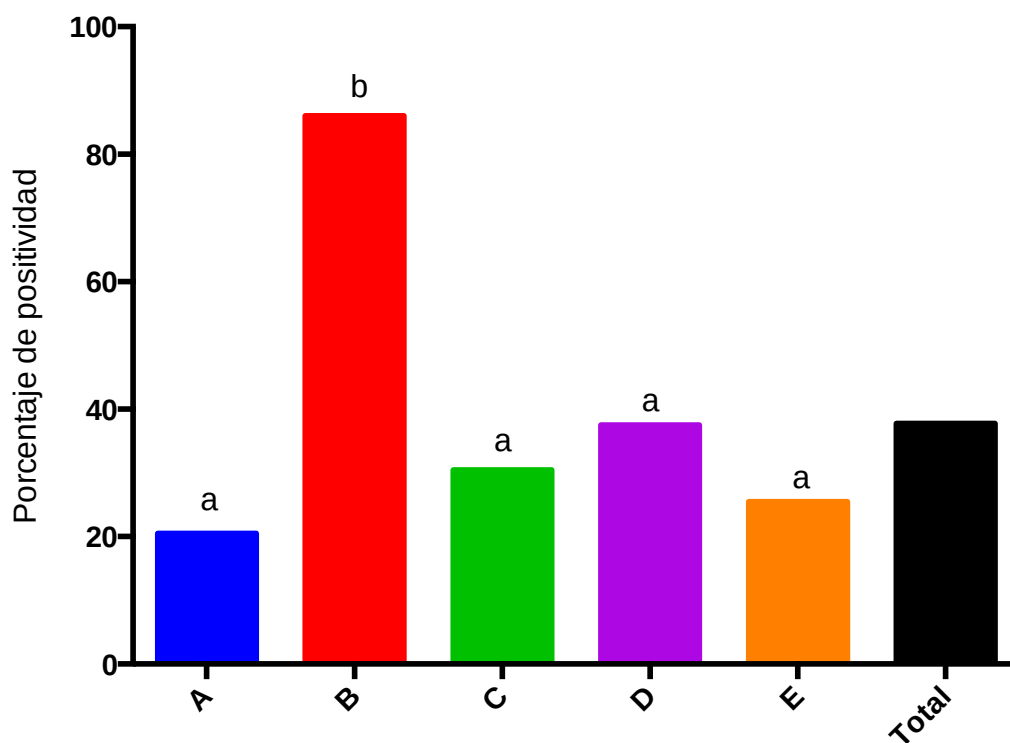


Figura 6.1. Porcentaje de positividad de para la detección del genoma del HEV en heces según plantas de beneficio.

Se muestran los porcentajes de positividad para el ORF1 para cada una de las cinco plantas (A-E) y el total. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas mediante la prueba exacta de Fisher y son indicadas en letras minúsculas: letras diferentes significan diferencias estadísticas.

La proporción de cerdos positivos en cada planta de beneficio para el ORF1 vario entre 19.0% y 86.0% (Figura 6.1), con una diferencia estadísticamente significativa entre la planta B (86.0%) y los demás establecimientos (B vs A $p > 0.0001$. B vs C $p > 0.0001$. B vs D $p = 0.0001$. B vs E $p = 0.0001$).

6.3.2. Detección del HEV en heces de cerdos según la procedencia.

Los cerdos muestreados provenían de 6 de las nueve subregiones en las que se divide Antioquia. Las subregiones Norte y Valle de Aburrá agruparon la mayor cantidad de muestras captadas (140 y 95 respectivamente de los 300 cerdos muestreados), lo que es consistente con el volumen de producción de cerdos aportados para el consumo humano por cada subregión. La positividad por subregión para el ORF1 HEV en las heces varió de 14.3% para la subregión Noreste a 70.0% para la región Suroeste, a 14.3%, para la región Noreste (Figura 6.2).

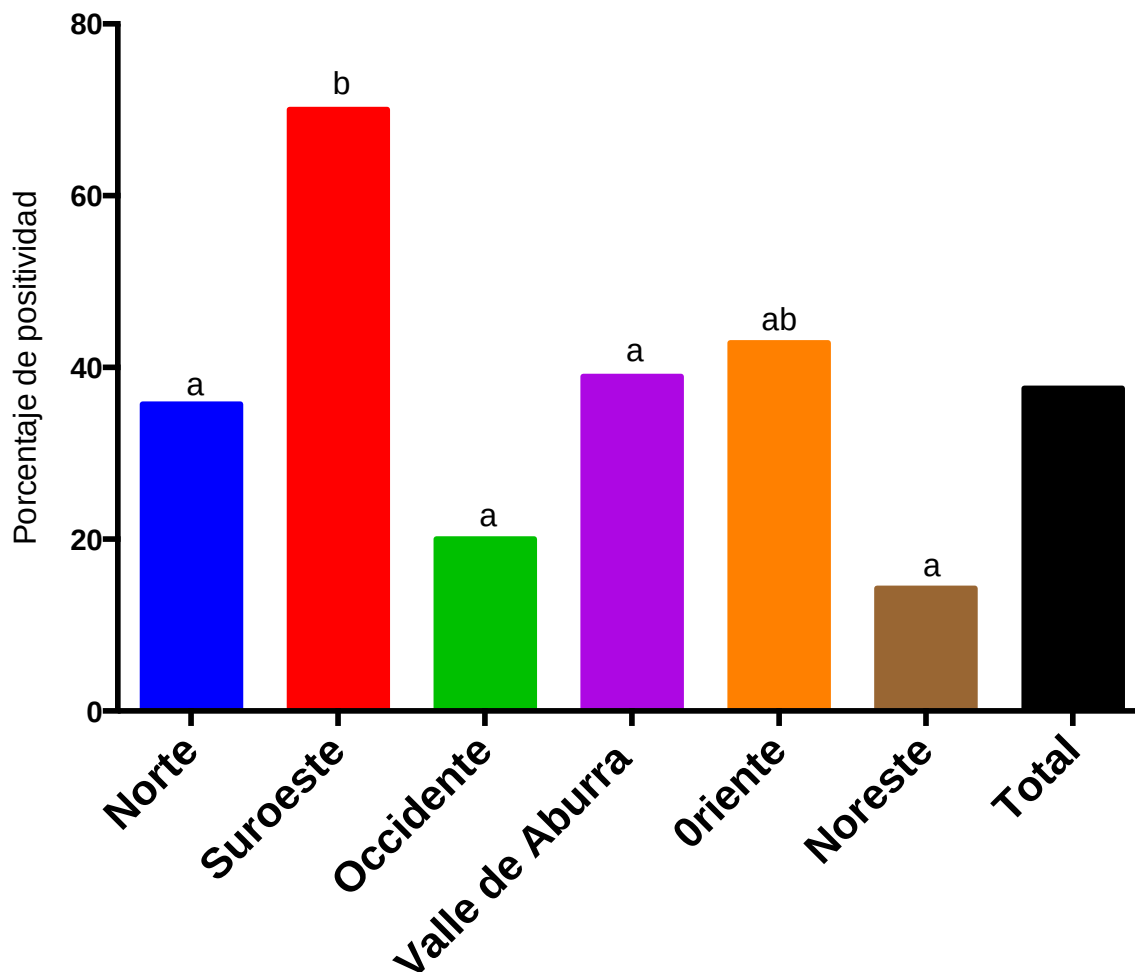


Figura 6.2. Porcentaje de positividad de para la detección del genoma del HEV en heces de cerdo según la región de procedencia.

Se muestran los porcentajes de positividad para el ORF1 en cada una de las subregiones evaluadas y el total. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas mediante la prueba exacta de Fisher y son indicadas en letras minúsculas: letras diferentes significan diferencias estadísticas.

Se presentó diferencia estadística para la positividad al ORF1 entre los cerdos que provenían de la subregión Suroeste con respecto a todas las demás regiones (Suroeste vs Norte $p > 0.0061$. Suroeste Vs Occidente $p = 0.001$. Suroeste Vs Valle de Aburra $p = 0.0138$. Suroeste vs Noreste $p = 0.0237$) excepto para la subregión de oriente donde no se encontró diferencia estadística según la prueba exacta de Fisher.

6.4. DISCUSION

Las evidencias científicas recogidas en los últimos años en diferentes producciones porcinas y en varias especies de animales silvestres alrededor del mundo han vinculado al HEV (especialmente a los genotipos 3 y 4), como un agente zoonótico de importancia en salud pública, pues se ha asociado su detección en animales con la presentación de la enfermedad en países industrializados donde la Hepatitis E no es endémica (Clemente-Casares *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 1999; Ruggeri *et al.*, 2013).

Con el ánimo de saber si los cerdos que se producen en el país, están excretando virus al ambiente en la edad de beneficio, se captaron muestras de heces de cerdos en las plantas de faenado que benefician un alta proporción de animales para el consumo humano en el departamento de Antioquia, considerado el departamento con mayor producción de cerdos de Colombia y se sometieron a la detección del ORF1 del genoma viral.

Los resultados revelaron que el 37.5% de los cerdos en edad de beneficio en Antioquia estaban excretando el HEV en heces, con porcentajes de positividad variables entre plantas de beneficio y entre subregiones cuando se consideró la procedencia de los animales.

Cuando se consideró la positividad en las plantas de se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las proporciones de cerdos positivos en la planta B con las demás establecimientos evaluados. La razón de esta diferencia podría ser atribuida particularmente al mayor número de cerdos procedentes del suroeste, subregión con la más alta positividad para el ORF1 del HEV, captados en la planta B, pues es poco probable que haya un efecto atribuible a las plantas de beneficio analizadas, las cuales tienen prácticas sanitarias similares, de acuerdo a lo exigido por las autoridades. Además la adquisición de la muestra directamente del esfínter anal de los cerdos reduce la posibilidad que la diferencia en la frecuencia de positivos en cada planta se deba a contaminación cruzada.

Se han realizado pocos estudios a nivel mundial que evalúen la presencia del virus en heces de cerdos tomadas en plantas de beneficio, por lo que es difícil contrastar la información obtenida. Sin embargo, en un trabajo similar realizado en Italia donde se evaluaron 150 muestras de heces de cerdo una en sola planta de beneficio, se encontró que el 7.3% ellas eran positivas al HEV por NRT-PCR (Di Martino *et al.*, 2010), lo que sugiere que el porcentaje de detección del HEV en los cerdos de Antioquia fue relativamente alto.

Adicionalmente, en otro estudio realizado por Berto *et al.*, (2012) con muestras de heces de cerdos en etapa de finalización (entre 13-22 semanas edad), recolectadas en granjas del Reino Unido, Portugal, Italia y Holanda, mostró porcentajes variables en la detección del virus (10%, 30%, 23% y 73% respectivamente) lo que sería comparable con las frecuencias en la positividad encontrada si se considera que la edad de beneficio en Antioquia es de aproximadamente 22 semanas (Díaz *et al.*, 2011), indicando que la frecuencia de heces positivas para HEV en los cerdos evaluados son similares a las encontrado en granjas porcícola de países catalogados como industrializados

Las subregiones de mayor volumen de producción de cerdos para consumo humano en Antioquia, Norte y Valle de Aburrá, presentaron porcentajes de positividad similares para el ORF1 de HEV, con 35.7 y del 38.9% respectivamente, mientras la región Suroeste, de menor volumen de producción que las anteriores subregiones presentó mayor positividad (70%). Se desconoce la razón exacta de esta diferencia, pero podría estar relacionado con el manejo de los protocolos de sanidad en cada granja., ligados a la tecnificación de las producciones porcinas de estas subregiones (Bouwknegt *et al.*, 2009; Seminati *et al.*, 2008; Walachowski *et al.*, 2014), sin embargo, dado que no fue posible obtener información sobre el nivel de tecnificación de las granjas de donde procedían los animales evaluados, no es posible comprobar esta hipótesis.

De otro lado, es posible especular que pueden existir variantes del virus con una mayor capacidad de infección que circulan diferencialmente en esas regiones, por

lo que se hace necesario realizar estudios sobre la dinámica de transmisión en las producciones porcinas y la asociación con características moleculares del HEV presentes en cada región del estudio.

Los cebadores utilizados en este estudio son considerados universales para la detección del HEV, dado que fueron diseñados mediante el alineamiento de las secuencias completas reportadas a nivel mundial de los cuatro genotipos (Fogeda *et al.*, 2009) y aunque han sido usados para la detección del virus en humanos, gracias a la similitud genética que hay entre los genotipos en el ORF1 del genoma del virus (Panda & Varma, 2013), fueron de utilidad para detectar el HEV en los cerdos de este estudio. Estudios comparativos entre varios sistemas de NRT-PCR para la detección del HEV, han mostrado que el sistema utilizado para la amplificación del ORF1 en la región de la metiltransferasa viral, tiene mayor sensibilidad que otros sistemas dirigidos a otras secciones del genoma del HEV (Idolo *et al.*, 2013; La Rosa *et al.*, 2014).

Los resultados reportados en este trabajo están en concordancia con lo reportado por otros investigadores, los cuales encontraron que el genoma viral de HEV es detectable en heces de cerdos naturalmente infectados hasta la semana 22 (de Deus *et al.*, 2008; Leblanc *et al.*, 2007) y sugieren que independientemente de la plantas de faenado, los cerdos en edad de beneficio en el departamento de Antioquia están excretando virus al ambiente.

Aunque no es posible establecer si el virus es infeccioso o no, con la técnica de detección del genoma viral empleada, es claro que el HEV está circulando en las producciones porcinas de Antioquia, lo que aumenta el riesgo de contaminación de la carne de cerdo para consumo humano y pone en riesgo de infección a los trabajadores de la cadena porcícola.

Las investigaciones sobre la dinámica de transmisión del virus son escasas en nuestro país, por lo cual se hace necesario hacer trabajos conjuntos con las

autoridades de salud con el fin de generar la información necesaria para tomar las medidas pertinentes que permitan evitar la diseminación del HEV hacia las fuentes de agua de los sistemas de producción o de las plantas de faenado y así disminuir el riesgo de infección tanto en trabajadores de la cadena porcícola como en la población general.

BIBLIOGRAFIA

- Berto, A., Backer, J. a, Mesquita, J. R., Nascimento, M. S., Banks, M., Martelli, F., Ostanello, F., Angeloni, G., Di Bartolo, I. & other authors. (2012). Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes* **190**, 1–6.
- Betancur, C. A., Mejía, M. V & Portillo, S. (2013). Seroprevalencia de hepatitis E en trabajadores de fincas porcícolas del Valle de Aburrá 2011-2012. Seroprevalence of hepatitis E in swine farms workers in Aburra Valley 2011-2012. *Acta Médica Colomb* **38**, 68–70.
- Bouwknegt, M., Frankena, K., Rutjes, S. A., Wellenberg, G. J., Husman, A. M. D. R., Poel, W. H. M. Van Der & Jong, M. C. M. De. (2008). Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res*.
- Bouwknegt, M., Rutjes, S. a, Reusken, C. B. E. M., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M. C. M., de Roda Husman, A. M. & Poel, W. H. M. Van Der. (2009). The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* **5**, 7.
- Casas, M., Pujols, J., Rosell, R., de Deus, N., Peralta, B., Pina, S., Casal, J. & Martín, M. (2009). Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Vet Microbiol* **135**, 248–252.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jordi, R., Martín, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., Martín, M., Bofill-Mas, S. & Girones, R. (2003). Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* **9**, 448–454.
- Dell'Amico, M. C., Cavallo, A., Gonzales, J. L., Bonelli, S. I., Valda, Y., Pieri, A., Segundo, H., Ibañez, R., Mantella, A. & other authors. (2011). Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Bolivia. *Emerg Infect Dis* **17**, 1488–1490.
- De Deus, N., Casas, M., Peralta, B., Nofrarías, M., Pina, S., Martín, M. & Segalés, J. (2008). Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* **132**, 19–28.
- Díaz, C. A., Rodríguez, M. N., Vera, V. J., Ramírez, G., Casas, G. A. & Mogollón, J. D. (2011). Characterization of pig farms in the main swine producing regions of Colombia. *Rev Colomb Ciencias Pecu* **24**, 131–144.

- Fogeda, M., Avellón, A., Cilla, C. G. & Echevarría, J. M. (2009).** Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J Med Virol* **81**, 1743–1749.
- Gutiérrez, C., Sanchez, D., Montalvo, M. C., Pujol, F. H., Rodríguez, L. A., Pinto, B., Chacon, E. P. & Guzman, M. G. (2012).** Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. *J Med Virol* **84**, 1025–1029.
- Gutiérrez, C. C., Ospina, D., Forero, J. E., Rodríguez, B. D. J., Gutiérrez, L. A., Correa, G., López Herrera, A. & Parra, J. E. (2014).** Serological and molecular detection of Hepatitis E virus in pig farms of. *Rev CES Med Vet Y Zootec* **9**, 158–168.
- Gutiérrez-Vergara, C., Quintero, J., Duarte, J. F., Suescún, J. P. & López-Herrera, A. (2015).** Detection of hepatitis E virus genome in pig livers in Antioquia, Colombia. *Genet Mol Res* **14**, 2890–2899.
- Ibarra, H., Riedemann, S. & Toledo, C. (2006).** [Hepatitis A and E virus antibodies in Chilean children of low socioeconomic status. A one year follow-up study]. *Rev Med Chil* **134**, 139–144.
- Idolo, A., Serio, F., Lugoli, F., Grassi, T., Bagordo, F., Guido, M., Privitera, G., Lobreglio, G. & De Donno, A. (2013).** Identification of HEV in symptom-free migrants and environmental samples in Italy. *J Viral Hepat* **20**, 438–443.
- Johne, R., Dremsek, P., Kindler, E., Schielke, A., Plenge-Bönig, A., Gregersen, H., Wessels, U., Schmidt, K., Rietschel, W. & other authors. (2012).** Rat hepatitis E virus: Geographical clustering within Germany and serological detection in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Infect Genet Evol* **12**, 947–956.
- Leblanc, D., Ward, P., Gagné, M.-J., Poitras, E., Müller, P., Trottier, Y.-L., Simard, C. & Houde, A. (2007).** Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int J Food Microbiol* **117**, 160–166.
- Lu, L., Li, C. & Hagedorn, C. H. (2006).** Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* **16**, 5–36.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Martella, V., Di Felice, E., Francesco, C. E. D., Ceci, C. & Marsilio, F. (2010).** Detection of hepatitis E virus in slaughtered pigs in Italy. *Arch Virol* **155**, 103–106.

- Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J. & Emerson, S. U. (1997).** A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9860–9865.
- Meng, X. J., Dea, S., Engle, R. E., Friendship, R., Lyoo, Y. S., Sirinarumitr, T., Urairong, K., Wang, D., Wong, D. & other authors. (1999).** Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* **59**, 297–302.
- Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C. & Arbiza, J. (2013).** Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res* **173**, 364–370.
- Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S. & Arbiza, J. (2014).** Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat Med* **6**, 45–59.
- Munné, M. S., Vladimirovsky, S., Otegui, L., Castro, R., Brajterman, L., Soto, S., Guarnera, E., Molina, V., Monfellano, M. & other authors. (2006).** Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol* **78**, 1579–1583.
- Panda, S. K. & Varma, S. P. K. (2013).** Hepatitis E: Molecular Virology and Pathogenesis. *J Clin Exp Hepatol* **3**, 114–124.
- Pavio, N., Meng, X.-J. & Doceul, V. (2015).** Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr Opin Virol* **10**, 34–41.
- Peláez, D., Hoyos, M. C., Rendón, J. C., Mantilla, C., Ospina, M. C., Cortés-Mancera, F., Pérez, O. L., Contreras, Lady, Estepa, Y. & other authors. (2014).** Hepatitis E virus infection in patients with clinical diagnosis of viral hepatitis in Colombia. *Biomédica* **34**, 354–365.
- Reinhardt, G., Ibarra, H., Riedemann, S. & Vega, I. (2003).** Estudio serológico preliminar de hepatitis E en cerdos en Chile. *Arch Med Vet* **35**, 233–236.
- La Rosa, G., Fratini, M., Muscillo, M., Iaconelli, M., Taffon, S., Equestre, M., Chionne, P., Madonna, E., Pisani, G. & other authors. (2014).** Molecular characterisation of human hepatitis E virus from Italy: comparative analysis of five reverse transcription-PCR assays. *Virol J* **11**, 72–80.

- Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., Madec, F. & Pavio, N. (2011).** High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **34**, 419–427.
- Ruggeri, F. M., Di Bartolo, I., Ponterio, E., Angeloni, G., Trevisani, M. & Ostanello, F. (2013).** Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol* **36**, 331–344.
- Dos Santos, D. R. L., de Paula, V. S., de Oliveira, J. M., Marchevsky, R. S. & Pinto, M. A. (2011).** Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol* **149**, 236–241.
- Satou, K. & Nishiura, H. (2007).** Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. *BMC Vet Res* **3**, 9–18.
- Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N. & Martin, M. (2008).** Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* **175**, 130–132.
- Tei, S., Kitajima, N., Ohara, S., Inoue, Y., Miki, M., Yamatani, T., Yamabe, H., Mishiro, S. & Kinoshita, Y. (2004).** Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: An age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol* **74**, 67–70.
- Vildosola, H., Colichon, A., Barreda, M., Piscocoya, J. & Palacios, O. (2000).** Hepatitis E IgG Antibodies Seroprevalence in a Peruvian risk group. *Rev Gastroenterol del Peru* **20**, 111–116.
- Walachowski, S., Dorenlor, V., Lefevre, J., Lunazzi, A., Eono, F., Merbah, T., Eveno, E., Pavio, N. & Rose, N. (2014).** Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France. *Epidemiol Infect* **142**, 1934–1944.

7. CAPITULO 3

Asociación entre lesiones histopatológicas y biomarcadores serológicos y moleculares de la infección por HEV

Association between histopathological lesions and serological and molecular biomarkers of HEV infection

Jorge Forero D.^{1*} Ph.D. Cristian Camilo Gutiérrez. Ph.D(c) Jaime Eduardo Parra S.¹ Ph.D. Guillermo Correa L.¹ Ph.D. Berardo de Jesús Rodríguez.² Ph.D. Lina Andrea Gutiérrez B.³ Ph.D. Albeiro López-Herrera.¹ Ph.D.

1. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Producción Animal. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Calle 59A No.63-020. Autopista Norte. Bloque 50. Piso 3. Oficina 310. Medellín. Colombia.

2. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Laboratorio de Patología Animal. Grupo de Investigación en Patobiología QUIRON. Carrera 75 No. 65-87. Bloque 47-134. Medellín. Colombia.

3. Universidad Pontificia Bolivariana. Facultad de Medicina. Escuela de Ciencias de la Salud. Grupo Biología de Sistemas. Calle 78B N°72A-109. Medellín. Colombia.

*Correspondencia: jforeroduarte@gmail.com

RESUMEN

Los cerdos como reservorio del virus de la Hepatitis E juegan un papel importante en la salud pública humana y animal. En estos animales la infección cursa sin síntomas clínicos ni lesiones hepáticas detectables a simple vista. En investigaciones previas, se encontró evidencia de la infección por el HEV en suero y la presencia del genoma viral en heces de cerdos en edad de beneficio en Antioquia. Para contribuir al entendimiento de la dinámica de infección en los cerdos colombianos, se caracterizaron las lesiones hepáticas y estableció su relación con marcadores serológicos y moleculares de infección por el HEV. Los resultados mostraron presencia de anticuerpos IgM en 86.06% de las muestras de suero, presencia del ORF1 y el ORF2 del genoma viral del 37.28% y 23.69% en hígado respectivamente. La detección por IHQ del antígeno ORF3 en tejido hepático fue de 41.46%. La frecuencia de de lesiones inflamatorias sugestivas de daño crónico fue alta. Se encontró asociación entre las lesiones inflamatorias y la presencia del genoma viral, pero no para la inmunolocalización del antígeno ORF3. Los resultados confirman la circulación del virus en los cerdos colombianos y la asociación entre lesiones inflamatorias hepáticas y presencia del virus sugieren que el estatus en el curso de la infección en los cerdos al momento del beneficio es variable.

ABSTRACT

Like a reservoir of Hepatitis E virus, pigs play an important role in human and animal public health. Infection in these animals, course without clinical symptoms or apparent liver damage to the naked eye. In previous studies, evidence of HEV infection in serum and presence of viral genome in pig feces at slaughter age in Antioquia were found. To contribute to the understanding of the dynamics of infection in Colombian pig, liver lesions were characterized and established his Association with serological and molecular markers of HEV infection. The results showed IgM antibodies in 86.06% from serum samples, the presence in liver of

ORF1 and ORF2 viral genome region in 37.28% and 23.69%, respectively. IHC detection of ORF3 viral antigen in liver tissue was 41.46%. The frequency of inflammatory lesions suggestive of chronic damage was high. Association between inflammatory lesions and the presence of the viral genome, but not the ORF3 antigen was found. Results confirm the circulation of the virus in Colombian pigs, showed that the characteristics of HEV infection in pigs at slaughter time is variable and inflammatory lesions found in hepatic tissue are associated with the presence of virus in the liver.

7.1. INTRODUCCIÓN

El Virus de la Hepatitis E (Hepatitis E Virus: HEV) es un reconocido agente causal de hepatitis aguda en humanos. Desde su descubrimiento en los años 80 (Balayan *et al.*, 1983) se ha generado un interés creciente por el estudio de sus características genéticas, clínicas y epidemiológicas (Kaba *et al.*, 2013; Kamar *et al.*, 2014; Pavio *et al.*, 2015), lo que ha llevado a considerarlo como un agente zoonótico, siendo el cerdo el principal reservorio de la infección para los humanos (Pavio *et al.*, 2010).

El HEV es un virus RNA de cadena positiva que posee tres marcos de lectura abierta (Open Reading Frame: ORF); ORF1, que codifica para las proteínas no estructurales, ORF2 para las proteínas de la cápside y ORF3 para las proteínas que interactúan con moléculas del sistema Inmune y están Implicadas en la salida del virus al medio extracelular (Holla *et al.*, 2013; Panda & Varma, 2013).

Los estudios en cerdos muestran que tanto en condiciones naturales como experimentales de infección el HEV no provoca enfermedad clínica aparente en cerdos (Kasorndorkbua *et al.*, 2003, 2004; Leblanc *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009a), sin embargo, hay estudios que muestran que en los cerdos este virus puede causar daño hepático leve y moderado con infiltración de linfocitos en los espacios portales. También se ha descrito replicación extra hepática en vesícula biliar, intestino y tonsilas (de Deus *et al.*, 2008; Krawczynski *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2007, 2009a).

En una piara convencional de ciclo completo, los cerdos se infectan entre la semana 8-10 de edad, después que han perdido los anticuerpos transferidos por la cerda, luego seroconvierten entre la semana 14 y 17 concomitantemente con la presencia del virus en sangre en la semana 15, cuando la viremia empieza a declinar, aunque puede durar hasta la semana 22 (Casas *et al.*, 2011; de Deus *et al.*, 2008; Meng, 2013). Los anticuerpos tipo IgM tienden a disminuir hacia las semanas 22 a 24 de vida, mientras que los anticuerpos IgG son de larga duración

y suelen detectarse hasta el periodo de finalización (de Deus *et al.*, 2008). La excreción del virus en heces comienza poco después de la aparición de la viremia y puede durar hasta el momento del faenado en una proporción relativamente baja de los cerdos (Pavio *et al.*, 2010).

Existen reportes en diferentes países que han descrito de manera individual la presencia de biomarcadores de infección como anticuerpos tipo IgG e IgM, genoma viral en suero, heces o hígados en cerdos de plantas de faenado (Di Bartolo *et al.*, 2011; Gardinali *et al.*, 2012b; Machnowska *et al.*, 2014; Walachowski *et al.*, 2014), sin embargo, muy pocos estudios han caracterizado la presencia de lesiones hepáticas asociadas a la infección en condiciones naturales, ni se ha presentado la caracterización o análisis de estos marcadores en su conjunto en cerdos en edad de beneficio.

En Colombia y específicamente en Antioquia, departamento con la mayor producción porcina del país, existe evidencia serológica y molecular de la presencia del HEV en cerdos en edad de beneficio pero no se han realizado estudios sistemáticos que determinen la frecuencia de lesiones inflamatorias hepáticas y sus características histopatológicas; por lo tanto se desconoce si el HEV que circula en Colombia tiene la capacidad de inducir lesiones en los hígados de cerdos.

Con el ánimo de obtener información útil sobre la dinámica de infección natural del virus en los cerdos destinados para consumo humano en Colombia, el objetivo de este estudio fue caracterizar las lesiones hepáticas de los cerdos y establecer su relación con biomarcadores serológicos y moleculares de infección por el HEV en los cerdos beneficiados en Antioquia.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Diseño del estudio.

Este estudio fue realizado de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Acta CEMED-226. del 14 de octubre de 2011). Entre septiembre de 2011 y mayo de 2012 fueron tomadas 287 muestras de hígado y sangre de cerdo en cinco plantas de faenado del departamento de Antioquia, que reciben la mayor parte de la producción porcina de Antioquia.

El tamaño de muestra se calculó teniendo como base un nivel de confianza del 95% y un error máximo de 6%. En cada planta se realizó un muestreo por cuotas donde cada cuota se calculó proporcionalmente al número de animales beneficiados por subregión de procedencia. Los animales incluidos en el muestreo fueron clasificados como sanos y aprobados para beneficio y posterior comercialización, según el proceso de inspección sanitaria pre y postmórtem realizado por los médicos veterinarios responsables de cada planta de beneficio.

7.2.2. Muestras de suero.

Las muestras de sangre fueron obtenidas en la línea de faenado posteriormente a la insensibilización del animal, en el momento de la exanguinación. Se colectaron aproximadamente 10 ml de sangre por animal en tubos estériles de 15 ml. Las muestras se mantuvieron a 4°C durante su transporte al laboratorio de **Biotechnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín**, donde fueron centrifugadas inmediatamente a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. El suero obtenido fue alicuotado en viales de 1.5 ml y almacenado a -20°C hasta su análisis.

7.2.3. Muestras de Hígado.

De cada cerdo se obtuvieron dos submuestras de hígado de aproximadamente 5 cm². Uno de los cortes fue depositado en frascos estériles que contenían formol tamponado al 10% y enviados a laboratorio de **Patología Animal de la**

Universidad de Antioquia para realizar el estudio histopatológico, mientras que el otro fue almacenado en viales de 1.5 ml y transportados a 4°C al laboratorio de **Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia** para realizar estudio molecular. Para evitar la contaminación cruzada entre los hígados, éstos fueron identificados y almacenados individualmente en material estéril desechable a -80 °C hasta su procesamiento.

7.2.4. Extracción de RNA. Preparación del cDNA

Las muestras de hígado fueron maceradas en Nitrógeno líquido y re-suspendidas en un tampón de sales de fosfato (PBS) estéril tratado con DEPC a una concentración de 10% p/v, la cual se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. La extracción del RNA se realizó a partir de 140 µl del sobrenadante utilizando el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN. Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue guardado a -80°C hasta su utilización.

El cDNA fue preparado a partir de 5 µl de RNA, utilizando el estuche comercial Revert-Aid EnzymeMix (Fermentas. USA) siguiendo las indicaciones del fabricante, usando como iniciador de la retrotranscripción hexanucleótidos al azar “randomhexamer” (Fermentas. USA). La retrotranscripción fue incubada a 25°C por 10 minutos, luego a 43.5°C por 60 minutos con un período final de incubación de 5 minutos a 72°C.

7.2.5. PCR Anidada del ORF1 y ORF2 del HEV.

Un fragmento de 170 pares de bases del ORF1 se amplificó mediante una PCR anidada según lo descrito por otros investigadores (Fogeda *et al.*, 2009) con ligeras modificaciones. Brevemente, 3µl de cDNA se sometieron a una primera ronda de amplificación usando una mezcla maestra que contenía: 2.5µl de Buffer (10X), 2µl de MgCl₂ (50mM), 1µl de dNTPs a (20µM de cada dNTP), 2µl (10µM) de cada uno de los cebadores (ORF-1F 5'CCA(C/T)CAGTT(C/T)AT(A/C/T)AAGGCTCC3'; ORF-1R5' TACCA(A/C/G)CGCTG(A/G)AC(A/G)TC3'), 0.2µl de Taq DNA polimerasa (Bioline

5U/μl), a un volumen final de 25μl. El perfil de amplificación fue: desnaturación inicial a 94°C por 4min y luego se amplificó por 39 ciclos a 94°C por 38seg, 51°C por 45seg y 72°C por 60seg; con una extensión final a 72°C por 4min.

Para la segunda ronda de PCR, se utilizaron 3μl del producto de amplificación de la primera reacción y se utilizaron los reactivos de amplificación similares en concentración y volumen a los utilizados en la primera ronda, pero variando los cebadores por los siguientes:

	ORF1	FN
5'CTCCTGGC(A/G)T(C/T)AC(A/T)ACTGC3';	ORF1	RN
5'GG(A/G)TG(A/G)TTCCAI*A(A/G)(A/C/G)AC(C/T)TC3'.		

(*I:inosina).

El perfil de temperaturas de la PCR fue: desnaturalización inicial a 95°C por 3min, con 35 ciclos a 94°C por 35seg, 48°C por 30seg y 60seg a 72°C, con una extensión final a 72°C por 3min.

Para la detección del ORF2, se amplificó un fragmento de 384 pares de bases utilizando el protocolo reportado por Huang *et al.* (2002). Brevemente. 3μl de cDNA fueron sometidos a una primera ronda de amplificación usando una mezcla maestra que contenía: 2.5μl de Buffer (10X), 2μl de MgCl₂ (50mM), 1μl de dNTPs a (20μM de cada dNTP), 2μl (10μM) de cada uno de los cebadores ORF-2F 5'AATTATGC(C/T)CAGTA(C/T)CG(G/A)GTTG3'; y ORF-2R 5'CCCTT(A/G)TC(C/T)TGCTG(A/C)GCATTCTC3', 0.2μl de Taq DNA polimerasa (Bioline 5U/μl), a un volumen final de 25μl. Para la segunda ronda se utilizaron 3 μl del producto de amplificación de la primera ronda, con una solución idéntica pero a un volumen final de 30μl y variando los cebadores por ORF-2FN 5'GT(T/A)ATGCTT(C)TGCAT(A/T)CATGGCT3' y ORF-2RN5' AGCCGACGAAATCAATTCTGTC3'.

El perfil de amplificación para las dos rondas de PCR fue: desnaturalización inicial a 94°C por 4min y 39 ciclos a 94°C por 38 seg, 48°C por 30seg y 72°C por 60 seg; con una extensión final a 72 °C por 4 min. Los fragmentos amplificados fueron verificados en gel de agarosa al 2.5% usando EZ-Vision (Amresco. USA) como agente intercalante.

7.2.6. Análisis inmunoenzimático ELISA indirecto para detección de anticuerpos IgM específicos contra HEV.

Para la detección de anticuerpos tipo IgM anti-HEV en cerdos, se empleó el estuche comercial de ELISA indirecto HEV-IgM (Dia.Pro-DiagnosticBioprobes. Italia) para la detección de anticuerpos tipo IgM en suero humano, remplazando el conjugado anti-humano del estuche, por un anticuerpo conjugado de cabra anti-IgM de cerdo (Thermo Fisher ScientificInc. USA) a la dilución recomendada por el fabricante (1:5000). Como control negativo porcino (CNP) se utilizó (por triplicado) un suero de lechón recién nacido que no ingirió calostro para evitar la presencia de anticuerpos maternos; y como control positivo porcino (CPP) se empleó una muestra suero de cerdo de un animal del estudio positivo en hígado para la detección del genoma tanto del ORF1 como del ORF2 que mostró valores altos de DO en la ELISA en pruebas preliminares. En cada uno de los platos, para efectos de control de calidad del estuche de ELISA, se incluyeron los controles recomendados y proporcionados por el fabricante: tres controles negativos (CN), un control positivo (CP) y dos calibradores (C) evaluados con el conjugado anti-humano del estuche.

7.2.7. Histopatología

Los tejidos fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol, aclarados con xilol antes de ser incluidos en parafina, luego fueron cortados a 3 μm de espesor y cada corte fue montado sobre láminas de vidrio. Las láminas fueron coloreadas con Hematoxilina Eosina y evaluadas con microscopio óptico para caracterizar las lesiones hepáticas inflamatorias. Las lesiones encontradas se clasificaron según las siguientes categorías: 1. **Hepatitis exudativas** (hepatitis aguda): se presentaron alteraciones vasculares como congestión vascular y edema, exudación de neutrófilos mezclados con linfocitos y macrófagos, no hubo presencia de fibrosis. 2. **Hepatitis de interface**: se presentaron lesiones inflamatorias con necrosis de hepatocitos en áreas portales con extensión variable, acompañadas con alteraciones degenerativas vacuolares, apoptosis, infiltración inflamatoria mononuclear y fibrosis de extensión variable. 3.

Colangiohepatitis crónica: se observó reacción confinada a áreas portales, con infiltración predominantemente mononuclear, fibrosis e hiperplasia de conductos biliares. 4. **Sin inflamación** (sin hepatitis): los hígados que no presentaron infiltración inflamatoria significativa, ni cambios vasculares, ni fibrosis.

Para establecer el grado de lesión se consideró la severidad y la extensión de la lesión así: **Grado 0:** Sin lesiones aparentes **Grado 1:** Escasa presencia de lesiones hasta con un 15% de compromiso del tejido. **Grado 2:** Presencia leve de lesiones, multifocales con una extensión entre el 15 y 35% del tejido. **Grado 3:** Presencia moderada de lesiones multifocales o en diferentes lóbulos con una extensión del 35 al 50% del tejido. **Grado 4:** presencia entre moderada y severa de las lesiones, localizadas en diferentes lóbulos con una extensión entre 50 al 65% del tejido. **Grado 5:** Con presencia severa de las lesiones, pérdida extensa y difusa de la citoarquitectura comprometiendo todos los lobulillos en más de 65% del tejido.

7.2.8. Inmunohistoquímica:

Para la detección de la proteína ORF3 del HEV, los tejidos fueron fijados en formol neutro al 10% pH=7.0, procesados e incluidos en parafina. Los cortes de tejidos se realizaron a 3µm de espesor y se recogieron en portaobjetos cargados eléctricamente. Los cortes se desparafinaron en horno de laboratorio a 58°C durante toda la noche. Se completó la desparafinización con tres baños de xilol fresco de 5 minutos cada uno y la hidratación se realizó con etanol en gradientes descendentes. La recuperación antigénica se hizo en Buffer Citrato pH=6.0 (Thermo-Scientific. USA) en olla a presión, la Peroxidasa endógena se bloqueó con el kit para tal fin. El anticuerpo primario anti-conejo policlonal contra ORF3 (Bioss inc. USA) se utilizó a una dilución de 1/420 y se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda durante una hora. Todos los lavados se realizaron con TBS+ Tween 20 (TBST) (Thermo-Scientific. USA). Como sistema de detección se utilizó el Ultravision Quanto Detection System (Polímero- Peroxidasa Thermo-Scientific. USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo se empleó el kit DAB Quanto (Thermo-Scientific.

USA). Se deshidrato con etanol, se aclaró con xilol y se realizó montaje con laminilla utilizando medio de montaje insoluble en alcohol Consul-Mount (Shandon. USA).

7.2.9. Análisis Estadístico.

Para el análisis de asociación entre los marcadores de infección se utilizó la prueba exacta de Fisher, con un nivel de confianza del 95% y la fuerza de asociación se estimó mediante OR: Razón de Posibilidades (Tapia & Nieto, 1993) usando las herramientas del programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software. Inc. La Jolla. USA).

Para el análisis de concordancia entre las técnicas se usó el coeficiente kappa mediante la herramienta QuickCalc de la página de soporte en línea de GraphPad (<http://graphpad.com/quickcalcs>).

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Frecuencias de Detección de IgM en Suero y del genoma ORF1/ORF2 en Hígado y del antígeno ORF3 por Inmunohistoquímica.

La frecuencia de sueros de cerdos positivos para IgM fue de 86.06% y la proporción de hígados en que se detectó el ORF1 y el ORF2 del genoma del HEV fue de 37.28% y 23.69% respectivamente. Cuando se consideró las 178 muestras coincidentes para la detección del ORF1 y el ORF2 del genoma viral se encontró una frecuencia de 18.54% de hígados positivos. El porcentaje de positividad alcanza el 49.48% cuando se tienen en cuenta en forma combinada las muestras positivas tanto para el ORF1 y para el ORF2 (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Frecuencias de los biomarcadores de infección en los cerdos muestreados en las plantas de beneficio.

	IgM	ORF1	ORF2	IHQ ^a	ORF1 y ORF2 ^b	ORF1ó ORF2 ^c
Pos	247	107	68	119	33	142
Neg	40	180	219	168	145	145
% Pos	86.06	37.28	23.69	41.46	18.54	49.48

Proporción de muestras positivas y negativas para la detección IgM en suero. la detección del ORF1 y/o ORF2 del genoma en hígados y detección de la proteína ORF3 por

Inmunohistoquímica. **a:** IQH Inmunohistoquímica para la detección del ORF3. **b:** ORF1 y ORF2 muestras coincidentes para la detección del ORF1 y ORF2 **c:** ORF1 ó ORF2 muestras positivas para ORF1 o ORF2.

La tinción inmunohistoquímica de los hígados reveló una frecuencia del 41.46% de las de los tejidos positivos para la detección del ORF3 del HEV (Tabla 7.1). En los tejidos positivos se presentó una fuerte señal de tinción en un número variable de hepatocitos, caracterizada por un precipitado marrón en el citoplasma. (Figura 2).

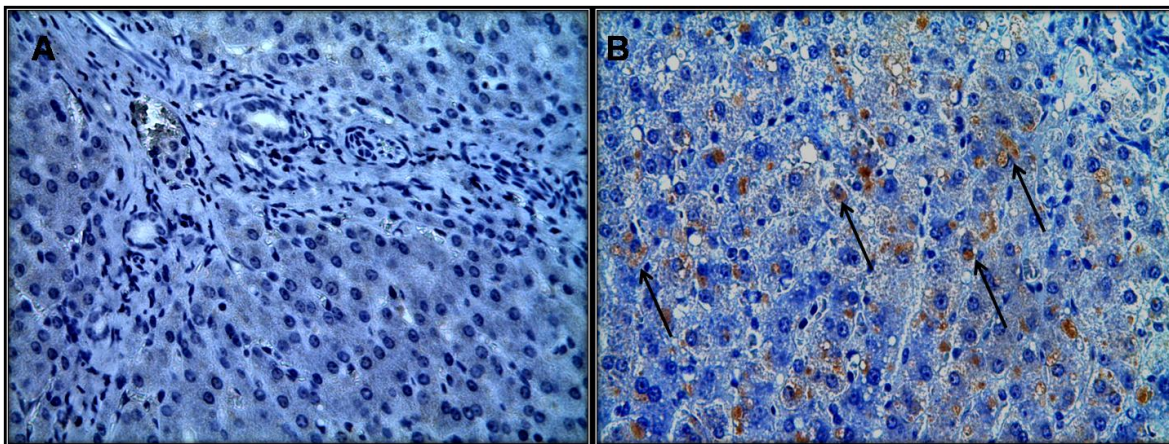


Figura 7.1. Microfotografías de la marcación Inmunohistoquímica en hígados de cerdos para la detección del ORF3.

A: Sección de un hígado de cerdo negativo para la presencia del antígeno ORF3 por IHQ. **B:** Microfotografía de una placa de hígado de cerdo de planta de beneficio seropositivo para IgM, con presencia del ORF1 y ORF2 del genoma viral en tejido hepático y positivo para la detección del antígeno ORF3 por IHQ; Las flechas indican la inmunolocalización citoplasmática del antígeno ORF3.

7.3.2. Frecuencia y grado de severidad de lesiones inflamatorias hepáticas

La evaluación histopatológica mostró un porcentaje total de lesiones inflamatorias del 90.24%, entre ellas, las lesiones más frecuentes fueron Hepatitis de Interface (HI) con un 59.93%, seguidas de Colangiohepatitis Crónica (CH) y de Hepatitis Exudativa (HE) con el 17.77% y 12.54% respectivamente. No se encontraron lesiones inflamatorias en 9.76% de los tejidos evaluados (Tabla 7.2. Figura 7.2)

Por otra parte, en el 43.21% de los tejidos evaluados se observó presencia de lesiones leves y multifocales (Grado 2), siendo este el grado más frecuente;

mientras que solo en el 1.39% se observaron lesiones moderadas (Grado 4). Las lesiones Grado 1 y Grado 3 se presentaron en el 29.97% y el 15.68% de los hígados respectivamente. No se observaron lesiones severas (Grado 5) en los hígados analizados (Tabla 7.2).

Tabla 7.2. Frecuencia de tipos de inflamación hepática y grado de las lesiones en los cerdos en edad de beneficio en Antioquia

		Tipo de Hepatitis				n	%
		SL	HE	HI	CH		
Grado de severidad	0	28	0	0	0	28	9.76
	1	0	28	40	18	86	29.97
	2	0	8	91	25	124	43.21
	3	0	0	37	8	45	15.68
	4	0	0	4	0	4	1.39
	n	28	36	172	51	287	100
	%	9.76	12.54	59.93	17.77	100	
% Total		90.24					

SL: Sin Lesion **CH:** Colangiohepatitis Cronica: **HI** Hepatitis de interface: **HE:** Hepatitis exudativas. n Número de muestras. % Total: Porcentaje total de lesiones inflamatorias

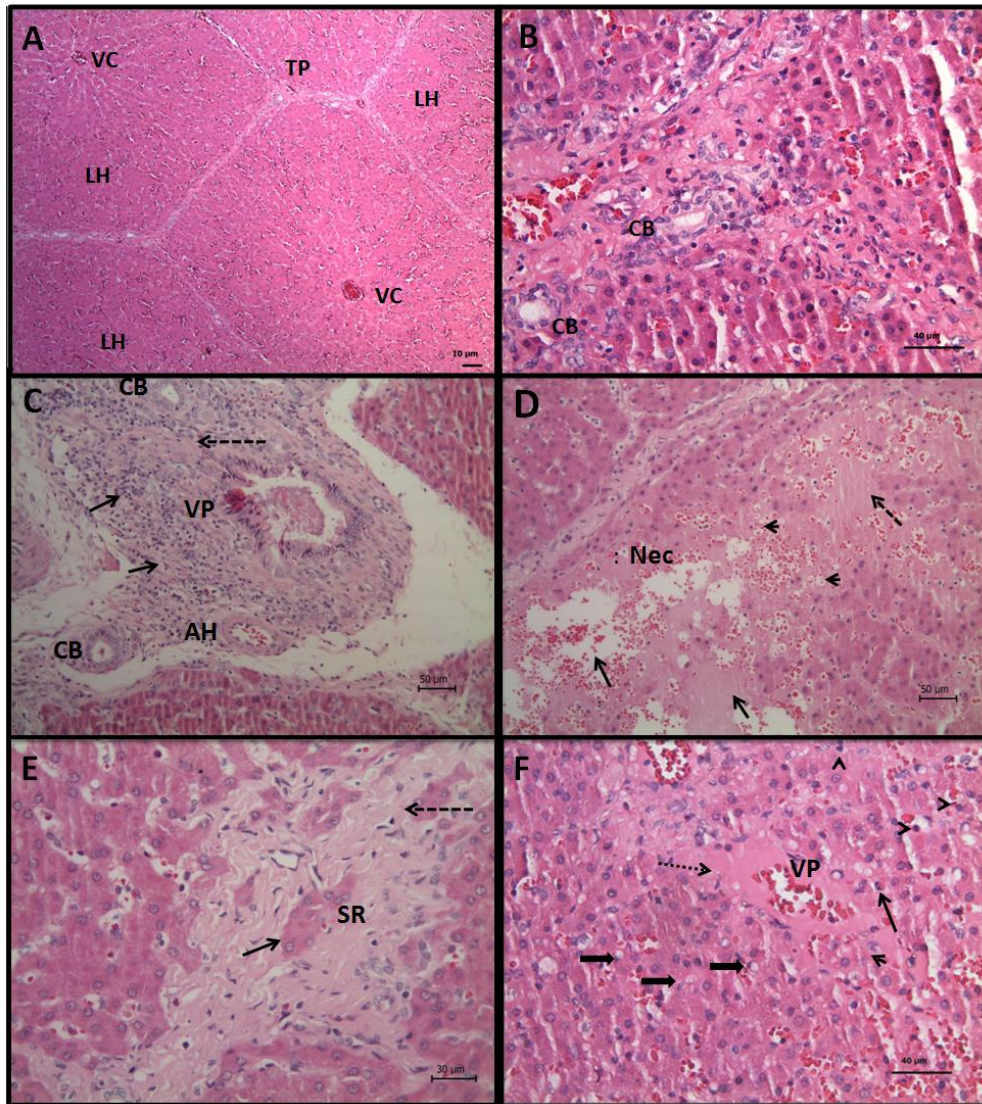


Figura 7.2. Microfotografías de los hígados de cerdo muestreados en las plantas de beneficio teñidas con H&E.

A: Tejido Hepático Normal: Tejido hepático sin lesiones aparentes. **B: Colangiohepatitis Crónica** se observa proliferación de los canaliculos biliares con infiltrado en la región portal **C: Colangiohepatitis Crónica:** se observa el espacio portal con un infiltrado de linfocitario mixto con predominio de linfocitos y macrófagos (Flecha sólida), ligera fibrosis (Flecha punteada) y proliferación de conductos biliares. **D: Necrosis hepática:** se observan lesiones necroinflamatorias (**Nec**) en otro campo del corte histologico C, alteraciones degenerativas vacuolares (Cabeza de flecha), fibrosis de extensión variable (Flecha punteada), también hemorragia y edema (Flecha sólida). **E:** Se observa fibrosis (flecha punteada), fibras de colágeno que rodean la una isla de hepatocitos (Flecha sólida). **SR** Nódulo regenerativo o seudoroseta Hepatitis crónica. **F: Hepatitis aguda incipiente:** se observan linfocitos (cabeza de flecha), Edema (flecha punteada), degeneración vacuolar (flecha gruesa) neutrófilos (flecha solida), sin presencia de fibrosis. **VC:** Vena central. **LH:** Lobulillo Hepático. **TP** Triada portal **CB:** conducto biliar. **AH** Arteriola Hepática. **VP:** Vénula portal.

7.3.3. Concordancia y asociación entre las pruebas de laboratorio.

Los resultados en la comparación entre biomarcadores muestran que hay una asociación estadísticamente significativa entre la proporción de muestras de hígado de cerdos positivos para el ORF1 y los hígados positivos para el ORF2 (prueba de Fisher. $P=0.03$). La fuerza de asociación para estas dos pruebas fue la más alta ($OR= 1.85$) y aunque la fuerza de concordancia fue pobre, se obtuvo el mayor valor de Kappa (0.120). No se encontró asociación estadísticamente significativa entre las proporciones de muestras positivas para IgM, antígeno ORF3, y los sectores del genoma ORF1 y ORF2 del HEV entre si ($p>0.05$) y la concordancia entre las pruebas fue pobre o ausente (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Comparación entre los biomarcadores de infección por el HEV y concordancia entre las pruebas de infección.

	Fuerza de Asociación				Concordancia		
	P^a	OR	IC	K	IC	nO(%)	FC
ORF1 vs ORF2	0.03*	1.85	1.06-3.21	0.120	0.01-0.24	178(62.02)	Pobre
ORF1 vs IgM	0.56	1.26	0.63-2.56	0.023	-0.04-0.08	121(42.16%)	Pobre
ORF1 vs IHQ	0.53	1.17	0.72-1.91	0.038	-0.08-0.15	155(54.01%)	Pobre
ORF2 vs IgM	0.32	0.68	0.33-1.43	-0.025	-0.08-0.03	84(29.27%)	b
ORF2 vs IHQ	0.12	1.56	0.91-2.73	0.089	-0.02- 0.2	168(58.54%)	Pobre
IgM vs IHQ	0.49	0.75	0.38-1.47	-0.03	-0.10-0.04	121 (42.16%)	b

P: Prueba exacta de Fisher Nivel de confianza del 95%.*estadísticamente significativo. OR: Razón de Posibilidades (Tapia & Nieto, 1993). IC^a Intervalo de Confianza para OR: K:coeficiente Kappa . IC^b: Intervalo de Confianza para Kappa. nO(%): Número de concordancias observados y porcentaje. FC: fuerza de la concordancia. b: Sin concordancia.

7.3.4. Distribución de frecuencias de biomarcadores de infección en cerdos en las plantas de Beneficio.

La Tabla 7.4, muestra los resultados en la caracterización de la distribución de los biomarcadores de infección: anticuerpos IgM en suero, el genoma viral en hígado y antígeno ORF3 en tejido hepático. Para disminuir la probabilidad de incluir falsos positivos para la detección del genoma en hígados, en este análisis solo se tuvo en cuenta los cerdos que fueron positivos y negativos simultáneamente para la detección del ORF1 y el ORF2.

En un estudio anterior, se mostro que el 100% de los cerdos evaluados en plantas de benéfico porcino en Antioquia, fueron seropositivos tipo IgG indicando que estos cerdos estuvieron expuestos al virus en algún momento de su etapa productiva (Capítulo 1). Asi, de los 178 cerdos incluidos en este análisis, el 75.28% fueron positivos para IgM y se detectó el genoma viral en el hígado 12.92% de ellos. De estos cerdos positivos para el genoma del HEV 6.74% fueron positivos para el antígeno ORF3 por IHQ. En los cerdos con presencia de IgM pero negativos para el genoma (62.36%) se detectó el antígeno ORF3 en el 24.16%, mientras que el 38.20% fue negativo para este último biomarcador.

Por otro lado, en los cerdos con ausencia de anticuerpos IgM (24.72%) se detectó la presencia del genoma viral en el 5.61% de los hígados estudiados; de estos cerdos positivos para el genoma, el 3.37% y 2.24 fueron positivos y negativos para la presencia del antígeno ORF3 del HEV en el tejido hepático respectivamente. En los cerdos con muestras negativas para IgM y para el genoma viral en hígado (19.10%), se encontró una positividad del 7.30% para la presencia del antígeno ORF3 y 11.79 fueron negativos (Tabla 7.4???)

Tabla 7.4. Distribución de biomarcadores de infección en los cerdos estudiados.

IgM n(Pos/Neg)%	ORF1 y ORF2 n(Pos/Neg)%	IHQ n(Pos/Neg)%
178(Pos)75.28	23(Pos) 12.92	53 (Pos) 6.74
		71 (Neg) 6.17
	111(Neg)62.36	43 (Pos) 24.16
		76 (Neg) 38.20
44(Neg) 24.72	10(Pos)5.61	6 (Pos) 3.37
		4 (Neg) 2.24
	34(Neg)19.10	9 (Pos) 7.30
		21 (Neg) 11.79

La tabla muestra el número de cerdos **n**, el estatus (**Pos**); Positivo o (Neg) Negativo y el porcentaje de cerdos con respecto al número total de cerdos evaluados para la detección de IgM, genoma (ORF1 y ORF2) e Inmunohistoquímica.

7.3.5. Análisis de asociación entre la inflamación hepática con la detección del Genoma y la detección de antígeno ORF3.

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia del ORF1 ($p<0.0001$), del ORF2 ($p=0.0003$), y del ORF1 o el ORF2 ($p=0.0336$) (cerdos positivos para ORF1 u ORF2) con las lesiones inflamatorias; la fuerza de asociación fue mayor cuando se consideraron los cerdos positivos para cualquiera de los dos regiones del genoma (ORF1 u ORF2) ($OR=9.96$) que para el ORF1($OR=8.86$) y el ORF2 ($OR=4.45$) de forma individual; los intervalos de confianza al 95% para la fuerza de asociación entre los distintos se muestra en la tabla 7.5

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la proporción de muestras de hígado positivas para el antígeno ORF3 por IHQ y la presencia de lesiones hepáticas (Tabla 7.5). Cuando se analizó la relación entre la presencia de lesiones de tipo crónico (CH y HI) y los diferentes biomarcadores, no se encontró asociación estadísticamente significativa (datos no mostrados).

Tabla 7.5. Análisis de asociación entre la inflamación hepática con la detección del Genoma por nRT-PCR y la detección de antígeno ORF3 por IHQ.

	ORF1		ORF2		ORF1 y ORF2 ^a		ORF1u ORF2 ^b		IHQ ^c	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Inflamación	105	154	66	193	32	120	139	120	108	151
Sin Inflamación	2	26	2	26	1	25	3	25	11	17
n	107	180	68	219	33	145	142	145	119	168
N	287		287		178		287		287	
Valor P	0.0003*		0.0336*		0.05		< 0.0001*		0.843	
Odds ratio	8.86		4.45		6.66		9.65		1.10	
IC%	2.06-38.16		1.03-19.25		0.86-51.12		2.843-32.78		0.49-2.45	

P: Valor de P en la Prueba exacta de Fisher. *****: Estadísticamente significativo. **n**: subtotal del número de muestras. **N**: total de muestras analizadas. **a**: ORF1 y ORF2 muestras coincidentes para la detección del ORF1 y el ORF2. **b**: ORF1 ó ORF2 muestras positivas combinadas para el ORF1 o el ORF2 **c**: IQH Inmunohistoquímica para la detección del ORF3 OR: Odds Ratio: Razón de Posibilidades (Tapia & Nieto, 1993).IC95%: Intervalo de confianza para el OR.

7.3.6. Análisis de asociación entre la severidad de las lesiones con la detección del Genoma y la detección de antígeno ORF3.

Cuando se analizó el grado de severidad de las lesiones, se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia del ORF1 del genoma viral con las lesiones moderadas (grado 3) ($p=0.04$), al igual que cuando se consideraron las muestras positivas para cualquiera de los dos marcadores del genoma (ORF1 u ORF2) ($p=0,034$). No se encontró relación estadística entre el ORF2 ($p=0.85$), la presencia del antígeno ORF3 ($p=0.51$) ni cuando se consideraron las muestras positivas para ORF1 y ORF2 de manera simultánea ($P=0.55$) (Tabla 7.6).

Tabla 7.6. Análisis de asociación entre el grado de severidad de las lesiones con la detección del Genoma por nRT-PCR y la detección de antígeno ORF3 por IHQ

	ORF1		ORF2		ORF1 y ORF2 ^a		ORF1u ORF2 ^b		IHQ ^c	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Grado 3	23	22	11	34	5	16	29	16	21	24
Otras Lesiones	84	158	57	185	28	129	113	129	98	144
n	107	180	68	219	33	145	142	145	119	168
N	287		287		178		287		287	
Valor P	0.04*		0.85		0.55		0.034*		0.51	
Odds ratio	1.96		1.05		1.44		2.69		1.28	
IC%	1.03-3.73		0.5-2.2		0.48-4.25		1.06-4.00		0.67-2.43	

P: Valor de P en la Prueba exacta de Fisher. *****: Estadísticamente significativo. **n**: subtotal del número de muestras. **N**: total de muestras analizadas. **a**: ORF1 y ORF2 muestras coincidentes para la detección del ORF1 y el ORF2. **b**: ORF1 ó ORF2 muestras positivas combinadas para el ORF1 o el ORF2 **c**: IQH Inmunohistoquímica para la detección del ORF3 OR: Odds Ratio: Razón de Posibilidades (Tapia & Nieto, 1993).IC95%: Intervalo de confianza para el OR.

7.4. DISCUSIÓN

En estudios previos se evidenció la exposición y circulación del HEV en cerdos en edad de beneficio en el departamento de Antioquia (Capítulo 1 y 2), sin embargo, aspectos como las características histopatológicas que pudiera inducir la infección por el HEV, no han sido clarificadas en estos animales. Para alcanzar una mejor

comprensión sobre este aspecto, en este trabajo se caracterizaron las lesiones presentes en tejido hepático y su relación con marcadores serológicos y moleculares de infección por el HEV en los cerdos en edad de beneficio en Antioquia.

Los resultados mostraron que el porcentaje de sueros positivos para anticuerpos tipo IgM en los animales estudiados es más alto que los reportados en cerdos en plantas de beneficio de otros países (Crossan et al., 2014; Wacheck et al., 2012). No se encontró relación ni concordancia entre la proporción de cerdos positivos para IgM, la presencia del genoma viral en hígado y la detección del antígeno ORF3 en el tejido hepático. Esto sugiere que el virus realiza replicación en tejidos extrahepáticos (Choi & Chae, 2003; Williams et al., 2001) y podría en consecuencia inducir la presencia de IgM en suero antes que el virus alcance a replicarse en el hígado.

Además, algunos estudios en cerdos y en otros animales han encontrado el genoma viral en hígado en ausencia de anticuerpos específicos anti HEV (Di Bartolo et al., 2011; Lin et al., 2015; Rose et al., 2011; Walachowski et al., 2014), esto respalda la idea que la presencia de IgM en suero no garantiza la presencia del virus en algún compartimiento del hospedero.

La detección del genoma viral en los hígados de cerdos varió dependiendo de la región del genoma que fue amplificada. Esto se puede explicar por la diferencia en la sensibilidad analítica de las dos pruebas que según La Rosa et al, (2014), es mayor para el protocolo de detección del ORF1. La proporción de animales que fueron positivos para la detección concomitante del ORF1 y el ORF2 (18.54%), podría ser la más adecuada para estimar la frecuencia de hígados positivos para el genoma en los cerdos en edad de beneficio en Antioquia, pues disminuye la probabilidad de tener falsos positivos que sobreestimen la frecuencia de este biomarcador. Este resultado fue similar a las frecuencias reportadas en otras

investigaciones (Gardinali et al., 2012a; Rose et al., 2011; Temmam et al., 2013; Walachowski et al., 2014).

No se encuentran en la literatura científica estudios previos que evalúen la inmunolocalización de las proteínas virales en el hígado de una cantidad de porcinos tan grande, en condiciones naturales como la empleada en este trabajo; sin embargo, un estudio en Brasil, reportó mediante el uso de un anticuerpo policlonal, la presencia de antígenos del HEV por IHQ en el 28.0% en el tejido hepático de cerdos de 16 semanas de edad. Esos resultados se obtuvieron en producciones porcinas de menos de 100 cerdos, con manejo zootécnico de baja calidad e instalaciones técnicamente inadecuadas. En ese mismo estudio los cerdos que provenían de granjas con mayor tecnificación no fueron positivos para los antígenos virales (da Costa Lana et al., 2014).

El uso de la IHQ para la detección de antígenos virales, puede presentar reacción cruzada con otros antígenos o alteración de los sitios de unión al antígeno en el momento del procesamiento disminuyendo la confiabilidad de esta técnica (Ha & Chae, 2004; Haines & Chelack, 1991; Lee et al., 2009b), Esto podría explicar en parte que la frecuencia de cerdos positivos a la inmunolocalización hepática de proteínas del ORF3 no estuvo relacionada con la detección del genoma viral.

Costa Lana et al., (2014) observaron que un cerdo negativo para el genoma viral en muestra de hígado, fue positivo para la detección de antígenos del HEV en el tejido hepático por IHQ, de manera similar a lo encontrado en algunas muestras analizadas en este trabajo, no hay claridad si esta situación es habitual en los hígados de cerdos infectados con el HEV o en su lugar responde a mecanismos desconocidos de la replicación y la patogénesis del HEV que expliquen la acumulación de antígenos en el tejido hepático en ausencia del genoma viral, por esta razón es importante realizar nuevos estudios que aborden este tema.

La caracterización de la distribución de los marcadores de infección en este estudio sugiere heterogeneidad en el estatus de infección de los porcinos evaluados; estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores en cerdos en etapa de finalización y al momento de beneficio (Casas *et al.*, 2011; de Deus *et al.*, 2007; Martelli *et al.*, 2010), en los que se muestran proporciones variables de positividad para los diferentes marcadores de infección que concuerdan con las diferencias encontradas en este estudio y que podrían ser debidos a que los cerdos en el momento del beneficio estaban en diferentes etapas de la infección. Los resultados previos realizados por este equipo de investigación indican que los cerdos analizados estuvieron expuestos al HEV en algún momento de su vida (100% de cerdos IgG positivos, Capítulo 1), esto sugiere que los 18.46% cerdos positivos a las tres técnicas de diagnóstico evaluadas (IgM, genoma viral y antígeno ORF3) pudieron estar pasando por una infección activa; mientras que aquellos negativos para los tres marcadores (4.52%) ya habrían resuelto la infección y el resto de animales podrían estar cursando la infección en distintos momentos del ciclo de replicación. No hay trabajos similares que respalden o refuten estas hipótesis interpretativas, por lo que es necesario realizar nuevas investigaciones que permitan esclarecer estas conjeturas.

De otro lado, el análisis histopatológico del tejido hepático en los porcinos reveló que una proporción alta de los cerdos presentó lesiones inflamatorias crónicas (CH y HI), con una baja proporción de cerdos con lesiones de tipo agudo exudativo (HE) y solamente algunos cerdos no presentaron lesiones. La frecuencia de lesiones inflamatorias de tipo crónico halladas en los cerdos en edad de beneficio en el contexto de la infección por HEV en este estudio, no tiene precedentes en la literatura científica, ni existen estudios que indaguen por la prevalencia de lesiones microscópicas en la población porcina de cerdos lo que dificulta el contraste de resultados.

No obstante, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del genoma viral y las lesiones hepáticas inflamatorias, con amplios intervalos de confianza en OR que generan incertidumbre sobre la fuerza de asociación. Esto sugiere, que si bien el genoma del HEV está presente en el tejido hepático de los tejidos evaluados, la presencia de lesiones inflamatorias puede estar influida por otros factores que pueden potenciar el desarrollo de lesiones inflamatorias en el hígado; tales como la coinfección con otros patógenos (Rosell *et al.*, 2000) o con la presencia concomitante de micotoxinas (Casteel *et al.*, 1993).

Aunque no se encontró asociación estadísticamente significativa entre las lesiones hepáticas exclusivamente de tipo crónico con la presencia del genoma viral, si se encontró asociación estadística entre el grado de severidad tipo 3 y la presencia del genoma; particularmente todas las lesiones de grado 3 fueron HE e HI. Estos resultados sugieren que puede ser posible que el HEV que circula en Antioquia induzca lesiones de tipo crónico de una severidad moderada. El número creciente de publicaciones que vinculan al HEV con la inducción de hepatitis crónica en humanos inmunocomprometidos (Abravanel *et al.*, 2013; Kamar *et al.*, 2013; Wedemeyer *et al.*, 2012); y evidencia reciente que indica que la infección experimental por HEV puede causar infección crónica en conejos (Han *et al.*, 2014), respaldan estos resultados.

La mayoría de estudios que han utilizado la histopatología como biomarcador de infección se han realizado en animales expuestos experimentalmente al virus, con un tiempo corto de seguimiento que probablemente no es suficiente para que se desarrollen lesiones crónicas como las aquí reportadas o como las comunicadas en conejos; sin embargo, los datos obtenidos en este estudio no permiten descartar que el HEV que circula en Antioquia posea factores propios de virulencia que puedan inducir lesiones de tipo crónico, como las observadas en los cerdos evaluados; o que las prácticas de manejo zootécnico y sanitario regiones generen estados de estrés e inmunodepresión en los animales que induzcan lesiones crónicas como las comunicadas en los humanos.

La infección por el HEV es compleja, factores como los sistemas y prácticas en la producción porcina (Casas *et al.*, 2011; La Rosa *et al.*, 2014), la fuerza de infección (Bouwknegt *et al.*, 2008; Satou & Nishiura, 2007), el estado inmune de los cerdos (Martín *et al.*, 2007), la replicación extra-hepática (Choi & Chae, 2003) y factores genéticos tanto del hospedero como del virus entre otros factores, podrían influenciar en la variabilidad del estatus y en la patogénesis de la infección en los cerdos que llegan a las plantas de beneficio en Antioquia.

En conclusión, para nuestro conocimiento, este es el primer estudio donde se caracteriza la infección por HEV en los cerdos que llegan a las plantas de beneficio para consumo humano, usando en conjunto de biomarcadores serológicos, moleculares e histopatológicos de la infección con HEV. Los resultados muestran que los cerdos infectados con el HEV que llegan a las plantas de beneficio presentan patrones variables serológicos y moleculares de infección y, que las lesiones asociadas a la infección son similares a las descritas por otros autores con un desarrollo predominantemente crónico.

BIBLIOGRAFIA

- Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Lhomme, S., Miedougé, M., Peron, J.-M., Alric, L., Rostaing, L., Kamar, N. & Izopet, J. (2013).** Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. *J Clin Virol* **58**, 624–8. Elsevier B.V.
- Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P. & Poleschuk, V. F. (1983).** Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* **20**, 23–31.
- Di Bartolo, I., Ponterio, E., Castellini, L., Ostanello, F. & Ruggeri, F. M. (2011).** Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol* **149**, 330–338.
- Bouwknegt, M., Engel, B., Herremans, M. M. P. T., Widdowson, M. a, Worm, H. C., Koopmans, M. P. G., Frankena, K., de Roda Husman, a M., De Jong, M. C. M. & Van Der Poel, W. H. M. (2008).** Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol Infect* **136**, 567–576.
- Casas, M., Cortés, R., Pina, S., Peralta, B., Allepuz, A., Cortey, M., Casal, J. & Martín, M. (2011).** Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet Microbiol* **148**, 27–34.
- Casteel, S. W., Turk, J. R., Cowart, R. P. & Rottinghaus, G. E. (1993).** Chronic toxicity of fumonisin in weanling pigs. *J Vet Diagn Invest* **5**, 413–417.
- Choi, C. & Chae, C. (2003).** Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J Hepatol* **38**, 827–832.
- Da Costa Lana, M. V., Gardinali, N. R., da Cruz, R. A. S., Lopes, L. L., Silva, G. S., Júnior, J. G. C., de Oliveira, A. C. S., de Almeida Souza, M., Colodel, E. M. & other authors. (2014).** Evaluation of hepatitis E virus infection between different production systems of pigs in Brazil. *Trop Anim Health Prod* **46**, 399–404.
- Crossan, C., Grierson, S., Thomson, J., Ward, A., Nunez-Garcia, J., Banks, M. & Scobie, L. (2014).** Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiol Infect* 1–4.

- De Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martín, M. & Segalés, J. (2007).** Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol* **119**, 105–114.
- De Deus, N., Casas, M., Peralta, B., Nofrarías, M., Pina, S., Martín, M. & Segalés, J. (2008).** Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* **132**, 19–28.
- Fogeda, M., Avellón, A., Cilla, C. G. & Echevarría, J. M. (2009).** Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J Med Virol* **81**, 1743–1749.
- Gardinali, N. R., Barry, A. F., da Silva, P. F. N., de Souza, C., Alfieri, A. F. & Alfieri, A. A. (2012a).** Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. *Res Vet Sci* **93**, 1515–9. Elsevier Ltd.
- Gardinali, N. R., Barry, A. F., Otonel, R. A. A., Alfieri, A. F. & Alfieri, A. A. (2012b).** Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**, 935–939.
- Ha, S. K. & Chae, C. (2004).** Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver. *J Viral Hepat* **11**, 263–267.
- Haines, D. M. & Chelack, B. J. (1991).** Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest* **3**, 101–112.
- Han, J., Lei, Y., Liu, L., Liu, P., Xia, J., Zhang, Y., Zeng, H., Wang, L., Wang, L. & Zhuang, H. (2014).** SPF rabbits infected with rabbit hepatitis E virus isolate experimentally showing the chronicity of hepatitis. *PLoS One* **9**.
- Holla, R. P., Ahmad, I., Ahmad, Z. & Jameel, S. (2013).** Molecular virology of hepatitis e virus. *Semin Liver Dis* **33**, 3–14.
- Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2002).** Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol*.
- Kaba, M., Moal, V., Gérolami, R. & Colson, P. (2013).** Epidemiology of mammalian hepatitis E virus infection. *Intervirology* **56**, 67–83.

- Kamar, N., Rostaing, L. & Izopet, J. (2013).** Hepatitis E virus infection in immunosuppressed patients: natural history and therapy. *Semin Liver Dis* **33**, 62–70.
- Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F. & Izopet, J. (2014).** Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev* **27**, 116–138.
- Kasorndorkbua, C., Halbur, P., Guenette, D., Buitenwerf, R., Royer, R. L. & Meng, X. J. (2003).** Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res* **67**, 303–306.
- Kasorndorkbua, C., Guenette, D. K., Huang, F. F., Thomas, P. J., Meng, X. J. & Halbur, P. G. (2004).** Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol* **42**, 5047–5052.
- Krawczynski, K., Meng, X.-J. & Rybczynska, J. (2011).** Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. *Virus Res* **161**, 78–83.
- Leblanc, D., Ward, P., Gagné, M.-J., Poitras, E., Müller, P., Trottier, Y.-L., Simard, C. & Houde, A. (2007).** Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int J Food Microbiol* **117**, 160–166.
- Lee, S., Kang, S., Kim, D., Bae, J. & Kim, J. (2007).** Detection of swine hepatitis E virus in the porcine hepatic lesion in Jeju Island. *J Vet Sci* **8**, 51–55.
- Lee, Y. H., Ha, Y., Ahn, K. K. & Chae, C. (2009a).** Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet J* **179**, 417–421.
- Lee, Y.-H., Ha, Y., Ahn, K.-K., Cho, K.-D., Lee, B. H., Kim, S.-H. & Chae, C. (2009b).** Comparison of a new synthetic, peptide-derived, polyclonal antibody-based, immunohistochemical test with in situ hybridisation for the detection of swine hepatitis E virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet J* **182**, 131–5. Elsevier Ltd.
- Lin, J., Karlsson, M., Olofson, A.-S., Belák, S., Malmsten, J., Dalin, A.-M., Widén, F. & Norder, H. (2015).** High Prevalence of Hepatitis E Virus in Swedish Moose – A Phylogenetic Characterization and Comparison of the Virus from Different Regions. *PLoS One* **10**, e0122102.
- Machnowska, P., Ellerbroek, L. & Johne, R. (2014).** Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Vet Microbiol* **168**, 60–68.

- Martelli, F., Toma, S., Di Bartolo, I., Caprioli, a, Ruggeri, F. M., Lelli, D., Bonci, M. & Ostanello, F. (2010).** Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. *Res Vet Sci* **88**, 492–6. Elsevier Ltd.
- Martín, M., Segalés, J., Huang, F. F., Guenette, D. K., Mateu, E., de Deus, N. & Meng, X. J. (2007).** Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Vet Microbiol* **122**, 16–24.
- Meng, X.-J. (2013).** Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* **33**, 41–49.
- Panda, S. K. & Varma, S. P. K. (2013).** Hepatitis E: Molecular Virology and Pathogenesis. *J Clin Exp Hepatol* **3**, 114–124.
- Pavio, N., Meng, X.-J. & Renou, C. (2010).** Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* **41**, 46–66.
- Pavio, N., Meng, X.-J. & Doceul, V. (2015).** Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr Opin Virol* **10**, 34–41.
- La Rosa, G., Fratini, M., Muscillo, M., Iaconelli, M., Taffon, S., Equestre, M., Chionne, P., Madonna, E., Pisani, G. & other authors. (2014).** Molecular characterisation of human hepatitis E virus from Italy: comparative analysis of five reverse transcription-PCR assays. *Virol J* **11**, 72–80.
- Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., Madec, F. & Pavio, N. (2011).** High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **34**, 419–427.
- Rosell, C., Segalés, J. & Domingo, M. (2000).** Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* **37**, 687–692.
- Satou, K. & Nishiura, H. (2007).** Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. *BMC Vet Res* **3**, 9–18.
- Tapia, J. A. & Nieto, F. J. (1993).** Razón de posibilidades: una propuesta de traducción de la expresión odds ratio. *Salud Publica Mex* **35**, 419–424.
- Temmam, S., Besnard, L., Andriamandimby, S. F., Foray, C., Rasamoelina-Andriamanivo, H., Héraud, J.-M., Cardinale, E., Dellagi, K., Pavio, N. & other authors. (2013).** High prevalence of hepatitis E in humans and pigs and evidence of genotype-3 virus in swine, Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* **88**, 329–338.

- Wacheck, S., Werres, C., Mohn, U., Dorn, S., Soutschek, E., Fredriksson-Ahomaa, M. & Märklbauer, E. (2012).** Detection of IgM and IgG Against Hepatitis E Virus in Serum and Meat Juice Samples from Pigs at Slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog Dis* **9**, 655–660.
- Walachowski, S., Dorenlor, V., Lefevre, J., Lunazzi, A., Eono, F., Merbah, T., Eveno, E., Pavio, N. & Rose, N. (2014).** Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France. *Epidemiol Infect* **142**, 1934–1944.
- Wedemeyer, H., Pischke, S. & Manns, M. P. (2012).** Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* **142**, 1388–1397.
- Williams, T. P. E., Kasorndorkbua, C., Halbur, P. G., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2001).** Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model. *Society* **39**, 3040–3046.

8. CAPITULO 4

Detección y caracterización molecular del Virus de la Hepatitis E en cerdos en edad de beneficio en Antioquia Colombia

Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in pigs at slaughter in Antioquia Colombia .

Jorge E. Forero D^{1,2} PhD(c). Cristian Gutiérrez¹ PhD(est). Jaime Eduardo Parra S¹ Ph.D. Guillermo Correa L¹ Ph.D. Berardo Rodríguez² Ph.D. Lina Andrea Gutiérrez B³. Francisco Javier Díaz⁴ Ph.D. Albeiro López-Herrera¹ Ph.D.

1. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Producción Animal. Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Calle 59A No.63-020. Autopista Norte. Bloque 50. Piso 3. Oficina 310. Medellín. Colombia.

2. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Laboratorio de Patología Animal. Grupo de Investigación en Patobiología QUIRON. Carrera 75 No. 65-87. Bloque 47-134. Medellín. Colombia.

3. Universidad Pontificia Bolivariana. Facultad de Medicina. Escuela de Ciencias de la Salud. Grupo Biología de Sistemas. Calle 78B N°72A-109. Medellín. Colombia.

4 Grupo de Inmunovirología Facultad de Medicina Universidad de Antioquia. Sede de Investigación Universitaria. Calle 62 N° 52-59. laboratorio 532. Medellín. Colombia.

* Corresponding author. Tel.:+57 4 4309055..

E-mail: alherrera@unal.edu.co .

RESUMEN

Virus de la hepatitis E (VHE) es un agente zoonótico que se puede transmitir a través del consumo de hígados de cerdo con insuficiente cocción. Estudios previos han detectado el genoma viral en las heces e hígados de cerdos que llegan a las plantas de faenado de Antioquia (Colombia) y en hígados de cerdo comercializados en expendios de carne de Medellín (capital de Antioquia), pero no se ha establecido ni el genotipo ni las relaciones filogenéticas de los cepas. Muestras de heces, hígado y de efluentes de agua fueron obtenidas al azar en plantas de beneficio porcino, carnicerías y granjas en Antioquia Colombia. Luego de la extracción del RNA viral, una segmento 130 pares de base del ORF1 y dos segmentos de 348 y 948 pares de bases en el ORF2 fueron amplificados y secuenciados. El análisis filogenético reveló que los fragmentos amplificados se agrupaban en tres clados dentro del genotipo 3a y tenían una alta similitud con las secuencia de nucleótidos de cepas del HEV identificadas en Japón y los Estados Unidos. La heterogeneidad genética entre cepas del HEV identificados en cerdos de Antioquia descrita en este estudio proporciona información importante para entender la circulación del HEV en las piaras de Colombia.

Palabras clave: Filogenética. Hepatitis E de cerdos. genotipo 3. plantas de beneficio zoonosis

ABSTRACT

The hepatitis E virus (HEV) is a zoonotic agent that can be transmitted through the consumption of pork livers contaminated with the virus and insufficient cooking. Previous studies detected the viral genome in faeces and livers of pigs at slaughterhouses and pig livers sold in butcher shops in Medellín (Antioquia capital). but has not been established the genotype and phylogenetic relationships of the strains. Stool samples. liver and effluent water were obtained randomly in slaughterhouses. butchers in Medellín and farms in Antioquia Colombia. After

extraction of viral RNA a 130 base pair segment from viral ORF1 and two segments 348 and 948 bp from viral ORF2 were amplified and sequenced. Independent phylogenetic analysis of each of three amplified segments revealed that were grouped into at least three different clades within genotype 3a and had high similarity to the nucleotide sequence of HEV strains identified in Japan and the United States. The genetic heterogeneity of strains of HEV identified in pigs in Antioquia described in this study provides important information for understanding the circulation of HEV in herds of Colombia information.

Keywords: Genotype 3. phylogenetic. swine hepatitis. slaughterhouses. zoonoses

8.1. INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis E (HEV) es el agente etiológico de la hepatitis E conocida previamente como hepatitis no A y no B. una enfermedad de distribución mundial (Dalton *et al.*, 2014a; Kamar *et al.*, 2014) que puede causar inflamación aguda del hígado. El HEV se considera una zoonosis que puede adquirirse por el consumo de carne o derivados del cerdo contaminados con el virus (Meng, 2013).

El genoma del HEV es de aproximadamente 7.2 Kb y consiste en tres arcos de lectura abierta (Open Reading Frames: ORFs) (Koonin *et al.*, 1992; Tsarev *et al.*, 1992). El ORF1 codifica para las proteínas virales no estructurales que incluyen la metiltransferasa (Met), la proteasa (Pro), la helicasa (Hel) y la RNA polimerasa dependiente de RNA de RNA (RdRp). El ORF2 codifica la proteína de cápside y el ORF3 que codifica para una fosfoproteína que participa en la regulación de la respuesta inmune en el hospedero y además tiene un papel importante en la salida del virion al espacio extracelular (Kannan *et al.*, 2009).

Actualmente, el HEV se clasifica como el único miembro de la familia *Hepeviridae* divididos en 4 genotipos que pueden infectar humanos y subdividido en numerosos subtipos (Lu *et al.*, 2006). Con la descripción de nuevas variantes genéticas distantes entre virus con la misma organización genómica del HEV encontrados en diversas especies animales (Drexler *et al.*, 2012; Johne *et al.*, 2012, 2014; Woo *et al.*, 2014) la clasificación de la familia *Hepeviridae* podría cambiar. Algunos autores han propuesto una clasificación más comprensiva que la actual para incluir de manera adecuada las nuevas variantes descritas. Quizá una de las más acertadas para una nueva clasificación racional del virus, propone clasificar a la familia en dos géneros (*Orthohepevirus* y *Psichihepevirus*) que se subdividen a su vez en especies donde se incluyen los genotipos descritos actualmente y los nuevos aislados encontrados en diversos hospederos. Esta

distribución jerárquica podría facilitar la clasificación de nuevos virus por descubrir (Smith *et al.*, 2014).

Los estudios virológicos y epidemiológicos desarrollados en los últimos años claramente muestran que HEV debe ser considerado como una zoonosis emergente (Machnowska *et al.*, 2014; Pavio *et al.*, 2010; Ruggeri *et al.*, 2013) por lo tanto es necesario aclarar el papel de diferentes especies animales en la transmisión (Dalton *et al.*, 2014b; Wedemeyer *et al.*, 2012). El cerdo tiene gran participación en la producción de carne para consumo humano y es el principal reservorio animal para el HEV, razón por la cual este virus tiene un impacto importante para la salud pública humana y también en el aseguramiento de la inocuidad alimentaria de la cadena de producción porcícola a nivel local y global.

A pesar de la importancia que tiene este virus en la salud pública, Colombia carece de información relevante y confiable acerca de la circulación del virus en las producciones porcinas del país. Trabajos recientes realizados en la región muestran que el virus está presente en los cerdos en edad de beneficio (Capítulo 2 y Capítulo 3), pero no se conoce cuales son los genotipos que están circulando y propagándose en las piaras locales.

En el presente estudio se analizaron filogenéticamente secuencias parciales del ORF1 y el ORF2 (una para el ORF1 y dos para el ORF2) del genoma del HEV amplificadas a partir de muestras de hígado y heces de cerdos obtenidas en plantas de faenado de Antioquia. Adicionalmente se incluyeron en el análisis secuencias detectadas en hígados de expendios de carne y en efluentes de dos granjas ubicadas en la subregión del Valle de Aburrá, con el propósito de definir la cepa viral circulante en Antioquia.

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño del estudio se realizó en conforme a los protocolos y procedimientos aprobados por el comité de ética para la experimentación animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín según el acta No CEMED-226 de Octubre 14 de 2010.

8.2.1. Cerdos y muestras

Entre septiembre de 2011 y mayo de 2012 muestras de hígados y heces de cerdos fueron colectadas al azar en cinco plantas de beneficio porcino de Antioquia, Colombia, las cuales recogen la mayor parte de la producción porcina de las principales regiones productoras de Antioquia. Los animales tenían aproximadamente 22 semanas de edad y el peso varió entre 90-100 kg. Todos los animales pasaron la inspección veterinaria reglamentaria implementada por cada planta de beneficio.

Las muestras de heces e hígados en las plantas de beneficio fueron tomadas en recipientes estériles debidamente identificados, directamente del esfínter anal y en el momento de la evisceración de cada animal respectivamente. Las muestras de hígados de expendios de carne fueron obtenidas en diferentes lugares de la ciudad de Medellín según lo descrito por Gutiérrez-Vergara *et al.* (2015). Todas las muestras obtenidas fueron transportadas a 4°C hasta al laboratorio y fueron guardadas a -80°C hasta su procesamiento

Las muestras de efluentes de agua fueron adquiridas en dos granjas cercanas a la ciudad de Medellín, según lo descrito por Gutiérrez-Vergara. (datos sin publicar) Brevemente, 250ml del agua de desecho de las granjas fueron tomados en recipiente esteriles y enviadas a 4°C al laboratorio para su procesamiento. Las muestras fueron ultracentrifugadas a 20.000 rpm a 10°C por una hora, el precipitado resuspendido en 1 ml tampón de Glicina/NaOH pH 9 e incubado por 30 min a 4°C. El sobrenadante fue guardado a -80°C para la extracción de RNA.

8.2.2. Extracción del RNA y PCR anidada.

Las Muestras de hígado (0.250g aprox) y de heces (1.0 gr aprox) fueron maceradas y resuspendidas respectivamente, en 1.0ml de PBS 1X con Dietil pirocarbonato DEPC (Sigma. USA) y fueron centrifugadas a por 13.000 rpm durante 3 minutos.

La extracción de RNA se hizo a partir de 140 µl del sobrenadante de cada una de las muestras de hígados heces y Aguas usando el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen. Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración de las muestras fue asegurada midiendo las densidad óptica (OD260y OD280 nm) en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific. USA) y además fueron verificadas por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%. Para obtener el cDNA, 5 uL de cada extracto fueron sometidos a transcripción reversa mediante el kit RevertAid Enzyme Mix (Thermo Scientific. USA), según las instrucciones del fabricante. Como iniciadores de la polimerización se usaron cebadores hexámeros al azar (random hexamer primers) (Thermo Scientific. USA).

Para la detección del RNA del HEV un segmento del ORF1 y otro del ORF2 fueron amplificados mediante nRT-PCR anidada como lo describieron Fogeda *et al.*, (2009) y Huang *et al.*, (2002) respectivamente. Adicionalmente otro protocolo para la amplificación de un segmento más amplio del ORF2 denominado ORF2.1 también fue amplificado como lo describió Mirazo *et al.*, (2013). La tabla 8.1 muestra la secuencia de los cebadores usados en este estudio y la figura 8.1 el esquema de la ubicación de los segmentos amplificados.

Tabla 8.1. Secuencias de los cebadores usados para la detección del genoma del HEV.

Test	Nombre	Sentido /ronda ^a	Secuencia 5 –3	Posición ^b	pb	Ref
ORF 1	ORF1F	S/1ra	CCAYCAGTTYATHAAGGCTCC	9–29	171	Fogeda <i>et al.</i> , 2009
	ORF1R	AS/ 1ra	TACCAVCGCTGRACRTC	627–643		
	ORF1FN	S/2da	CTCCTGGCRTYACWACTGC	26–44		
	ORF1RN	AS/ 2da	GGRTGRTTCCAIARVACYTC	178–197		

	3156N	S/1ra	AATTATGCYCAGTAYCGRGTTG	5713-5735		
ORF 2	3157N	AS/ 1ra	CCCTTRTCYTGCTGASCATTCTC	6444-6421	348	Huang <i>et al.</i> , 2002
	3158N	S/2da	GTWATGCTYTGCAWTCATGGCT	5992-6014		
	3159N	AS/ 2da	AGCCGACGAAATCAATTCTGTC CAGCCCTTCGCMCTCCCCTATATTCA	6332-6354		
	CNSFe	S/1ra	TC	5331-5358		
ORF 2.1	CNSRe	AS/ 1ra	CMGTCGGCTCGCCATTGGCYGARAC	6354-6335	958	Mirazo <i>et al.</i> , 2013
	CNSFib	S/2da	CTGGAGCTCGCCCTCGRCAGCC CCRGCCGACGAAATYAATTCTGTCTG	5346-5367		
	CNSRib	AS/ 2da	GS	6306-6281		

a: Sentido (S) Antisentido (AS) b: Posición relativa en el genoma de acuerdo a la cepa de US1. Numero de acceso Genbank :AF060668.

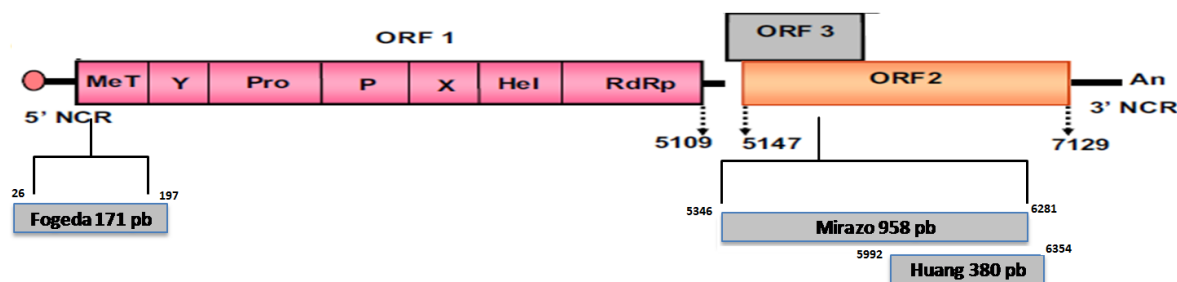


Figura 8.1. Representación esquemática de la ubicación de los segmentos del ORF1 y ORF2 del HEV amplificados.

La figura muestra la representación esquemática de la ubicación de los segmentos amplificados. La posición dentro del genoma del HEV, el autor y la extensión en pb de cada segmento son indicados

8.2.3. Secuenciación y análisis filogenético

Los productos positivos obtenidos por los protocolos de las PCR anidadas de cada uno de las regiones del genoma fueron purificados y secuenciados directamente por el servicio de secuenciación de MacroGen USA (Maryland. USA). Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente y comparadas con aquellas disponibles en NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los alineamientos la selección del modelo de sustitución nucleotídica y los análisis filogenéticos fueron realizados con el software MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Los valores de bootstrap fueron determinados con 1000 repeticiones valores mayores de 60% fueron considerados significativos para la agrupación

filogenética. Las secuencias colombianas fueron comparadas con secuencias completas o parciales reportadas en el GenBank, los números de acceso y el país de procedencia son indicados en las figuras. Una cepa aviar (Numero de acceso EF206691.1) fue incluida como outgroup para analizar los arboles filogenéticos.

Para la codificación de las secuencias utilizadas se tuvo en cuenta lo siguiente: dos letras iniciales para identificar los sitios de obtención de la muestra, ya sean las 5 plantas de Beneficio: nombradas de la A a la E para mantener la confidencialidad (SA-SE) o los expendios de carne (GR) o efluentes de Agua (AE); un número consecutivo; el tipo de muestra según si fueron hígados (LS) o heces (SS) de planta o hígados de expendios (LG); la subregión de procedencia. Valle de Aburrá (VA), Norte (NO), Noreste (NE), Oriente (OR), Suroeste (SO) y Occidente (OCC), seguido de un número para diferenciarlo de los municipios específicos de la subregión. Por ejemplo **GR46_LG_VA7** se refiere a una muestra de hígado (**LG**) tomada en un expendio de carne (**GR**) ubicado en el Valle de Aburra en el municipio 7 (**VA7**) y su consecutivo fue el **46**

8.3. RESULTADOS.

8.3.1. Detección del HEV ORF1. ORF2 y ORF2.1

Se logró la secuenciación satisfactoria de 129 productos de NRT-PCR, de los cuales 47 correspondieron a un fragmento de 171 pb del gen de la metiltransferasa dentro del ORF1, 69 a un fragmento de 348 pb del gen de la proteína de cápside dentro del ORF2 y 13 secuencias a un segundo sector del ORF2 (ORF2.1) de 958 pb que corresponde también a la cápside viral. Las secuencias fueron amplificadas a partir de hígados y heces de plantas de beneficio, hígados de expendios de carne y efluentes de granjas porcícolas. En la tabla 8.2 se muestran el número de secuencias utilizadas para cada sector del genoma según el tipo de muestra (hígados, heces o aguas) y la región de procedencia de los cerdos.

No se obtuvo información de la región de procedencia de los hígados comercializados en expendios de carne, por lo tanto su clasificación dentro de la región del Valle de Aburrá solo indica que fueron comercializados en la ciudad de Medellín. Aún así, la mayor proporción de las secuencias estudiadas fueron obtenidas de diferentes municipios de la región del Valle de Aburra y de la región Norte de Antioquia (Tabla 8.2).

Tabla 8.2. Número de secuencias obtenidas en el estudio.

Región	ORF1				ORF2				ORF2.1
	LS	SS	GR	AE	LS	SS	GR	AE	SS
Valle de Aburra (VA)	12	12	4	2	14	8	6	2	8
Norte (NO)	10	3			16	5			1
Nordeste (NE)	1	0			3	1			2
Suroeste (SO)	1	1			4	1			1
Occidente (OCC)	1	0			4	1			1
Oriente(OR)	0	0			3	1			0
Subtotal	25	16	4	2	44	17	6	2	13
Total				47		69			13

En la tabla se observa el tipo de muestra, la subregión de procedencia y el sector del genoma amplificado en las muestras de cerdos obtenidas.

SS: Hece de plantas de beneficio. LS: Hígados de plantas de beneficio. GR: Hígados de expendios. AE: Agua de efluentes de granja.

8.3.2. Secuencia y análisis filogenético of HEV ORF1

La comparación de las distancias genéticas entre 47 secuencias obtenidas para el ORF1 reveló 15 variantes o haplotipos, las cuales fueron usadas para la construcción del árbol filogenético (Figura 8.2) Las secuencias **SD777_SS_VA6**, **SA718_SS_NE1**, **SC268_LS_SO5**, **GR46_LG_VA7** y **GR21_LG_VA7** representan 18, 7, 5 1 y 1 secuencias adicionales idénticas, respectivamente. El código de las secuencias representadas por estos cinco haplotipos y de las restantes 10 variantes (secuencias individuales no idénticas) se muestran en los datos suplementarios (Tabla DS8.1) al igual que la relación entre variantes (Figura DS8.1)

Las secuencias obtenidas de las muestras de hígados de los cerdos 785, 773 y 26 tomadas en plantas de beneficio, fueron idénticas a las detectadas en las heces de los cerdos correspondientes; al contrario, las secuencias **SC37_LS_NO3** y **SC37_SS_NO3** detectadas en hígado y heces respectivamente, que provenían de muestras del mismo animal no fueron idénticas.

La reconstrucción filogenética del ORF1 de HEV, muestra los genotipos 1, 2, 3 y 4 agrupándose monofiléticamente aunque sin un adecuado soporte de rama. Los 15 haplotipos detectados en el estudio formaron un grupo polifilético dentro del genotipo 3, sin estructura geográfica definida de acuerdo a las subregiones de procedencia de los cerdos (Figura 1). Así, la secuencia del gel Met del HEV (130pb) aunque sugiere que todas las variantes de HEV de Antioquia pertenecen al genotipo 3 no proveyó valores estadísticamente significativos en los soportes de rama que permita agrupar confiablemente a las secuencias colombianas con las secuencias europeas asiáticas o americanas en particular.

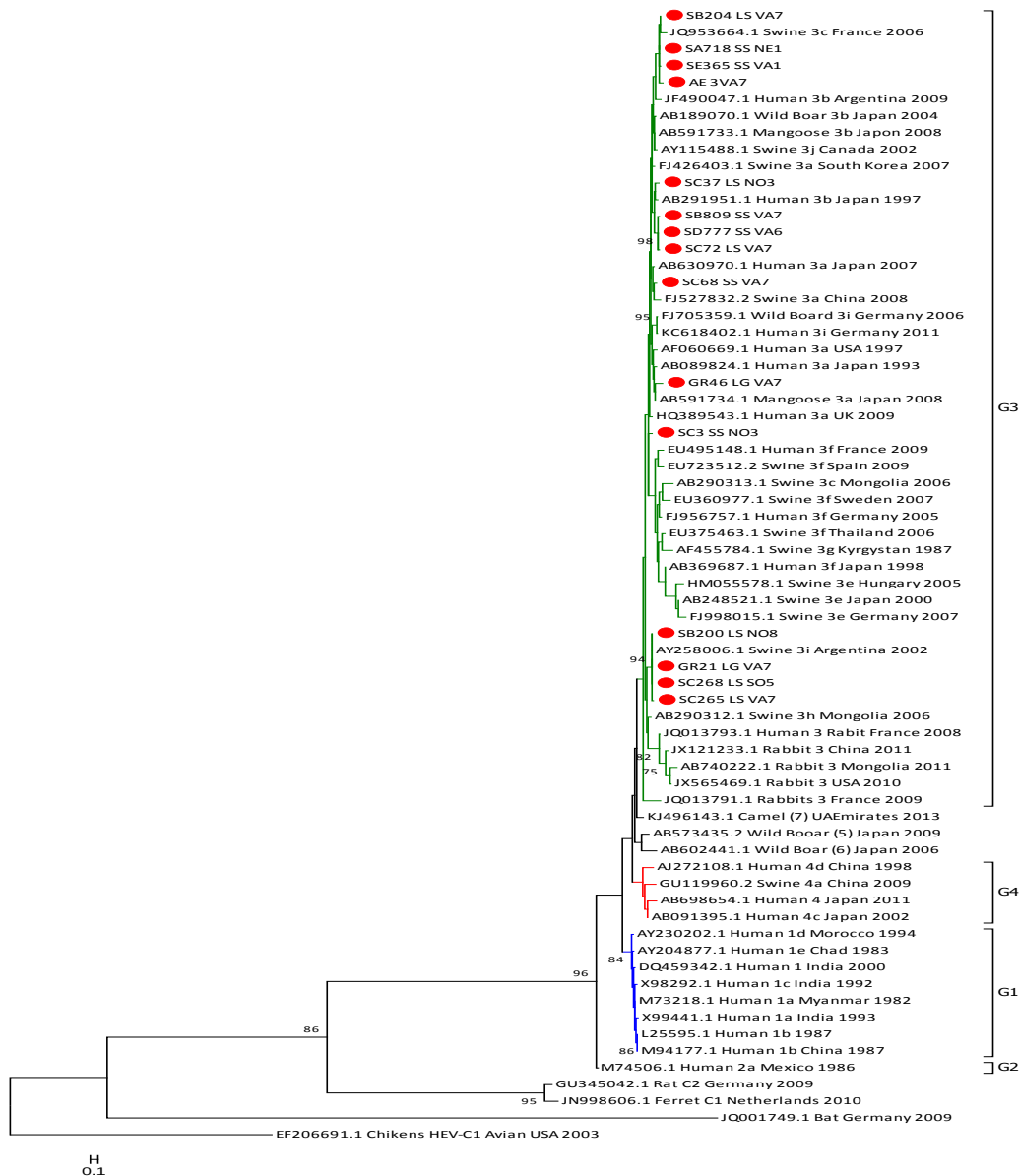


Figura 8.2. Árbol filogenético para el ORF1.

El árbol filogenético basado en las secuencias parciales de 119 nucleótidos de la metiltransferasa dentro del ORF1 del HEV fue construido por el método de Máxima Verosimilitud usando Hasegawa-Kishino-Yano + G como modelo de sustitución. (La longitud de la Barra representa una tasa de 0.1 sustituciones por sitio) Los valores de bootstrap de 1000 replicas Mayores a 60% son indicados. Las secuencias colombianas son indicadas con un punto rojo y fueron comparadas con secuencias de referencia de diferentes genotipos. Los números de acceso, el hospedero, el genotipo, el país de procedencia y el año de colección son indicados. (SA-SE): Plantas de beneficio. (GR): Expendios de carne (AE): Efluentes de granja.(LS): Hígados plantas de beneficio. (SS): Heces plantas de beneficio. (LG): Hígados de tienda. Valle de Aburrá (VA). Norte (NO). Noreste (NE). Oriente (OR). Suroeste (SO). Occidente (OCC)

8.3.3. Secuencias y análisis filogenético del HEV ORF2

El análisis de identidad de las 69 secuencias del ORF2 obtenidas en el estudio reveló la presencia de 20 haplotipos y fueron usadas para la reconstrucción evolutiva del ORF2. Las muestras con secuencias idénticas dentro de cada haplotipo y su relación entre las variantes antioqueñas son mostradas en los datos suplementarios (tabla S8.2 y la figura S8.2).

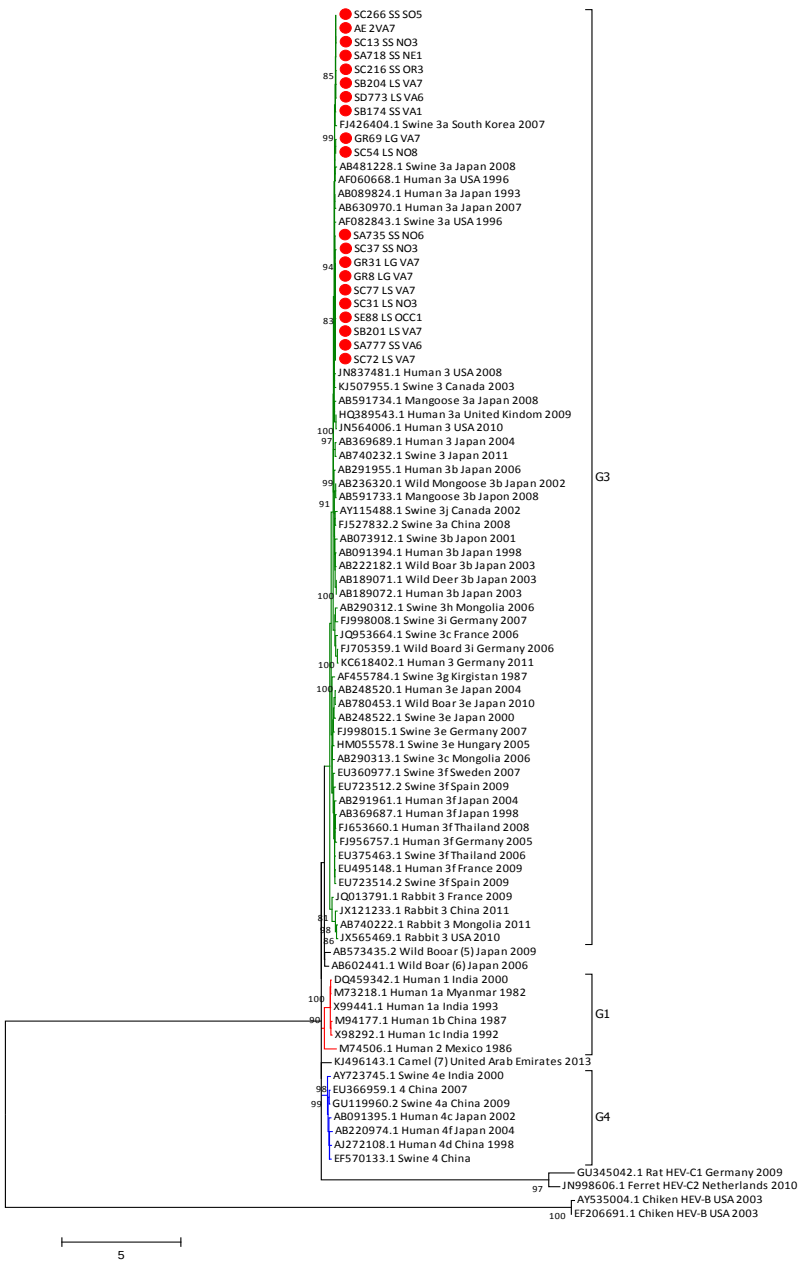
Las secuencias de los hígados de los cerdos 786, 735 y 718 obtenidas en plantas de beneficio fueron idénticas a las detectadas en las heces del cerdo correspondiente. De manera similar a lo encontrado para el ORF1, las secuencias **SC266_LS_SO7** y **SC266_SS_SO7** no fueron idénticas a pesar de que fueron obtenidas del mismo cerdo.

En el árbol filogenético obtenido para el ORF2 se observa que todos los haplotipos antioqueños detectados forman un grupo monofilético no muy bien soportado con las secuencias del genotipo 3 subgenotipo 3a, el cual incluye secuencias detectadas en cerdos y humanos de Estados Unidos de América (USA), Corea del Sur y el Reino Unido (UK). Dentro de este subgenotipo, las secuencias del estudio se agrupan en tres subclados bien soportados con valores de bootstrap mayores de 85% (Figura 8.3).

El primer subclado lo forman 8 secuencias detectadas en efluentes de granjas, hígados y heces de cerdos que provenían de 5 diferentes subregiones de Antioquia y están relacionados evolutivamente con la secuencia recuperada de un cerdo de Corea del Sur en 2007. El segundo subclado, donde se ubican una secuencia detectada en hígado de expendio de carne y otra detectada en hígado de planta de beneficio, están relacionadas con una secuencia obtenidas en humanos de USA en 1996 y a una secuencia de cerdo obtenida en 2008. Finalmente, el tercer subclado está conformado por secuencias de heces e hígados de obtenidos plantas de beneficio de las subregiones Norte, Valle de

Aburra y Occidente y dos secuencias que provenían de hígados de expendio, que no se agrupan con secuencias de otros países.

A



B

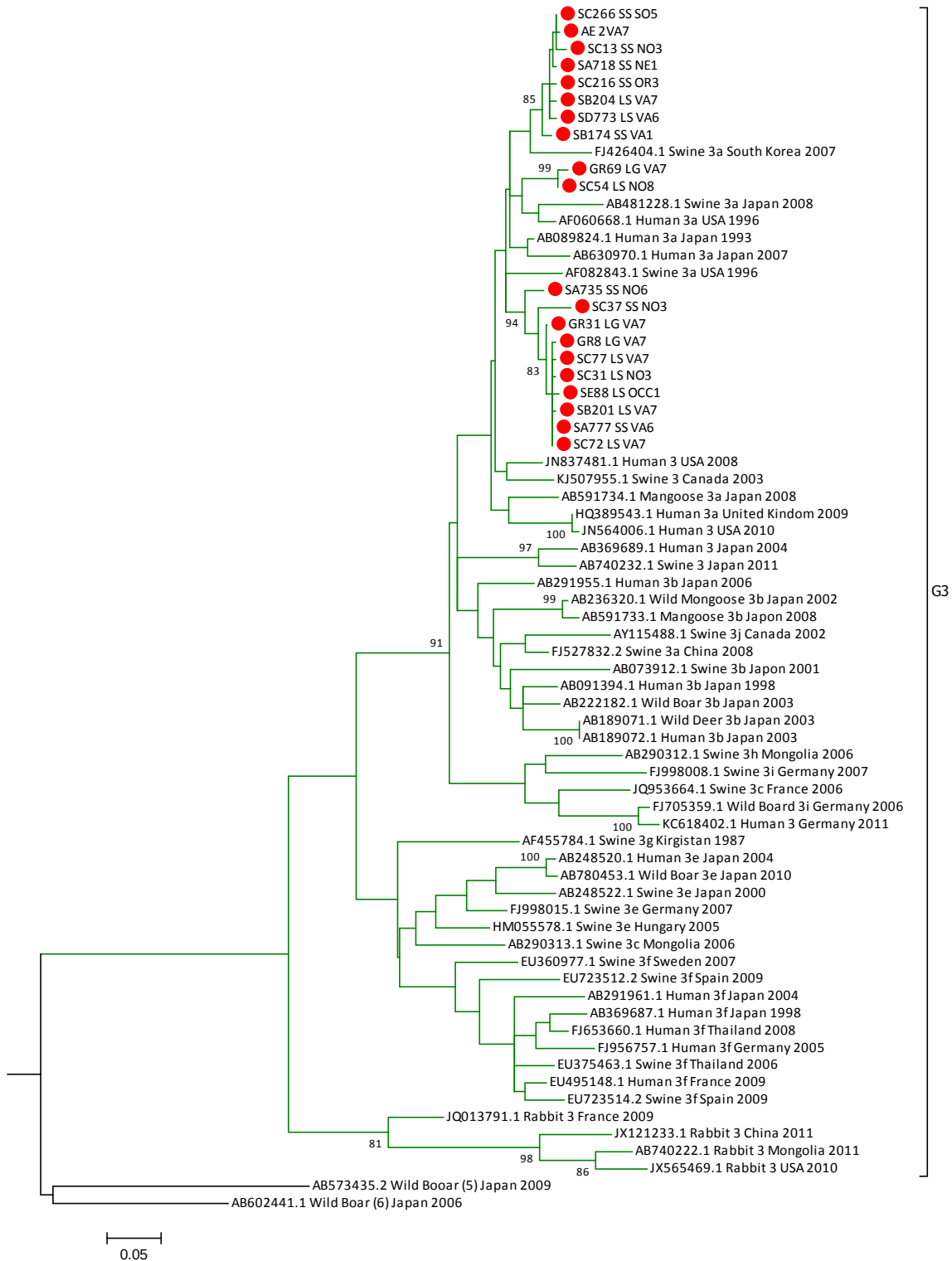


Figura 8.3. Árbol filogenético para el ORF2.

A: Árbol filogenético basado en las secuencias parciales de 288 nucleótidos del ORF2 y construido por el método de Máxima verosimilitud usando Tamura Nei +G+I como modelo

de sustitución. Este árbol fue enraizado utilizando secuencias de HEV de aves como outgroup. Los valores de bootstrap son indicados para 1000 replicas (la longitud de la Barra representa una tasa de 5 sustituciones por sitio). Las secuencias colombianas son indicadas con un punto rojo y fueron comparadas con secuencias de referencia de diferentes genotipos. Los números de Acceso, el hospedero, el genotipo, el país de procedencia y el año de colección están indicados. (**SA-SE**): Plantas de beneficio. (**GR**): Expendios de carne (**AE**): Efluentes de granja. (**LS**): Hígados plantas de beneficio. (**SS**): Heces plantas de beneficio. (**LG**): Hígados de tienda. Valle de Aburrá (**VA**). Norte (**NO**). Noreste (**NE**). Oriente (**OR**). Suroeste (**SO**). Occidente (**OCC**) **B**: subárbol que muestra la relación evolutiva con los Secuencias del genotipo 3. (La longitud de la Barra representa una tasa de 0.05 sustituciones por sitio)

8.3.4. Secuencias y análisis filogenético of HEV ORF2.1

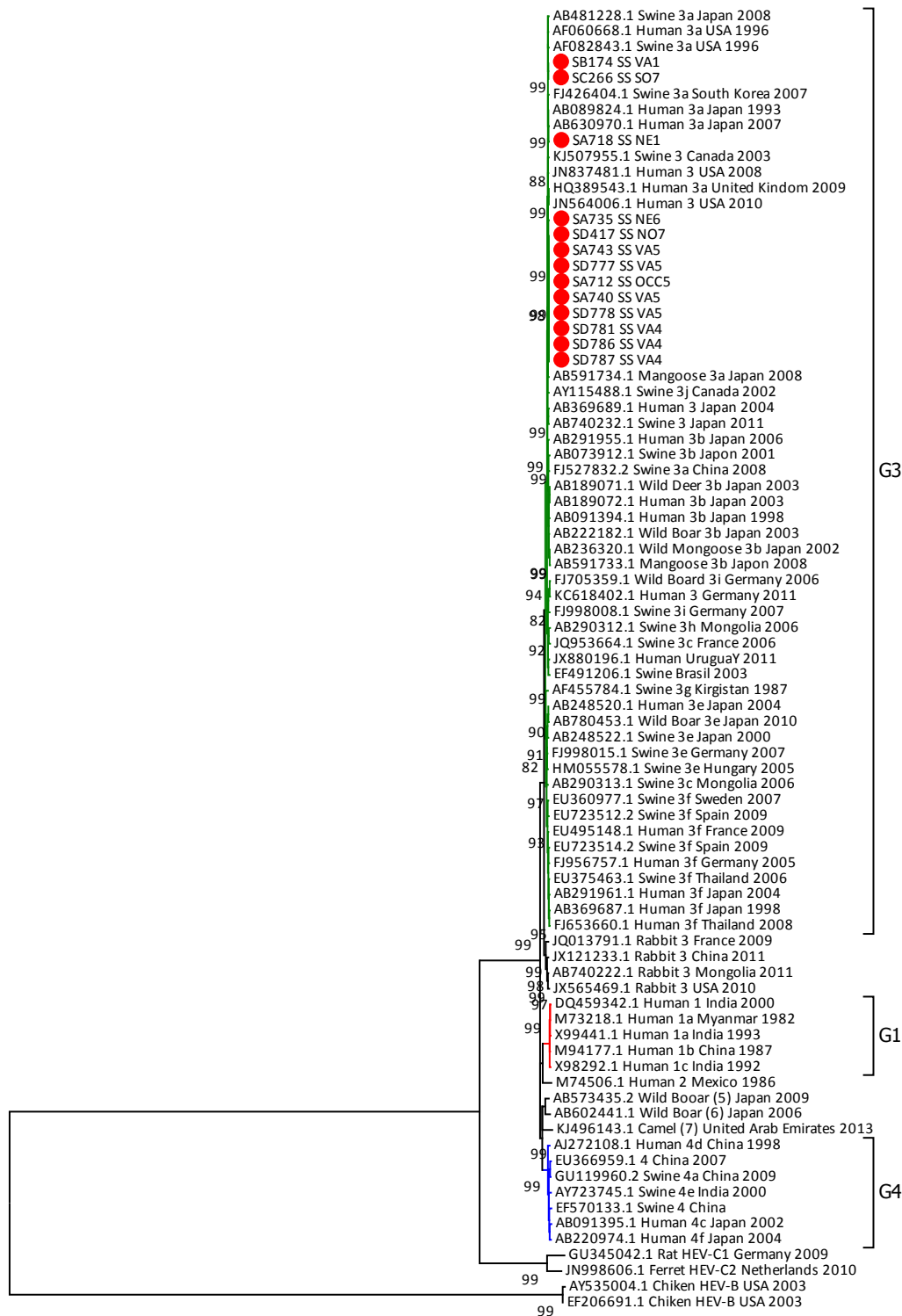
Con el objetivo de mejorar los soportes estadísticos y las inferencias evolutivas obtenidas a partir de los arboles filogenéticos, en este estudio se utilizó un protocolo de amplificación para la obtención de un fragmento de 958 pares de bases dentro del ORF2 del HEV (Mirazo *et al.*, 2013). Se logró obtener 13 secuencias de heces de cerdos en plantas de beneficio, pero no se logro obtener secuencias de este marcador en otras muestras. Cuatro de estas secuencias eran idénticas entre si lo que reduce a 9 el número de variantes o haplotipos (Datos suplementarios. Tabla S8.3 y Figura S8.3), sin embargo, las 13 secuencias fueron usadas para la construcción de los arboles filogenéticos para poder evidenciar el lugar de procedencia. Las secuencias se editaron hasta una longitud de 813 pb para incluir secuencias parciales reportadas en Uruguay y Brasil.

La reconstrucción filogenética confirma que los aislados colombianos no son monofileticos: ellos forman tres subclados (SC1. SC2 y SC 3) estadísticamente bien soportados dentro del subgenotipo 3a. Además los subclados formados por las cepas antioqueñas no muestran una estructuración relativa a la subregión de procedencia de los cerdos.

En el SC1 las secuencias SB_174_VA1 y SC_266_SO7 están relacionadas con las cepas de cerdo descritas en Japón y USA en 2008 y 1996 respectivamente. La variante SA_718_SS NE1 forma el SC2 junto con las secuencias detectadas en humanos de Japón en 1993 y en 2007, el resto de haplotipos antioqueños se

agrupan en el subclado SC3 sin mostrar relación monofilética con otras secuencias (Figura 8.3.B). La comparación de las secuencias colombianas con las subgenotipos 3a, 3b, 3c, 3f, 3g, 3j y 3i del HEV revelo porcentaje de Identidad del 91.80–92.41%, 82.17-89.16%, 85.66-86.03%, 82.77-85.18%, 83.98-84.82%. 88.07-90.36% y 87.11-87.47% respectivamente.

A



B

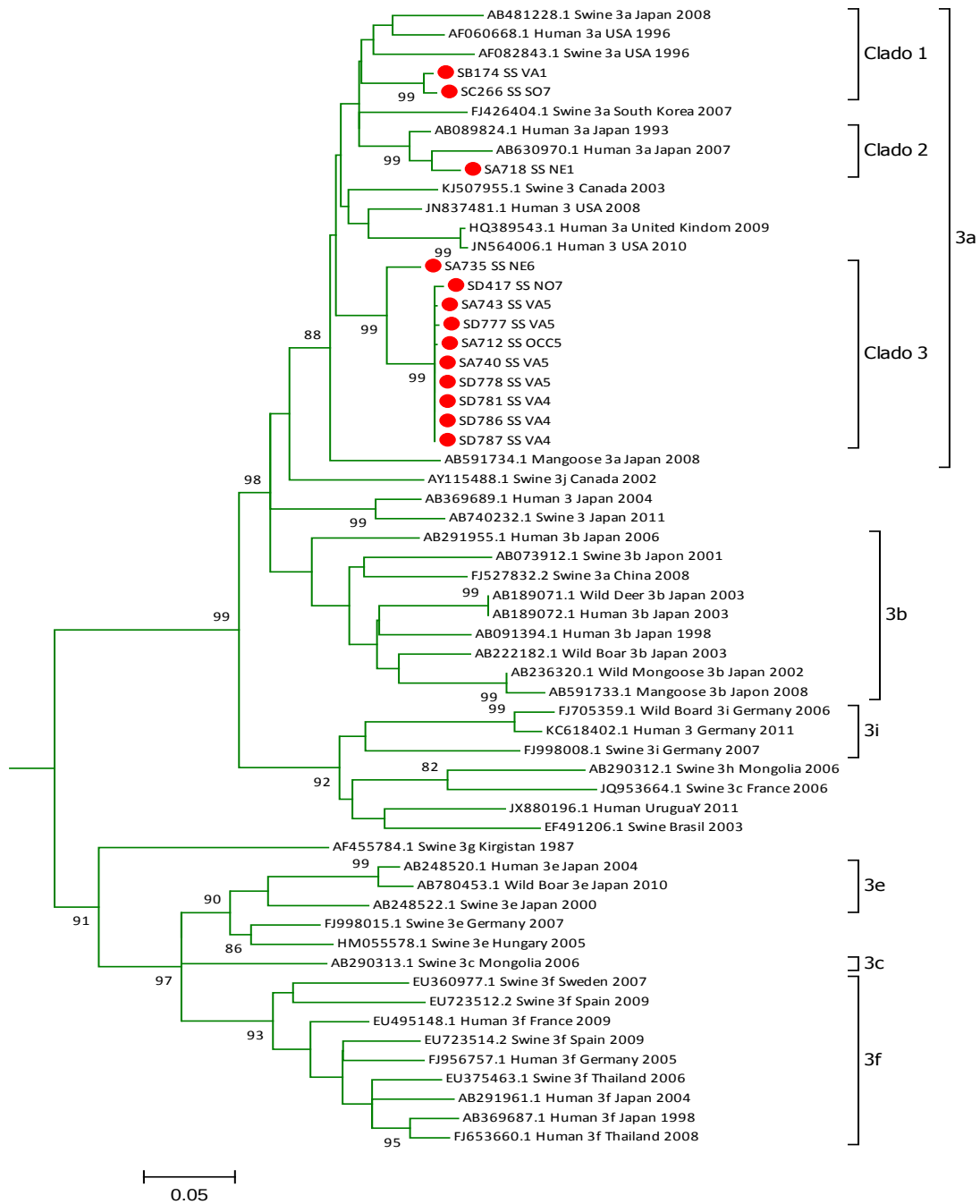


Figura 8.4. Árbol filogenético para el ORF2.1

A: Árbol filogenético basado en las secuencias parciales de 813 nucleótidos del ORF2 y construido por el método de Máxima verosimilitud usando el modelo general reversible (GTR)+G+I como modelo de sustitución. Los valores de bootstrap son indicados para 1000 replicas (La barra representa 5 sustituciones por sitio). Las secuencias colombianas son

indicadas con un punto rojo y fueron comparadas con secuencias de referencia de diferentes genotipos. Los números de acceso, el hospedero, el genotipo, el país de procedencia y el año de colección son indicados. **(SA-SE)**: Plantas de beneficio. **(GR)**: Expendios de carne **(AE)**: Efluentes de granja. **(LS)**: Hígados plantas de beneficio. **(SS)**: Heces plantas de beneficio. **(LG)**: Hígados de tienda. Valle de Aburrá **(VA)**. Norte **(NO)**. Noreste **(NE)**. Oriente **(OR)**. Suroeste **(SO)**. Occidente **(OCC)**. **B**: sub-árbol del genotipo 3 para mostrar la topología de las secuencias colombianas y su relación con los subgenotipos (La barra representa 0.05 sustituciones por sitio).

8.4. DISCUSIÓN

Estudios recientes han sugerido la circulación del HEV en Colombia: en un estudio en pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis viral, la seropositividad del HEV fue del 8.7%, de los cuales 1.7% fueron positivos para anticuerpos IgM (Peláez *et al.*, 2014). También se ha encontrado que personas que trabajaron durante más de un año como manipuladores de cerdo a los municipios vecinos valle de Aburrá presentaron una seropositividad 11.22% (Betancur *et al.*, 2013). Como se muestra en los capítulos previos, el 100% y el 87% de los cerdos a la edad de sacrificio en Antioquia presentan anticuerpos tipo IgG e IgM, respectivamente, mientras que la excreción del virus en animales provenientes de diferentes subregiones oscila entre el 14% y el 70%. Estos datos muestran que el virus está circulando en Antioquia, que es la región con mayor producción de cerdos en Colombia.

Contrario a la aplicación satisfactoria de los análisis genómicos de secuencias parciales para la genotipificación de los virus de la Hepatitis C y Virus de Hepatitis B, para el HEV no hay una propuesta comúnmente aceptada sobre cuál de las regiones dentro del genoma tiene mayor utilidad para identificar el genotipo. (Smith *et al.*, 2013, 2014). Sin embargo, un estudio reciente (Wang *et al.*, 2014) mostró que hay una región dentro del dominio de la proteasa que tiene una correlación filogenética alta con el genoma completo.

En este estudio se utilizaron tres segmentos correspondientes a sitios separados en el genoma y que han sido previamente utilizados con propósitos de diagnóstico y de tipificación (Fogeda *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2002; Mirazo *et al.*, 2013).

La comparación de las secuencias obtenidas en plantas de beneficio, expendios de carne o efluentes de granja reveló la presencia de 15, 20 y 9 haplotipos para el ORF1, ORF2 y ORF2.1, respectivamente. Todas estas secuencias se agruparon filogenéticamente con las secuencias del genotipo 3, subgenotipo 3a descritas previamente y de forma independientemente del segmento analizado, lo cual sugiere una baja diversidad del virus en nuestro medio.

Aunque los soportes de rama en la reconstrucción filogenética del ORF1 y son menores que para el ORF2 y ORF2.1, los árboles generados tienen topología similar, sugiriendo que no hay presencia de linajes recombinantes o que estos son infrecuentes. En todos estos árboles las secuencias de Antioquia se agruparon polifiléticamente en por lo menos tres clados, todos ellos dentro del subgenotipo 3a, intercalados con cepas de países lejanos como Japón o Estados Unidos. Las otras secuencias suramericanas disponibles, de Uruguay y Brasil, se agruparon en otro subgenotipo. Esto sugiere que el HEV ha sido introducido varias veces en Antioquia quizás desde regiones diferentes a las latinoamericanas, aunque esto no se puede afirmar categóricamente mientras no se disponga de secuencias HEV de igual extensión nucleotídica de los países vecinos.

Los haplotipos detectados y analizados no presentaron estructuración relativa a la subregión de procedencia; esto indica que las variantes del HEV presente en los cerdos en edad de beneficio en Antioquia no tienen una restricción geográfica y circulan libremente por las diferentes zonas de producción porcina del departamento.

Las topologías de los tres árboles fueron similares pero la ubicación de secuencias relativas a los subgenotipos se relacionaron de manera diferente en el árbol del ORF1 que para los del ORF2. Esto puede estar relacionado con la longitud de las secuencias utilizadas, pero también apoya la idea que la región metiltransferasa no es un sector que se correlacione fuertemente con el genoma completo para la determinación del genotipo (Wang *et al.*, 2014).

Existe un debate sobre la utilidad de la subgenotipificación como herramienta taxonómica formal, principalmente con la utilización de regiones parciales del genoma. Varios autores han mostrado que dada la variabilidad del genoma del HEV, en la clasificación propuesta por Lu *et al.*, 2006, no es posible definir límites que permitan distinguir a los subgenotipos con consistencia (Okamoto, 2007; Oliveira-Filho *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013) por lo tanto si bien los subgenotipos pueden oscurecer la clasificación taxonómica, esta puede ser útil en estudios epidemiológicos (Smith *et al.*, 2014).

La topología del árbol para el ORF2.1 muestra que las secuencias colombianas forman tres grupos bien soportados dentro del subgenotipo 3^a, junto a las cepas procedentes de Japón, Estados Unidos y Corea del Sur. El subgenotipo 3a se ha detectado también en países de la región como Brasil Argentina y Uruguay pero dada la relación distante con estos subgenotipos es probable que las variantes de los virus descritos en este estudio hayan sido introducidas a partir de cerdos importados de los Estados Unidos.

En tres cerdos captados en plantas de beneficio, se detectaron secuencias idénticas para el ORF1, tanto en las muestras de hígado como en las muestras de heces. Sin embargo, para otro de los cerdos la secuencia obtenida en el hígado no fue idéntica a la obtenida en las heces. Igual situación se presentó para el ORF2 en cerdos diferentes. Esta disparidad podría explicarse por la existencia de coinfección con dos variantes de las que circulan en las producciones porcinas de la región, como lo han sugerido otros autores (De Souza *et al.*, 2012).

Factores tales como el flujo de animales entre granjas, planes de control específicos de microorganismos prevalentes, co-infecciones virales / bacterianas, la existencia de subpoblaciones susceptibles no inmunes y las medidas de bioseguridad pueden influir en la dinámica de la infección en los cerdos (Casas *et al.*, 2011; Seminati *et al.*, 2008; Walachowski *et al.*, 2014), por estas razones, no es posible saber con exactitud cuál de estos factores tiene mayor peso en la dinámica de la difusión del HEV en el región.

En Colombia hay evidencia serológica de la circulación HEV en humanos pero hasta la fecha no se han reportado secuencias obtenidas en pacientes con signos clínicos de hepatitis, en consecuencia, ninguna asociación puede hacerse entre humanos y cerdos en este país, pero las cepas identificadas en este estudio podrían aportar información valiosa para el monitoreo del HEV en la población colombiana.

La presencia de las variantes del virus en hígados de cerdo de plantas de beneficio y en hígados comercializados en expendios de carne constituyen un potencial riesgo de infección para los consumidores de esta proteína animal y para los trabajadores de la cadena porcícola, especialmente aquellos que laboran en plantas de faenado (Galiana *et al.*, 2010; Gardinali *et al.*, 2012; Temmam *et al.*, 2013). Por otro lado, la presencia del virus en efluentes de granjas y en heces indica la posible contaminación de fuentes de agua si las aguas de desecho de las granjas entran en contacto con ellas.

En conclusión, este estudio proporciona la primera evidencia de la circulación de HEV subgenotipo 3a cuyas variantes circulan sin restricción geográfica por las producciones porcinas en Antioquia, potencialmente contaminando fuentes de agua e hígados comercializados en expendios de carne de la ciudad de Medellín. La heterogeneidad genómica entre cepas del HEV porcino colombiano descrita en este estudio, proporciona información importante acerca de la diversidad de las cepas circulantes de HEV que podría ser útil en el futuro, para planificar medidas adecuadas para la prevención y control de la infección en el país.

BIBLIOGRAFIA

- Betancur, C. A., Mejía, M. V & Portillo, S. (2013).** Seroprevalencia de hepatitis E en trabajadores de fincas porcícolas del Valle de Aburrá 2011-2012
Seroprevalence of hepatitis E in swine farms workers in Aburra Valley 2011-2012. *Acta Médica Colomb* **38**, 68–70.
- Casas, M., Cortés, R., Pina, S., Peralta, B., Allepuz, A., Cortey, M., Casal, J. & Martín, M. (2011).** Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet Microbiol* **148**, 27–34.
- Dalton, H. R., Pas, S. D., Madden, R. G. & van der Eijk, A. a. (2014a).** Hepatitis E Virus: Current Concepts and Future Perspectives. *Curr Infect Dis Rep* **16**, 1–10.
- Dalton, H. R., Kamar, N. & Izopet, J. (2014b).** Hepatitis E in developed countries: current status and future perspectives. *Future Microbiol* **9**, 1361–1372.
- Drexler, J. F., Seelen, a., Corman, V. M., Fumie Tateno, a., Cottontail, V., Melim Zerbinati, R., Gloza-Rausch, F., Klose, S. M., Adu-Sarkodie, Y. & other authors. (2012).** Bats Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus within the Family Hepeviridae. *J Virol* **86**, 9134–9147.
- Fogeda, M., Avellón, A., Cilla, C. G. & Echevarría, J. M. (2009).** Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J Med Virol* **81**, 1743–1749.
- Galiana, C., Fernández-Barredo, S. & Pérez-Gracia, M. T. (2010).** [Prevalence of hepatitis E virus (HEV) and risk factors in pig workers and blood donors]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **28**, 602–7.
- Gardinali, N. R., Barry, A. F., Otonel, R. A. A., Alfieri, A. F. & Alfieri, A. A. (2012).** Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**, 935–939.
- Gutiérrez-Vergara, C., Quintero, J., Duarte, J. F., Suescún, J. P. & López-Herrera, A. (2015).** Detection of hepatitis E virus genome in pig livers in Antioquia, Colombia. *Genet Mol Res* **14**, 2890–2899.
- Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2002).** Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine

hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol*.

Johne, R., Dremsek, P., Kindler, E., Schielke, A., Plenge-Bönig, A., Gregersen, H., Wessels, U., Schmidt, K., Rietschel, W. & other authors. (2012). Rat hepatitis E virus: Geographical clustering within Germany and serological detection in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Infect Genet Evol* **12**, 947–956.

Johne, R., Dremsek, P., Reetz, J., Heckel, G., Hess, M. & Ulrich, R. G. (2014). Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol* **27**, 212–229.

Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F. & Izopet, J. (2014). Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev* **27**, 116–138.

Kannan, H., Fan, S., Patel, D., Bossis, I. & Zhang, Y.-J. (2009). The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *J Virol* **83**, 6375–6382.

Koonin, E. V, Gorbalenya, a E., Purdy, M. a, Rozanov, M. N., Reyes, G. R. & Bradley, D. W. (1992). Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8259–8263.

Lu, L., Li, C. & Hagedorn, C. H. (2006). Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* **16**, 5–36.

Machnowska, P., Ellerbroek, L. & Johne, R. (2014). Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Vet Microbiol* **168**, 60–68.

Meng, X.-J. (2013). Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* **33**, 41–49.

Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C. & Arbiza, J. (2013). Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res* **173**, 364–370.

Okamoto, H. (2007). Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* **127**, 216–228.

- Oliveira-Filho, E. F., König, M. & Thiel, H. J. (2013).** Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet Microbiol* **165**, 148–154.
- Pavio, N., Meng, X.-J. & Renou, C. (2010).** Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* **41**, 46–66.
- Peláez, D., Hoyos, M. C., Rendón, J. C., Mantilla, C., Ospina, M. C., Cortés-Mancera, F., Pérez, O. L., Contreras, Lady, Estepa, Y. & other authors. (2014).** Hepatitis E virus infection in patients with clinical diagnosis of viral hepatitis in Colombia. *Biomédica* **34**, 354–365.
- Ruggeri, F. M., Di Bartolo, I., Ponterio, E., Angeloni, G., Trevisani, M. & Ostanello, F. (2013).** Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol* **36**, 331–344.
- Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N. & Martin, M. (2008).** Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* **175**, 130–132.
- Smith, D. B., Purdy, M. a & Simmonds, P. (2013).** Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol* **87**, 4161–4169.
- Smith, D. B., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S. U., Harrison, T. J., Meng, X.-J., Okamoto, H., Van der Poel, W. H. M. & Purdy, M. A. (2014).** Consensus Proposals for Classification of the Family Hepeviridae. *J Gen Virol* **95**, 2223–2232.
- De Souza, A. J. S., Gomes-Gouvêa, M. S., Soares, M. D. C. P., Pinho, J. R. R., Malheiros, A. P., Carneiro, L. A., Dos Santos, D. R. L. & Pereira, W. L. A. (2012).** HEV infection in swine from Eastern Brazilian Amazon: Evidence of co-infection by different subtypes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **35**, 477–485.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.
- Temmam, S., Besnard, L., Andriamandimby, S. F., Foray, C., Rasamoelina-Andriamanivo, H., Héraud, J.-M., Cardinale, E., Dellagi, K., Pavio, N. & other authors. (2013).** High prevalence of hepatitis E in humans and pigs and evidence of genotype-3 virus in swine, Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* **88**, 329–338.
- Tsarev, S. A., Emerson, S. U., Reyes, G. R., Tsareva, T. S., Legters, L. J., Malik, I. A., Iqbal, M., Purcell, R. H., Legters, L. J. & other authors. (1992).**

Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 559–563.

Walachowski, S., Dorenlor, V., Lefevre, J., Lunazzi, A., Eono, F., Merbah, T., Eveno, E., Pavio, N. & Rose, N. (2014). Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France. *Epidemiol Infect* **142**, 1934–1944.

Wang, S., Wei, W., Luo, X. & Cai, X. (2014). Genome-Wide Comparisons of Phylogenetic Similarities between Partial Genomic Regions and the Full-Length Genome in Hepatitis E Virus Genotyping. *PLoS One* **9**, 1–15.

Wedemeyer, H., Pischke, S. & Manns, M. P. (2012). Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* **142**, 1388–1397.

Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tsang, A. K. L., Joseph, M., Wong, E. Y. M., Tang, Y., Sivakumar, S., Xie, J. & other authors. (2014). New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis* **20**, 1044–1048.

DATOS SUPLEMENTARIOS

Tabla DS8.1. Secuencias del ORF1 obtenidas en el estudio con sus haplotipos representativos.

Haplotipo1	Haplotipo 2	Haplotipo 3	Haplotipo 4	Haplotipo 5	Secuencias Individuales
SD777_SS_VA6	SC268_LS_SO5	SA718_SS_NE1	GR46_LG_VA7	GR21_LG_VA7	SC72_LS_VA7
SD785_LS_VA4	SA707_LS_VA6	SA714_LS_NE1	SB201_LS_VA7	SC245_LS_VA2	SB809_SS_VA7
SD785_SS_VA4	SE151_LS_NO4	SC266_SS_SO7			SC37_LS_NO3
SD787_SS_VA4	SE149_LS_NO8	SE126_LS_NO3			SC3_SS_NO3
SD783_SS_VA4	SC47_LS_VA1	SE88_LS_OCC1.			SC68_SS_VA7
SD781_SS_VA4	SC32_LS_NO3	AE_2VA7.			SB204_LS_VA7
SD778_SS_VA6	SC12_LS_VA1				AE_3VA7
SD774_SS_VA6	SC10_LS_NO7				SE365_SS_VA1
SD773_LS_VA6					SB200_LS_NO8
SD773_SS_VA6					SC265_LS_VA7
SC67_LS_VA7					
SC56_LS_NO8					
GR48_LG_VA7					
GR47_LG_VA7					
SC40_LS_VA7					
SC37_SS_NO3					
SC30_LS_NO3					
SC26_LS_NO4					
SC26_SS_NO4					

Los códigos de las secuencias representativas de cada haplotipo o variantes genéticas son Indicadas en Negrilla y fueron utilizadas en los arboles. Debajo de cada secuencia representativa se indican las secuencias idénticas detectadas en el estudio..

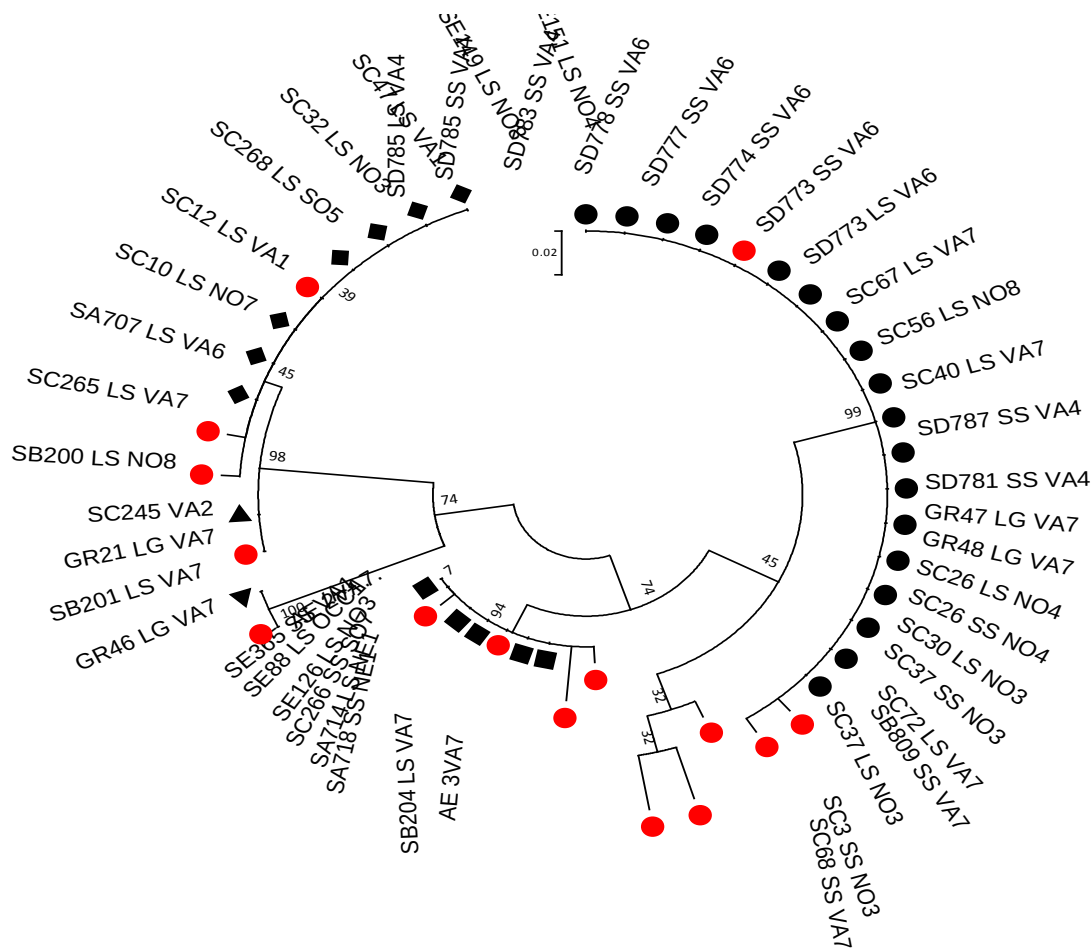


Figura DS8.1.Relación filogenética entre las secuencias colombianas para el ORF1.
 El árbol filogenético basado en 47 secuencias parciales de 119 nucleótidos de la metiltransferasa dentro del ORF1 del HEV, construido por el método de Máxima Verosimilitud usando Kimura dos parámetros +I como modelo de sustitución. (La longitud de la Barra representa una tasa de 0.02 sustituciones por sitio). Los valores de bootstrap de 1000 replicas son indicados. **(SA-SE):** Plantas de beneficio. **(GR):** Expendios de carne **(AE):** Efluentes de granja.**(LS):** Hígados plantas de beneficio. **(SS):** Heces plantas de beneficio. **(LG):** Hígados de tienda. Valle de Aburrá **(VA)**. Norte **(NO)**. Noreste **(NE)**. Oriente **(OR)**. Suroeste **(SO)**. Occidente **(OCC)**. Los haplotipos 1 (●). 2(■). 3(▼). 4(▲) 5(◆) son indicados. Los representantes de cada haplotipo y las secuencias individuales usadas para la comparación entre los genotipos del HEV en los arboles del texto principal son indicadas (●).

Tabla DS8.2. Secuencias del ORF2 obtenidas en el estudio con sus haplotipos representativos

Haplotipo1	Haplotipo 2	Haplotipo 3	Haplotipo 4	Haplotipo 5	Haplotipo 6	Haplotipo 7
SA777_SS_VA6	SC72_LS_VA7	SA735_SS_NO6	SC266_SS_SO7	AE_2VA7	SC13_SS_NO3	SA718_SS_NO6
SD795_LS_OR5	GR45_LG_VA7	SA735_LS_NO6	SC266_LS_SO7	AE_3VA7	SC15_SS_NO3	SA725_LS_NO6
SD787_SS_VA4		SA733_LS_NO6				SA718_LS_NO6
SD786_SS_VA4						SA715_LS_NO6
SD786_LS_VA4						SA714_LS_NO6
SD785_LS_VA4						SD401_LS_NO6
SD781_SS_VA4						SD379_LS_NO6
SA778_SS_VA6						SE116_LS_NO6
SA743_SS_VA5						
SA740_SS_VA5						
SA736_LS_NO6						
SA712_SS_OCC5						
SA707_LS_OCC5						
SD422_LS_NO7						
SD417_SS_NO7						
SD415_LS_NO7						
SD403_LS_NO8						
SD381_LS_SO6						
SC268_LS_SO5						
SB207_LS_NO3						
SB193_LS_NO3						
SE142_LS_NO8						
SE120_LS_VA1						
GR92_LG_VA7						
SE89_LS_OCC1						
SC82_LS_OCC1						
SC67_LS_VA7						
SC56_LS_NO8						
SC52_LS_NO7						
SC45_LS_OR1						
SC42_LS_VA7						
SC40_LS_VA7						
SC39_LS_VA7						
SC38_LS_VA7						
SC30_LS_NO3						
SC3_LS_NO3						
GR3_LG_VA7						

Los códigos de las secuencias representativas de cada haplotipo o variantes genéticas son Indicadas en Negrilla y fueron utilizadas en los arboles. Debajo de cada secuencia representativa se indican las secuencias idénticas detectadas en el estudio..

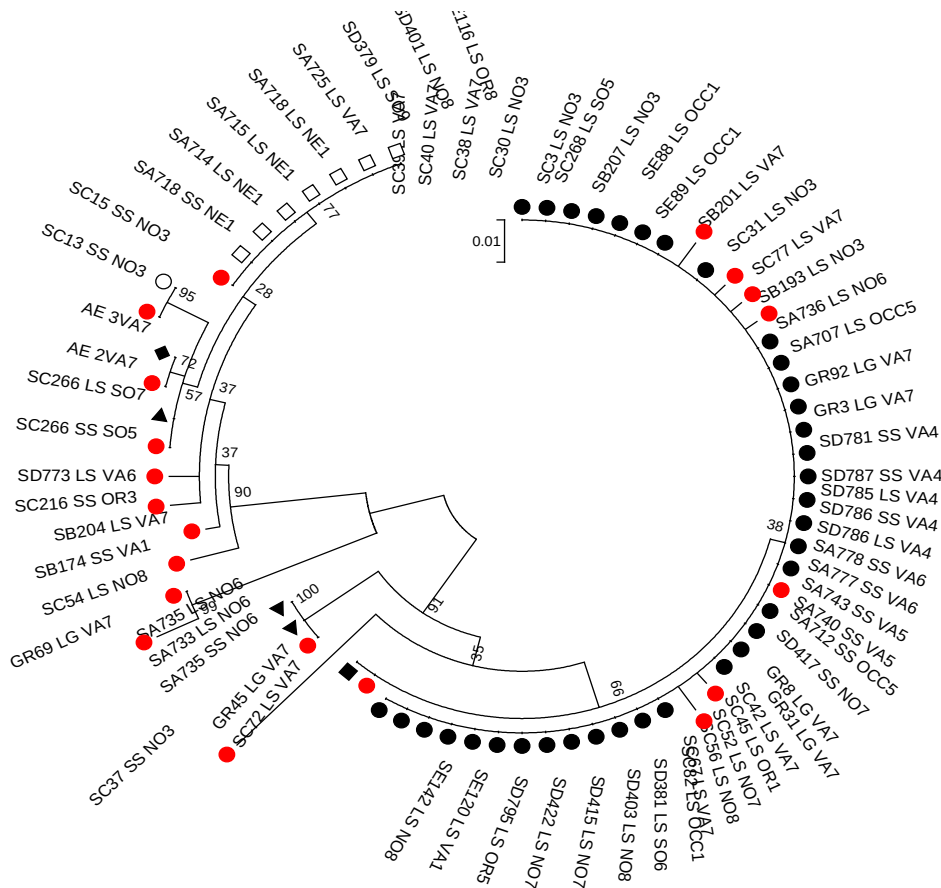


Figura DS8.2. Relación filogenética entre las secuencias colombianas para el ORF2
 Árbol filogenético basado 69 secuencias parciales de 288 nucleótidos de la cápside dentro ORF2 del HEV. construido por el método de Máxima verosimilitud usando Kimura dos parámetros +I como modelo de sustitución. (La longitud de la Barra representa una tasa de 0.01 sustituciones por sitio). Los valores de bootstrap obtenidos de 1000 replicas son indicados. (SA-SE): Plantas de beneficio. (GR): Expendios de carne (AE): Efluentes de granja.(LS): Hígados plantas de beneficio. (SS): Heces plantas de beneficio. (LG): Hígados de tienda. Valle de Aburrá (VA). Norte (NO). Noreste (NE). Oriente (OR). Suroeste (SO). Occidente (OCC). Los haplotipos 1 (●). 2(■). 3(▼). 4(▲) 5(◆) 6(○) y 7(□) son indicados. Los representantes de cada haplotipo y las secuencias individuales usadas para la comparación entre los genotipos del HEV en los arboles del texto principal son indicadas (●).

Tabla DS8.3 Secuencias del ORF2.1 obtenidas en el estudio con sus haplotipos representativos

Haplotipo 1	Secuencias Individuales
SD787_SS_VA4	SB174_SS_VA1
SD786_SS_VA4	SC266_SS_SO7
SD781_SS_VA4	SD417_SS_NO7
SD778_SS_VA5	SA712_SS_OCC5
SA740_SS_VA5	SA718_SS_NE1
	SA735_SS_NE6
	SA743_SS_VA5
	SD777_SS_VA5

Los códigos de las secuencias representativas de cada haplotipo o variantes genéticas son Indicadas en Negrilla y fueron utilizadas en los arboles. Debajo de cada secuencia representativa se indican las secuencias idénticas detectadas en el estudio

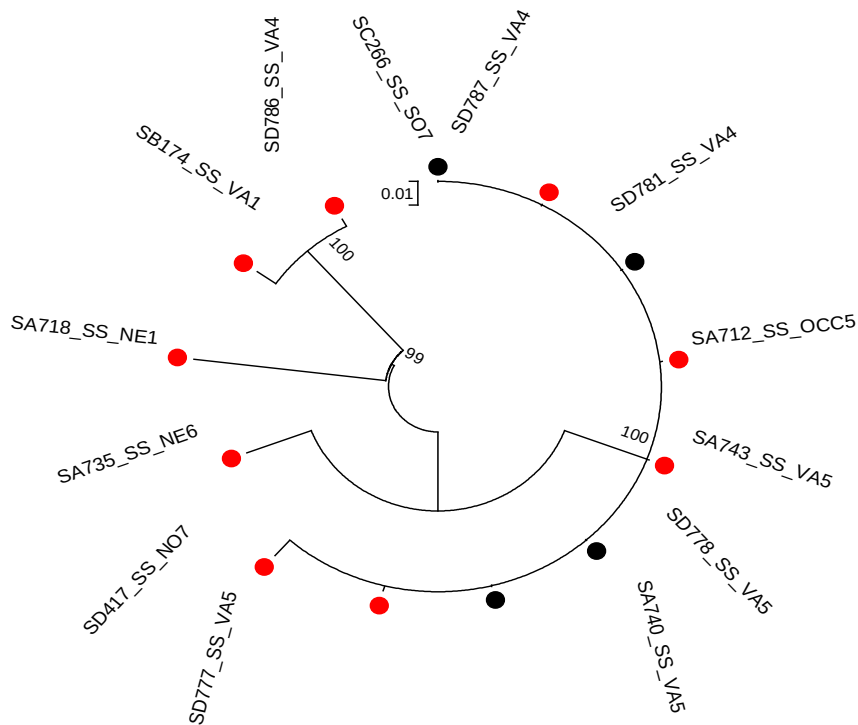


Figura DS8 3. Relación filogenética entre las secuencias colombianas para el ORF2.1.

Árbol filogenético basado 13 secuencias parciales de 814 nucleótidos de la cápside dentro ORF2 del HEV. construido por el método de Máxima verosimilitud usando Tamura Nei +G como modelo de sustitución como modelo de sustitución. (La longitud de la Barra representa una tasa de 0.01 sustituciones por sitio). Los valores de bootstrap obtenidos de 1000 replicas son indicados. (SA-SE): Plantas de beneficio. (GR): Expendios de carne (AE): Efluentes de granja.(LS): Hígados plantas de beneficio. (SS): Heces plantas de beneficio. (LG): Hígados de tienda. Valle de Aburrá (VA). Norte (NO). Noreste (NE). Oriente (OR). Suroeste (SO). Occidente (OCC). El haplotipo 1 (●). es indicado. Los representantes del haplotipo y las secuencias individuales usadas para la comparación entre los genotipos del HEV en los arboles del texto principal son indicadas ●

9. CAPITULO 5

El análisis de las secuencias del genoma completo de cepas de virus de la hepatitis E (HEV) encontradas en cerdos en Antioquia, Colombia

Analysis of the complete genome sequences of swine HEV strains detected in Antioquia, Colombia

Jorge E. Forero D^{1,2} PhD, Ph.D, Milagros Muñoz³ MSc, Albeiro López-Herrera¹

Francisco Javier Diaz⁴ José Manuel Echevarría³ Ph.D, Ana Avellón³ Ph.D.

1. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Producción Animal, Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM. Calle 59A No.63-20, Autopista Norte, Bloque 50, Piso 3, Oficina 310. Medellín, Colombia.

2. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Laboratorio de Patología Veterinaria, Grupo de Investigación en Patobiología QUIRON, Calle 70 No. 52-21. Medellín, Colombia.

3. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Microbiología Área de Virología. Laboratorio de Hepatitis. Cra. Majadahonda a Pozuelo Km.2. Majadahonda 28220 Madrid. España

4 Grupo de Inmunovirología Facultad de Medicina Universidad de Antioquia. Sede de Investigación Universitaria, Calle 62 N° 52-59, laboratorio 532, Medellín, Colombia

RESUMEN

En estudios epidemiológicos, es muy común usar la detección de regiones parciales del genoma del HEV; sin embargo, la gran variabilidad del genoma de este virus puede conducir a errores en su detección. Además, los análisis de secuencias parciales tienen menor resolución y soporte estadístico, no permiten apreciar la variación del genoma en toda su dimensión, ni detectar fenómenos de recombinación entre diferentes linajes. Análisis filogenéticos previos de regiones parciales del ORF1 y el ORF2 del HEV en muestras de cerdo en edad de beneficio en Antioquia (Colombia) mostraron que las cepas que circulan en la región pertenecen al genotipo 3 subgenotipo 3a. Con el objetivo de ampliar la caracterización molecular de los virus presentes en Colombia, muestras de heces de cerdo positivas para el virus fueron sometida a secuenciación completa de las regiones codificantes del HEV usando un conjunto de cebadores para la amplificación en bloques solapantes. Mediante esta estrategia se obtuvo la secuenciación completa de las regiones codificantes para una de las muestras evaluadas. Para otras tres muestras se logró obtener información del 99.3%, 99.0% y 94.5% de la secuencias esperadas. El análisis filogenético confirmó que las cepas que circulan en los cerdos de Antioquia pertenecen al genotipo 3a y sugiere que han presentando divergencia evolutiva a partir de dos introducciones. Para nuestro conocimiento esta es la primera cepa de HEV para la que se tiene información de la secuencia completa de las regiones codificantes del virus y constituye una base importante para la caracterización epidemiología de los virus que circulan en e Colombia.

ABSTRACT

The use of partial sequences of HEV genome is common In epidemiological studies, however the genome variability of virus can lead to errors in the classification of new isolated. Previous phylogenetic analysis of ORF1 and ORF2 in pigs at slaughter age in Antioquia (Colombia) showed that strains circulating in

the region belong to genotype 3 subgenotype 3a. With the aim to expanding the molecular characterization of the virus present in Colombia, pig fecal samples were subjected to complete sequencing of the coding regions of the HEV using a set of primers for amplification of the virus into overlapping blocks. Using this strategy complete sequence of the coding regions was obtained in a feacal sample. In other Three samples was sequencing in a 99.3%, 99.0% and 94.5% of the expected secuenciencias. Phylogenetic analysis confirmed that the circulating strains in Colombian pigs belonging to genotype 3a.. To our knowledge this is the first strain of HEV of the complete sequence in coding regions of the virus and constitutes a starting point to epidemiology characterization of the circulating virus in Colombia.

9.1. INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis E (HEV) es un virus de transmisión fecal-oral ampliamente distribuido en el mundo, puede causar enfermedad hepática en humanos y tiene al cerdo doméstico como su principal reservorio (Meng, 2013; Pavio *et al.*, 2015; Yugo & Meng, 2013).

El genoma del HEV es tipo RNA, de cadena sencilla y de sentido positivo que se extiende aproximadamente por 7.2 kb. En el extremo 5' tiene un residuo de 7 metilguanina seguido de una región no codificante (Non-Coding Region: NCR) corta de 59 nucleótidos seguida de tres marcos de lectura abierta (Open Reading Frames: ORFs), otra NCR de 65 nucleótidos hacia el extremo 3' y finaliza con una cola de poli A. El ORF1 codifica las proteínas no estructurales metiltransferasa (Met), cistein-proteasa (Pro), helicasa, (Hel) y la RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd). El ORF2 codifica para las proteínas de la cápside. El ORF3, el cual se sobrelapa en el ORF2, codifica para una fosfoproteína que interactúa con el citoesqueleto y también disminuye la expresión de genes inducidos por el interferón (Dong *et al.*, 2012; Graff *et al.*, 2006; Panda & Varma, 2013).

Aunque se reconoce un solo serotipo, el HEV presenta una gran variabilidad genética que se deduce de los análisis de genoma completo de cepas obtenidas en diversos hospederos (Johne *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2013), lo que ha derivado en propuestas de clasificación taxonómica más amplia que la actual (Oliveira-Filho *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013, 2014), la cual solo considera la existencia de cuatro genotipos (HEV-1 al HEV-4) que infectan principalmente a humanos y cerdos.

Una genotipificación confiable del virus es importante para entender la epidemiología y la dinámica de infección (Lam *et al.*, 2010; Zehender *et al.*, 2014). La clasificación por subgenotipos propuesta por Lu *et al.*, año ha sido ampliamente usada para entender las relaciones evolutivas de los virus que circulan en las

diferentes regiones del mundo; sin embargo, el constante aumento del número de secuencias reportadas ha forzado la definición de nuevas variantes que no se acomodan a los parámetros delineados para la definición de subgenotipos (Oliveira-Filho *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013); por otra parte los reportes de genomas completos han generando discrepancias en la clasificación (Okamoto *et al.*, 2001; Oliveira-Filho *et al.*, 2013).

Aunque para la genotipificación del virus algunas regiones genómicas muestran buenas correlaciones con el genoma completo, no existe un consenso en la extensión ni en la región del genoma que adecuadamente permita establecer relaciones evolutivas entre las cepas que circulan en el mundo (Bobek *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2006). Además, si bien la utilización de secuencias parciales del genoma en los estudios epidemiológicos son una herramienta rápida y efectiva para establecer la presencia del virus en diferentes nichos ecológicos, pueden llevar a la pérdida de información genética necesaria para la caracterización de los factores de virulencia (Lam *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2006).

En Colombia recientes estudios en proceso de publicación han demostrado la presencia del genoma viral en muestras de heces e hígados de cerdos en etapa de finalización. Igualmente se ha reportado la presencia de este en hígados de expendios de carne y de efluentes de granjas porcícola (Forero *et al.*, 2014; Gutiérrez-Vergara *et al.*, 2015). Análisis filogenéticos previos mostraron que la cepa circulante en los cerdos antioqueños pertenece al genotipo 3 subgenotipo 3a, los cuales forman 3 subclados que parecen corresponder a distintas introducciones del virus al país (Capítulo 5). Con el objetivo de obtener información más detallada que permita determinar el origen de las cepas circulantes en los cerdos del departamento de Antioquia (Colombia), en este estudio se presenta la caracterización y análisis filogenético de las regiones codificantes del genoma completo del HEV obtenidas a partir de muestras de heces de cerdos en edad de beneficio.

9.2. MATERIALES Y MÉTODOS

9.2.1. Muestras de heces.

Para la amplificación del genoma completo del HEV siete muestras de materia fecal de cerdos beneficiados en Antioquia fueron escogidas por su positividad para detección del genoma del HEV siguiendo el protocolo reportado por Mirazo (Mirazo *et al.*, 2013). Para mantener la confidencialidad de las plantas de beneficio y de los municipios de procedencia, las muestras están codificada así: las dos letras iniciales identifican las 5 plantas de beneficio (SA, SB, SC, SD y SE), un número consecutivo; el tipo de muestra heces (SS); la subregión de procedencia, Valle de Aburrá (VA), Noreste (NE), Suroeste (SO), seguido de un número para diferenciar los municipios específicos de la subregión. Las muestras usadas fueron: **SC266_SS_SO7, SD718_SS_NE1, SD777_SS_VA6, SD781_SS_VA4, SD778_SS_VA6, SD786_SS_VA6 y SD787_SS-VA4.**

Las características de los cerdos y los valores para los marcadores serológicos, moleculares e histológicos de los cerdos de donde se obtuvieron las siete muestras son presentadas en los datos complementarios. **Tabla DS9.1.**

9.2.2. Extracción RNA y preparación de cDNA.

Un gramo de heces se resuspendió en 10ml de un tampón de sales de fosfato (PBS) estéril tratado con DEPC a una concentración de 10% p/v, la cual se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm; 140 µl del sobrenadante se sometieron a extracción de RNA mediante el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue guardado en –80°C hasta su utilización. El cDNA fue preparado a partir de 5 µl RNA utilizando el estuche comercial RevertAid Enzyme Mix (Fermentas, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante y usando como iniciador de la retrotranscripción hexanucleótidos al azar “random hexamer” (Fermentas, USA). La retrotranscripción se incubó por 10 min a 25°C, luego 60 min

a 43,5 °C y un período final de incubación de 5 minutos a 72 °C. Un volumen final de 50 µl fue preparado para realizar los ensayos de secuenciación completa.

9.2.3. Diseño de los cebadores para la amplificación por bloques del genoma

Para la amplificación de las regiones codificantes del genoma del HEV se utilizó la estrategia de “primer walking”, mediante el diseño de cebadores que amplificaron 12 regiones del genoma del HEV usando protocolos de RT-PCR anidada sobrelapantes. El diseño de cebadores de cada bloque de amplificación se realizó con base en 70 de secuencias del genoma completo del VHE genotipo 3, reportadas en el GenBank (NCBI National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para la elección de los cebadores se consideraron parámetros como extensión de los cebadores (de aproximadamente 20 nucleótidos), alineamiento en regiones conservadas principalmente en los extremos 3' de los cebadores, ajuste de las temperatura teóricas de hibridación entre 50-60°C, no complementariedad entre bases y contenido de G+C menor o igual al 50%. Los cebadores escogidos y las temperaturas de hibridación son presentados en la tabla 9.1

Tabla 9.1. Cebadores empleados para la amplificación del genoma completo del HEV

Bloques	Primera Reacción				Reacción Anidada			
	Cebadores S	Cebador A	T °C	pb	Cebadores S	Cebador A	T °C	pb
BL.I	ACGYATGTGGT CGAWGCCATG	AARAGCATRAG CCGRTCCCA	60	975	TCGAWGCCATG GAGGCCCA	GTCATCCCRTGI CGRGCCAT	60	539
BL.II	ATGGCCCCGICA YGGGATGAC	AAIGGRTTIGCI GAYTCCCA	60	1530	ATYTGGGAYCG GCTYATGCT	CCRTGRACIGC RTARGETCCC	60	600
BL.III	TCGAWGCCAT GGAGGCCCA	CCRTGRACIGC RTARGETCCC	60	1562	GCTGTGGTGGT YCGGCCGTT	CGR CAY TGI GCR TAR AAC TG	57	1194
BL.IVS	GGCYTAYGARG GITCIGARGT	GGGCGRTGRTT RCGYTCCCA	57	1498	GGCYTAYGARG GITCIGARGT	AAIGGRTTIGCIG AYTCCCA	54	564
BL.IVN	GGCYTAYGARG GITCIGARGT	GGGCGRTGRTT RCGYTCCCA	57	1498	TRTGGYTRCAY CCYGAGGG	GTYTICIGRTAY GCYGCCTC	54	896
BL.VS	TRTGGYTRCAY CCYGAGGG	CTRGCRTRCGC YGTRGCTAT	57	1749	AGGRTYGARCA GAAYCCIAAGAG	CGRTGIGTIACR TGCCACCA	54	465
BL.VN	TRTGGYTRCAY CCYGAGGG	CTRGCRTRCGC YGTRGCTAT	57	1749	GAGCTYCGIAAY AGYTGGCG	CTRGCRTRCGC YGTRGCTAT	54	667
BL.7	CTYGGYGAYCC IAAYCAGAT	ACATCRACACA RACCTGCCG	57	1761	GAYGTITGYGAR CTYATACG	TCCTGRCCCTT YTACCAT	50	792

BL.8	CTYGGYGAYCC IAAYCAGAT	ACATCRACACA RACCTGCGC	57	1761	ATAGTYCAYTG YCGIATGGC	CARACCTGCGC IACRTTCGT	50	1035
BL.9	ATGGARGARTG YGGYATGCC	GGGTTGGTTGG ATGAATATAGG GG	57	838	GGAAYACYGT TGAAYATGGC	TTGGTTGGATG AATATAGGGGA GGG	57	697
BL.10	TGCCTATGYTG CCCGCGC	ACWGYGCGCT CACCATTGGC	57	1412	TGCCTATGYTG CCCGCGC	GGCYGARACRA CIGGGCGGG	57	1076
BL.11	GCIGCYACRCGI TTYATGAA	TTYTAAGRCGC TGAAGYTCAG	57	897	CCGACAGAATT RATTCGTCGG C	TCMGGRCARAA ATCACCRAAAG T	57	715

Cebador S: cebador sentido, Cebador A: cebador antisentido. Se presentan las secuencias de los cebadores, la temperatura de hibridación y el tamaño predicho de los amplicones en la primera reacciona y la reacción anidada de cada en cada uno de los bloques.

Los detalles del diseño de los 12 bloques de amplificación que cubren las posiciones nucleotídicas 22 a 7302, las cuales comprenden los tres ORFs del HEV se detallan en otra parte (Muñoz et al. Manuscrito en preparación) datos sin publicar). Los bloques de amplificación y su ubicación relativa se muestran en la Figura 9.1.

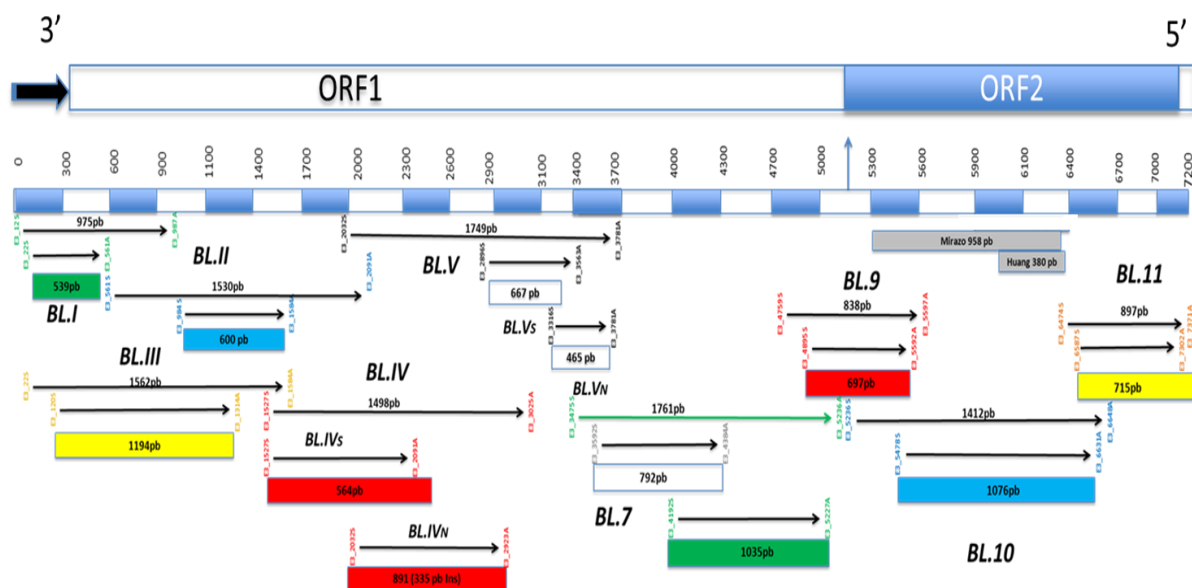


Figura 9.1. Representación Esquemática de los bloques de amplificación del HEV.

En la parte superior se esquematiza la extensión del ORF1 y el ORF2 del genoma del HEV. Debajo de la regla azul y blanca, en barras de color, se indica la posición relativa de cada bloque de amplificación y el tamaño del amplicon esperado. Las flechas señalan la posición relativa de los cebadores de acuerdo a la secuencia del genotipo 3. Número de acceso GenBank : AB630970.1. Los Bloques grises en el ORF2 indican el tamaño y posición de las regiones de amplificación que se obtienen al usar los protocolos de Mirazo *et al.*, 2013 y Huang *et al.*, 2002.

Los productos obtenidos para cada uno de los bloques mediante los protocolos de las PCR anidadas se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y fueron purificados usando el estuche QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron enviados para su secuenciación al servicio de secuenciación de Centro Nacional de Microbiología del Instituto Nacional de Salud Carlos III. Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas usando el programa Seqman (DNASTAR, Lasergene Inc.).

9.2.5. Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con secuencias completas de los cuatro genotipos reportadas en GenBank. El número de acceso, especie hospedera, país de procedencia, año de muestreo y genotipo reportado se incluyen en la denominación de las secuencias. El algoritmo Muscle y el criterio de información de Akaike corregido (AIC_c) implementados en el paquete MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013) fueron utilizados para el alineamiento de las secuencias y para la selección del modelo de sustitución que mejor se ajustaba a los datos, respectivamente. El análisis filogenético fue ejecutado por el método de inferencia bayesiana implementado en el paquete MrBayes v3.2.2 (Huelsenbeck, 2001). Dos búsquedas independientes cada una de cuatro cadenas markovianas (MCMC) fueron ejecutadas simultáneamente muestreando una de cada 1000 generaciones. Los análisis fueron corridos hasta que ambas búsquedas alcanzaron una buena convergencia y un tamaño de muestra efectivo (ESS) adecuado para todos los parámetros estimados, de acuerdo a la medición realizada con el programa Tracer v1.6.0 (Rambaut A, Suchard MA, 2014). El árbol filogenético resultante fue estimado con un descarte (burnin) del 25% de las generaciones iniciales y fue dibujado con el programa FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2015).

9.3. RESULTADOS

9.3.1. Verificación de la amplificación de las muestras en cada uno de los bloques.

Las muestras SC266_SS_SO7, SD718_SS_NE1, SD777_SS_VA6, y SD781_SS_VA4, fueron positivas para la amplificación de los doce bloques diseñados para la secuenciación del virus, mientras que la muestra SD778_SS_VA6, fue positiva para nueve de ellos. Las muestras SD786_SS_VA6 y SD787_SS_VA4 fueron positivas para 5 y 4 de los bloques respectivamente. Los protocolos de amplificación correspondientes a BL.I, BL.III y BL.9, lograron amplificar todas las muestras analizadas mientras que para los Bloques BL.IVN y BL.VS fallaron en la amplificación de 3 de las muestras (Tabla 9.2).

Tabla 9.2 Verificación de la amplificación de las muestras para cada uno de los bloques

		SC266_S		SD718_S		SD777_S		SD781_S		SD778_S		SD786_S		SD787	
BLO	P	Gel	Q	Gel	Q	Gel	Q	Gel	Q	Gel	Q	Gel	Q	Ge	Q
BL.I	53 9	Pos	B ^S B ^{AS}	Pos	B B	Pos	B M	Pos	B B	Pos	B B	Pos	B B	Pos	B B
BL.II	60 0	Pos	A A	Pos	A A	Pos	M A	Pos	A A	NE G	- -	Neg	- -	Pos	M M
BL.III	11 94	Pos	B B	Pos	A A	Pos	M M	Pos	A A	Pos	A A	Pos	M B	Pos	A A
BL.I VS	56 4	Pos	A A	Pos	M B	Pos	A M	Pos	M A	Pos	A A	Neg	- -	Neg	- -
BL.I VN	89 6	Pos	B B	Pos	B A	Pos	M M	Pos	M M	Neg	- -	Neg	- -	Neg	- -
BL.V S	46 5	Pos	A M	Pos	A A	Pos	A M	POS S	A M	NE G	- -	Neg	- -	Neg	- -
BL.V N	66 7	Pos	A M	Pos	A B	Pos	A B	Pos	M A	Pos	A M	Neg	- -	Neg	- -
BL.7	79 2	Pos	M M	Pos	A B	Pos	B B	Pos	M A	Pos	B B	Neg	- -	Neg	- -
BL.8	10 35	Pos	B B	Pos	A B	Pos	B B	Pos	B B	Pos	B M	Neg	- -	Neg	- -
BL.9	69 7	Pos	A M	Pos	A B	Pos	B M	Pos	B B	Pos	B B	Pos	B B	Pos	B B

BL.1 0	10 76	Pos	M A	Pos	A A	Pos	M B	Pos	A A	Pos	A M	Pos	A A	Ne g
BL.1 1	71 5	Pos	B B	Pos	B B	Pos	A B	Pos	B A	Pos	B B	Pos	A B	Ne g

La tabla indica las muestras positivas en los geles de agarosa para la amplificación de cada uno de los bloques. Los tamaños moleculares en pares de bases (PB) para cada bloque son indicados. Q: Calidad de la amplificación según los electroferogramas son indicados donde M: Malo A: Aceptable B: Bueno según la inspección subjetiva e intuitiva de el tamaño y extensión de los picos y la presencia de ruido en los electroferogramas, tanto para la secuencia sentido (S) como para la muestra antisentido (AS).

9.3.2. Ensamblaje de las bloques para determinación de las regiones codificantes del virus.

Las secuencias obtenidas en cada bloque para cada una de las muestras fueron ensambladas usando como referencia la secuencia AB630970.1 correspondiente a una cepa del genotipo 3a obtenida en humanos del Japón en 2007. Cuatro de las siete muestras evaluadas fueron positivas para la amplificación de los 12 bloques de secuenciación diseñados; sin embargo, la calidad de los electroferogramas solamente fue adecuada para deducir la secuencia completa de las regiones codificantes para la cepa SD718_SS_NE1. Para la cepa SC266_SS_SO7, no se obtuvo información de 47 nucleótidos del gen de la cápside, mientras que para las cepas SD777_SS_VA6, y SD781_SS_VA4 no se logró obtener la secuencia de tres pequeños sectores del ORF1 correspondientes a los dominios Prolina (P), Macrodominio (X) y Helicasa (Hel), perdiéndose la información del 1% y 5.5% respectivamente, de la secuencias nucleotídicas esperadas. Para las muestras SD778_SS_VA6, SD786_SS_VA6 y SD787_SS_VA4 no se obtuvo información en el 29.2%, 49,2% y 64.3% de la secuencia esperada y no fueron tenidas en cuenta para posteriores análisis. Figura 9.2.

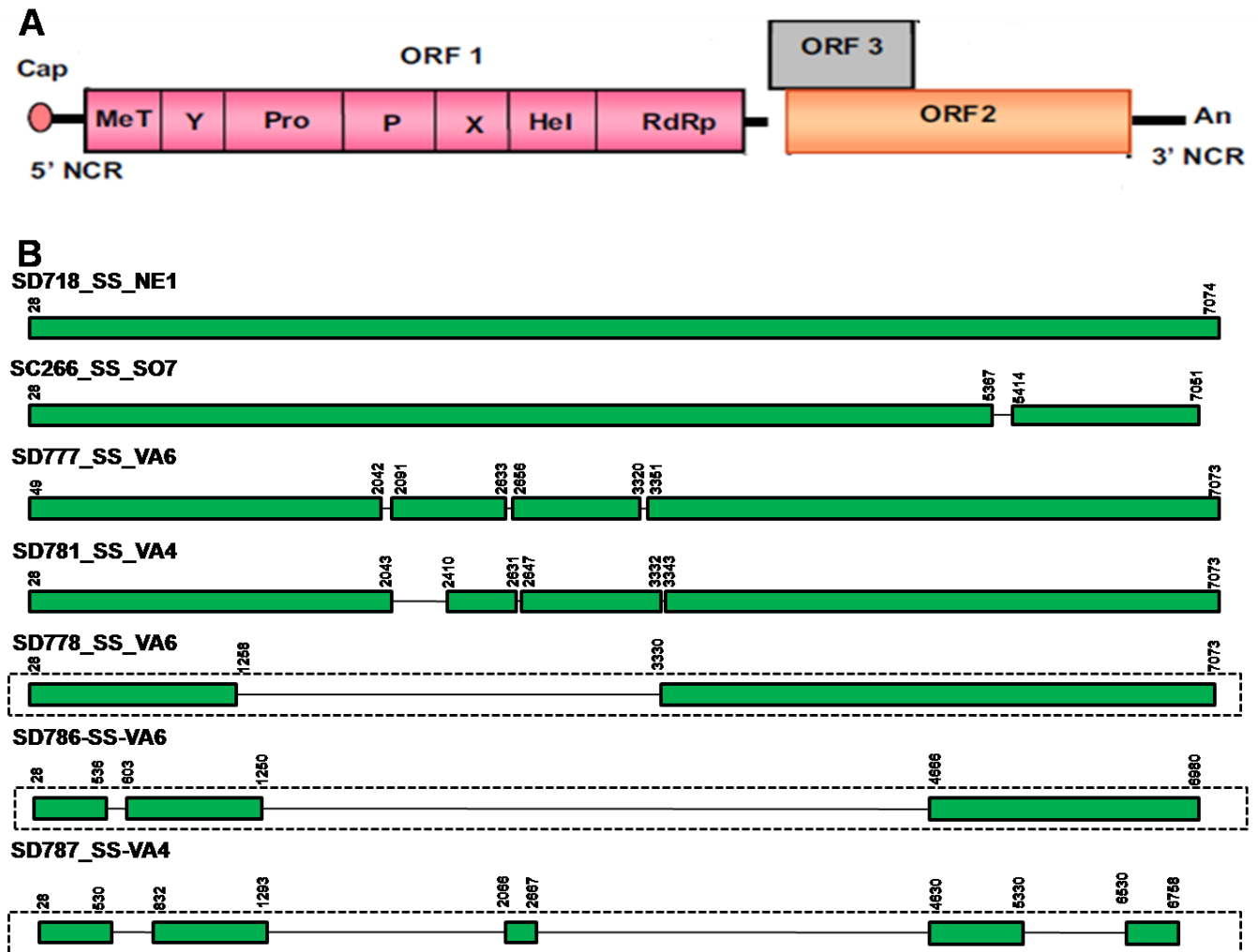


Figura 9.2. Ensamblaje del genoma completo para las secuencias obtenidas

En A se observa la representación esquemática de los dominios funcionales del ORF1 Metil transferasa (MeT), Dominio Y (Y), Cistein Proteasa (Pro) Dominio de prolina (P), Dominio X (X) Helicasa (Hel) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), de las proteínas estructurales (ORF2) y la fosfoproteína (ORF3). En B se esquematiza por medio de barras verdes el resultado del ensamblaje de las secuencias obtenidas de las siete cepas analizadas. La delimitación de los sectores satisfactoriamente ensamblados son indicados. Las líneas negras representan las regiones cuya secuencia no pudo ser obtenida. Encerradas en líneas discontinuas están señaladas las cepas que no se usaron para posteriores análisis.

9.3.3. Caracterización genética de la secuencia de los aislados colombianos

Para obtener información específica de las características de las cepas colombianas las cuatro secuencias con mayor información se compararon con las secuencias completas disponibles en la base de datos del Genbank para el genotipo 3a. Excluyendo las regiones no codificantes y las regiones para las que no se obtuvo información nucleotídica en las muestras evaluadas, se encontró que los porcentajes de identidad oscilaron entre el 91.86%-87.45%. Las secuencias con mayor y menor porcentaje de homología nucleotídica a las cepas colombianas son la cepa AF060668.1, obtenida en humanos del Japón en 1996, y la cepa AB369689.1, también descrita en humanos del Japón pero en 2004, respectivamente (Datos complementarios Tabla DS 9.2).

La posición y extensión de los dominios funcionales y estructurales del HEV para cepa SD718_SS_NE1 fueron ubicadas de acuerdo a lo reportado en la Base de Datos para Dominios Conservados (Conserved Domain Database: CDD) del Centro Nacional para la Información en Biotecnología del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NCBI; NIH: National Center for Biotechnology Information; National Library of Medicine, National Institutes of Health) (Marchler-Bauer *et al.*, 2014) (Figura 9.3).

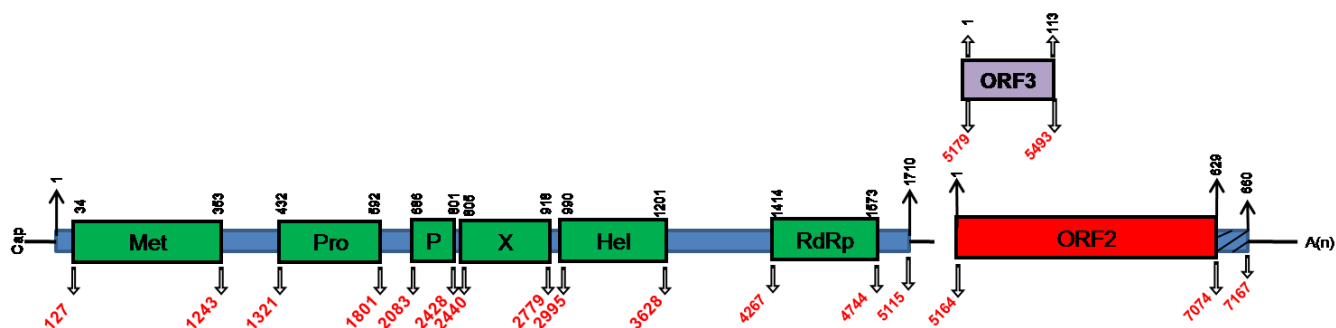


Figura 9.3. Representación esquemática de los dominios conservados en la cepa SD718_SS_NE1.

La figura muestra la ubicación de los dominios funcionales del ORF1 : Metil transferasa (MeT), Dominio Y (Y), Cistein Proteasa(Pro) Dominio de prolina (P), Dominio X (X) Helicasa (Hel) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) proteínas estructurales (ORF2) y la fosfoproteína (ORF3). La barra azul con rayas negras representa el sector del genoma para el que no se obtuvo información nucleotídica (no secuenciado). Los números indican la posición de los aminoácidos (negro) y en rojo la posición de los nucleótidos según la secuencia de referencia AB630970.1. Las líneas negras delgadas

representan las regiones no traducidas NCR. Cap "Motivo de 7 Metil guanina. A(n). Cola de poli-Adenina.

9.3.4. Análisis filogenético de las secuencias de las cepas colombianas

Las cuatro secuencias colombianas completas o casi completas fueron analizadas junto con 63 secuencias completas de los genotipos 1 al 4 con subtipificación conocida según el sistema propuesto por (Lu *et al.*, 2006). Aunque un primer análisis (73 secuencias) incluía los nuevos genotipos propuestos para las secuencias de aves, ratas y hurones, este análisis no se seleccionó finalmente por requerir un árbol con ramas muy largas para la conexión de dichas cepas, lo cual reducía la resolución de las ramas terminales. Por tal razón se optó por un análisis que incluía únicamente los cuatro genotipos tradicionales (1-4).

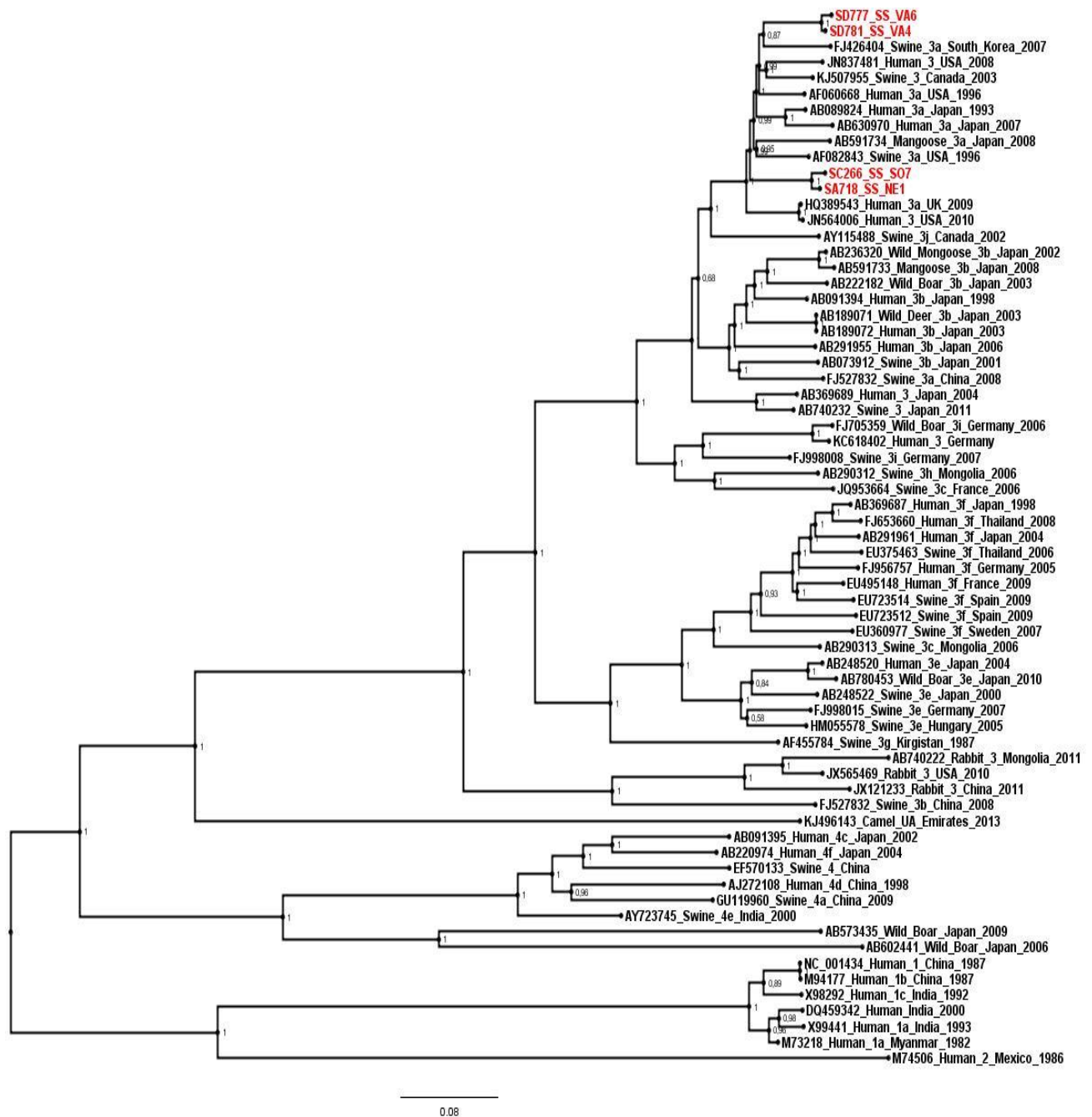


Figura 9.4. Resultado del análisis filogenético de genomas completos de VHE.

Se presenta el árbol consenso por mayoría obtenido tras 900.000 generaciones de cadenas markovianas (MCMC) realizadas en MrBayes v3.2.2 utilizando el modelo GTR + G + I. La probabilidad posterior de cada clado inferido se indican al frente del nodo correspondiente. Los nombres de las cuatro secuencias colombianas obtenidas en este estudio se resaltan en color rojo. El árbol está enraizado en el punto medio y fue dibujado con FigTree v1.4.0 Valle de Aburrá (VA), Noreste (NE), Suroeste (SO).

El análisis filogenético bayesiano fue realizado hasta completar 900.000 generaciones de las cadenas MCMC, cuando el promedio de las desviaciones estándar de las frecuencias de los “splits” tenía un valor de 0,004 y las cadenas habían alcanzado una distribución estacionaria con tamaños de muestra efectivos (ESS) fueron superiores a 300 para todos los parámetros estimados. En este momento se realizó el cómputo del árbol consenso por mayoría el cual se muestra en la figura 9.4.

En el árbol se observan los cuatro genotipos previamente descritos formando grupos monofiléticos fuertemente soportados (probabilidad posterior = 1.0), excepto el genotipo 2, para el cual sólo hay una secuencia completa disponible. Igualmente, las secuencias del genotipo 3, con pocas excepciones, se agrupan de acuerdo a los subgenotipos reportados. Algunas secuencias obtenidas de animales diferentes al cerdo, y no clasificadas previamente, aparecen por fuera de estos clados como ocurre con dos secuencias de “wild boars” (Japón, 2006 y 2009) y una de camello (Emiratos Árabes Unidos, 2013).

Las cuatro secuencias colombianas obtenidas en este estudio forman dos subclados separados y fuertemente soportados dentro del subgenotipo 3a; uno de ellos incluye las dos secuencias obtenidas de muestras del Valle de Aburrá (SD777 y SD781) y el otro las secuencias SA718 y SC266 obtenidas de muestras de las regiones nordeste y suroeste del Departamento de Antioquia. Aparte de las secuencias colombianas, el subgenotipo 3a está compuesto por secuencias de obtenidas de humanos y porcinos de Japón, Corea, Estados Unidos, Canadá y Reino Unido, así como de una mangosta del Japón.

9.3.5. Polimorfismos en las secuencias de aminoácidos de las cepas colombianas.

En general las secuencias de aminoácidos de las cepas colombianas están conservadas entre las cepas de genotipo 3a de otros países, sin embargo, se identificaron 7, 17, 13 y 9 residuos únicos de aminoácidos en las cepas

SD718_SS_NE1, SC266_SS_SO7, SD777_SS_VA6, y SD781_SS_VA4, respectivamente. Particularmente en las cepas SD777_SS_VA6 y SC266_SS_SO7 se observan un cambio de cuatro aminoácidos seguidos, al inicio y al final de la Metiltransferasa respectivamente. En el ORF2 se identificaron cambios de en las posiciones 83 y 84 en la cepa SD718_SS_NE1 y en las posiciones 522-524 para la cepa SD781_SS_VA4. En el ORF3 se identificó un cambio en la posición 79 para SD781_SS_VA4 y en la posición 89 para SD718_SS_NE1. Figura 9.4.

	ORF1																								ORF2										ORF3									
SECUENCIA	9	12	108	180	497	498	499	500	559	577	633	659	664	669	670	672	804	929	1155	1179	1181	1186	1187	1188	1189	1191	1195	1205	1269	25	77	83	84	87	91	510	522	523	524	528	575	79	89	
AB630970.1	A	I	L	R	H	D	N	E	D	V	P	T	L	W	L	P	A	Y	T	I	S	A	I	V	A	T	E	L	P	P	R	L	G	W	S	V	D	G	R	T	A	A	P	
SA718_SS_NE1	.	.	I	.	.	.	.	G	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	V	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q
SC266_SS_SO7	.	.	I	H	.	.	.	G	E	.	.	.	.	.	.	T	.	V	A	V	P	D	V	I	D	R	R	S	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	?	.	
SD777_SS_VA6	S	V	.	.	R	S	E	V	.	.	.	N	V	G	.	.	V	.	.	.	.	V	P	D	V	I	D	R	R	S	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	F	.
SD781_SS_VA4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	I	R	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	C	P	.	P	.	.	.	
JN837481.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JN564006.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
HQ389543.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FJ426404.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FJ426403.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AF082843.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AF060669.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AF060668.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB740232.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB591734.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB481228.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB369689.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB089824.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB074920.3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB074918.2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Figura 9.5. Polimorfismos en las secuencias de aminoácidos de las cepas colombianas.

La figura muestra la posición de cada polimorfismo encontrados en las cepas colombianas para el ORF1; ORF2 Y ORF3 cando se comparan con las cepas del genotipo 3a. La posición de los residuos de aminoácidos en los sitios polimórficos cada ORF son indicados. Resaltado en negrilla se muestran los polimorfismos en residuos consecutivos. ?: Sitio para el cual no se obtuvo la información.

9.4. DISCUSION

Basado en las relaciones filogenéticas de secuencias parciales y completas del HEV la subtipificación propuesta por Lu *et al.*, 2006, está siendo controvertida, desde que la variabilidad del genoma HEV aumenta con la constante descripción de nuevos aislados en diversos hospederos generando ambigüedades en la subtipificación (Oliveira-Filho *et al.*, 2013). Se han realizado pocos estudios filogenéticos y estadísticos que indiquen cual región del genoma del HEV es la más informativa para la subtipificación del virus, por lo cual no existe todavía un consenso de la región del genoma de mayor utilidad en estudios epidemiológicos, haciendo difícil la comparación entre aislados (Oliveira-Filho *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013).

La subtipificación usando genomas parciales de los aislado podría cambiar al utilizar la secuenciación completa del mismo (Fu *et al.*, 2011), además el estudio y caracterización de genomas completos, asegura la identidad genética de los aislados al proporcionar una mayor información acerca de los dominios funcionales y estructurales del virus, sus mutaciones y su papel en la dinámica de infección en diferentes hospederos (Fu *et al.*, 2011; Okamoto *et al.*, 2001; Zhai *et al.*, 2006).

En este estudio siete diferentes muestras obtenidas de heces de cerdos previamente positivos para el ORF2 fueron utilizados para la secuenciación completa aplicando una estrategia de “primer walking” mediante el diseño de bloques solapantes dentro de las secuencias consenso del genotipo 3. Con la aplicación de este sistema de bloques se obtuvo la secuencia completa de las regiones codificantes de uno de los aislados y 3 secuencias informativas de más del 95% del genoma.

Los bloques de amplificación menos eficientes para la amplificación fueron los bloques BL.IVN y BL.VS. La razón de esta mayor eficiencia se desconoce, pero

puede estar relacionada con la variabilidad del genoma en los sitios de hibridación de los cebadores que coincide con la región hipervariable del virus (Panda & Varma, 2013). Pruebas adicionales deben ser realizadas para mejorar la calidad de la secuencia de estos bloques. A pesar de esto, el sistema utilizado en este estudio podría ser empleado para secuenciación de cepas del genotipo 3 provenientes de diferentes hospederos pues fue diseñado a partir de un buen número de secuencias de genoma completo de este genotipo disponibles en las bases de datos.

Según la topología del árbol filogenético realizada en este estudio, se confirma que las cepas que circulan en Colombia pertenecen al genotipo 3a, junto con aislados del Japón, Corea, Estados Unidos, Reino Unido y Canadá. Esto indica que este subgenotipo se ha encontrado en al menos cuatro continentes, lo que corresponde a un linaje cosmopolita, probablemente diseminado a través del tráfico de cerdos o de sus partes, realizado con propósitos comerciales.

El agrupamiento de las secuencias colombianas en dos clados separados confirma que el VHE ha sido introducido a Antioquia en, al menos, dos ocasiones. En el capítulo anterior se observaron tres clados sugiriendo múltiples introducciones. La diferencia con este estudio se podría explicar por el menor número de secuencias analizadas aquí, la cual no permite estudiar la diversidad del virus en Antioquia en toda su extensión.

La reconstrucción evolutiva del genotipo 3 realizada por (Zehender *et al.*, 2014) ubican su origen en Europa en la primera década de 1800, donde divergió en dos clados a finales del siglo XIX; uno dio origen en la primera mitad del siglo XX a los genotipos 3e y 3f que circulan en Europa y el otro que dio lugar al genotipo 3c y a las cepas asiáticas alrededor de los años 20. A mediados de los años 50, a partir de las cepas asiáticas se habría originado el subgenotipo 3a que incluye las cepas de Norteamérica, las cuales no forma un grupo monofilético dentro del subgenotipo 3a sino que están entremezcladas con aislados de Asia, sugiriendo que el subgenotipo 3a fue introducido en Estados Unidos en varias ocasiones

entre 1970 y 2000 (Nakano *et al.*, 2012; Zehender *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta lo anterior y la frecuente importación de cerdos reproductores desde los Estados Unidos a Colombia, es posible que el genotipo 3a haya sido introducido a territorio antioqueño por esta vía en varias ocasiones desde ese país; sin embargo, la carencia de secuencias virales de otros países de Centro y Suramérica hacen difícil probar esta hipótesis.

La comparación de residuos de aminoácidos entre las secuencias completas del subgenotipo 3a reveló la presencia del motivo RSEV en el asilado SD777_SS_VA6 y del motivo VPDV SC266_SS_SO7 en la Metiltransferasa del ORF1, motivos únicos para las cepas colombianas. Para el ORF2 en el asilado SD718_SS_NE1 y en el aislado SD781_SS_VA4 se observó la presencia de los residuos VV en los aminoácidos 83 y 84 y GCP en los aminoácidos 522-523-524 respectivamente, los cuales también fueron únicos en las secuencias colombianas en las secuencias del subgenotipo 3a. El posible papel que cumpla la presencia de estos residuos en la patogénesis de las cepas que circulan en Colombia debería ser considerado en futuros estudios.

La proteína del ORF3 es multifuncional y tiene un papel importante en la patogénesis del HEV. Se destacan entre otras funciones la promoción de la supervivencia celular mediante la activación de MAPK (Panda & Varma, 2013), modula la respuesta de genes activados por interferón reduciendo el transporte de STAT 3 (Dong *et al.*, 2012; Panda & Varma, 2013), y participa en la salida del virión al medio extracelular (Nagashima *et al.*, 2011). Para esta última función se ha descrito que la proteína presenta motivos PSAP esenciales para esa función (Nagashima *et al.*, 2011; Okamoto, 2013; Panda & Varma, 2013). El genotipo 3 presenta dos de estos motivos entre los residuos 82 y 102 de la proteína la introducción de mutaciones en estos motivos significativamente disminuyen la detección de partículas virales en el sobrenadante de células en cultivo (Nagashima *et al.*, 2011). El asilado SD718_SS_NE1 presenta el cambio P89Q en el primer motivo PSAP lo que podría afectar la salida del virión pero no la

replicación del virus. El efecto que pueda generar esta mutación debe ser estudiado experimentalmente.

En resumen, los resultados de este estudio indican que las cepas que circulan en Antioquia, aunque pertenecientes a un mismo subgenotipo, no se originaron a partir de un evento migratorio único si no, probablemente, han sido el producto de varias introducciones del virus al país. Las mismas poseen cambios únicos en su secuencia de aminoácidos que podrían jugar eventual papel en la patogénesis de la infección en los cerdos en edad de beneficio en Antioquia, que deben tratarse en futuros trabajos. En este estudio se describe por primera vez las características moleculares de la secuencia completa de las regiones codificantes del virus de la HEV obtenidos de cerdos en edad de beneficio en Colombia lo que constituye un punto de referencia para nuevos estudios que contribuyan a aclarar la epidemiología y, quizás, algunos aspectos de la patogenia de la hepatitis en el país.

BIBLIOGRAFIA

- Bobek, V., Kolostova, K., Pinterova, D., Kacprzak, G., Adamiak, J., Kolodziej, J., Boubelik, M., Kubecova, M. & Hoffman, R. M. (2010).** A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. *Anticancer Res* **30**, 4799–4804.
- Dong, C., Zafrullah, M., Mixson-Hayden, T., Dai, X., Liang, J., Meng, J. & Kamili, S. (2012).** Suppression of interferon- α signaling by hepatitis E virus. *Hepatology* **55**, 1324–32.
- Forero, J. E., Parra, J. E. & López, A. (2014).** Detection of Hepatitis E Virus (HEV) genome from pigs feces samples in slaughterhouses in Antioquia, Colombia. *Rev Fac Med Vet Zoot* **61**, 221–227.
- Fu, H., Wang, L., Zhu, Y., Geng, J., Li, L., Wang, X., Bu, Q. & Zhuang, H. (2011).** Analysing complete genome sequence of swine hepatitis E virus (HEV), strain CHN-XJ-SW13 isolated from Xinjiang, China: Putative host range, and disease severity determinants in HEV. *Infect Genet Evol.*
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H. & Emerson, S. U. (2006).** A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* **80**, 5919–5926.
- Gutiérrez-Vergara, C., Quintero, J., Duarte, J. F., Suescún, J. P. & López-Herrera, A. (2015).** Detection of hepatitis E virus genome in pig livers in Antioquia, Colombia. *Genet Mol Res* **14**, 2890–2899.
- Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., Toth, T. E. & Meng, X. J. (2002).** Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol.*
- Huelsenbeck, J. P. and F. R. (2001).** MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**, 754–755.
- Johne, R., Dremsek, P., Reetz, J., Heckel, G., Hess, M. & Ulrich, R. G. (2014).** Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol* **27**, 212–229.

- Lam, T. T.-Y., Hon, C.-C. & Tang, J. W. (2010).** Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. *Crit Rev Clin Lab Sci* **47**, 5–49.
- Lu, L., Li, C. & Hagedorn, C. H. (2006).** Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* **16**, 5–36.
- Marchler-Bauer, a., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M. & other authors. (2014).** CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* **43**, D222–D226.
- Meng, X.-J. (2013).** Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis* **33**, 41–49.
- Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C. & Arbiza, J. (2013).** Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res* **173**, 364–370.
- Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, Tanaka, T., Yamada, K., Nishizawa, T. & Okamoto, H. (2011).** A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *J Gen Virol* **92**, 269–278.
- Nakano, T., Okano, H., Kobayashi, M., Ito, K., Ohmori, S., Nomura, T., Kato, H., Ayada, M., Nakano, Y. & other authors. (2012).** Molecular epidemiology and genetic history of European-type genotype 3 hepatitis E virus indigenized in the central region of Japan. *Infect Genet Evol* **12**, 1524–1534.
- Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U. & Yoshikawa, A. (2001).** Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 929–936.
- Okamoto, H. (2013).** Culture systems for hepatitis e virus. *J Gastroenterol* **48**, 147–158.
- Oliveira-Filho, E. F., König, M. & Thiel, H. J. (2013).** Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet Microbiol* **165**, 148–154.
- Panda, S. K. & Varma, S. P. K. (2013).** Hepatitis E: Molecular Virology and Pathogenesis. *J Clin Exp Hepatol* **3**, 114–124.
- Pavio, N., Meng, X.-J. & Doceul, V. (2015).** Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr Opin Virol* **10**, 34–41.

- Rambaut, A. (2015).** FigTree_v1.4.0 2012.
- Rambaut A, Suchard MA, X. D. & D. A. (2014).** Tracer v1.6.
<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Smith, D. B., Purdy, M. a & Simmonds, P. (2013).** Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol* **87**, 4161–4169.
- Smith, D. B., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S. U., Harrison, T. J., Meng, X.-J., Okamoto, H., Van der Poel, W. H. M. & Purdy, M. A. (2014).** Consensus Proposals for Classification of the Family Hepeviridae. *J Gen Virol* **95**, 2223–2232.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.
- Wang, S., Wei, W., Luo, X. & Cai, X. (2014).** Genome-Wide Comparisons of Phylogenetic Similarities between Partial Genomic Regions and the Full-Length Genome in Hepatitis E Virus Genotyping. *PLoS One* **9**, 1–15.
- Yang, D., Jiang, M., Jin, M., Qiu, Z., Cui, W., Shen, Z., Li, B., Gong, L., Chen, Z. & other authors. (2013).** Full-length sequence analysis of hepatitis E virus isolates: showing potential determinants of virus genotype and identity. *Virus Genes* **47**, 414–21.
- Yugo, D. M. & Meng, X.-J. (2013).** Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health* **10**, 4507–33.
- Zehender, G., Ebranati, E., Lai, A., Luzzago, C., Paladini, S., Tagliacarne, C., Galli, C., Galli, M., Ciccozzi, M. & other authors. (2014).** Phylogeography and phylodynamics of European genotype 3 hepatitis E virus. *Infect Genet Evol* **25**, 138–143. Elsevier B.V.
- Zhai, L., Dai, X. & Meng, J. (2006).** Hepatitis E virus genotyping based on full-length genome and partial genomic regions. *Virus Res* **120**, 57–69.

DATOS SUPLEMENTARIOS

Tabla DS9.1. Marcadores Serológicos, moleculares e histológicos de los cerdos de donde se obtuvieron las muestras para secuenciación completa

Código	Sexo	IgG	IgM	Hígados		Dx	GL	IHQ	Heces	
				ORF1 ^a	ORF2 ^b				ORF1 ^a	ORF2 ^b
SC266_SS_SO7	M	3,71	2,53	Pos	Pos	HI	2	Pos	Pos	Pos
SD718_SS_NE1	M	3,94	1,74	Pos	Pos	HI	2	Neg	Pos	Pos
SD777_SS_VA6	H	3,92	4,00	ND	ND	HI	2	ND	Pos	Pos
SD781_SS_VA4	H	3,82	4,00	ND	ND	HI	2	Pos	pos	Pos
SD778_SS_VA6	H	3,83	3,67	ND	ND	HI	3	Pos	Pos	Pos
SD786_SS_VA6	H	1,55	0,53	Neg	Pos	HI	3	Pos	Neg	Pos
SD787_SS-VA4	H	3,70	1,07	Neg	Neg	HI	2	Pos	Neg	pos

a: ORF1 detectado según el protocolo de RT PCR reportado por Fogeda *et al.*, 2009. **b: ORF2** detectado según el protocolo de RT PCR reportado por Huang *et al.*, 2002. **Código:** las dos letras iniciales identifican las plantas las 5 plantas de Beneficio (**SA-SE**), un número consecutivo; el tipo de muestra heces (**SS**); la subregión de procedencia, Valle de Aburrá (**VA**), Noreste (**NE**), Suroeste (**SO**), seguido de un número para diferenciar los municipios específicos de la subregión. **Dx:** Diagnóstico histopatológico. **HI:** hepatitis de Interface, lesión necroinflamatoria con destrucción hepatocitos en áreas periportales acompañada de alteraciones degenerativas vacuolares, apoptosis, infiltración inflamatoria mononuclear y predominante de fibrosis. **GL:** Grado de lesión, presencia leve de lesiones, focalizadas con una extensión entre el 15 y 35% en la superficie del tejido. **IHQ** Inmunohistoquímica para la detección del antígeno ORF3. **ND:** No determinado.

Tabla DS9. 2. Porcentajes de identidad entre las cepas colombianas y las cepas del genotipo 3a

	SA718_SS_NE1	SC266_SS_SO7	SD777_SS_VA6	SD781_SS_VA4	AF060668.1_Human_3a_USA_1996	AF082843.1_Swine_3a_USA_1996	HQ389543.1_Human_3a_United_Kindom_2009	JN564006.1_Human_3_USA_2010	AF060669.1_Human_3a_USA_1996	AB089824.1_Human_3a_Japan_1993	FJ426403.1_Swine_3a_South_Korea_2007	JN837481.1_Human_3_USA_2008	AB481228.1_Swine_3a_Japan_2008	AB074918.2_Human_3a_Japan_2001	AB074920.3_Human_3a_Japan_2001	FJ426404.1_Swine_3a_South_Korea_2007	AB369689.1_Human_3_Japan_2004	AB591734.1_Mongoose_3a_Japan_2008	AB630970.1_Human_3a_Japan_2007	AB740232.1_Swine_3_Japan_2011
SA718_SS_NE1	# ###																			
SC266_SS_SO7	9 ,95	# ###																		
SD777_SS_VA6	9 ,31	9 ,24	# ###																	
SD781_SS_VA4	9 0,9	9 ,69	9 ,69	# ###																
AF060668.1_Human_3a_USA_1996	9 ,48	9 ,17	9 ,48	9 ,86	# ###															
AF082843.1_Swine_3a_USA_1996	9 ,24	9 ,92	9 ,77	9 ,07	9 ,32	# ###														
HQ389543.1_Human_3a_UK_2009	9 ,04	9 ,66	9 ,86	9 ,09	9 ,37	9 ,18	# ###													
JN564006.1_Human_3_USA_2010	9 ,97	9 ,58	9 ,75	9 ,98	9 ,22	9 ,98	9 ,37	# ###												
AF060669.1_Human_3a_USA_1996	9 ,94	9 ,84	9 ,54	9 ,85	9 ,68	9 ,22	9 ,98	9 ,18	# ###											
AB089824.1_Human_3a_Japan_1993	9 ,89	9 ,08	9 ,35	9 ,77	9 ,79	9 ,31	9 ,09	9 ,95	9 ,45	# ###										
FJ426403.1_Swine_3a_South_Korea_2007	9 ,67	9 ,58	9 ,44	9 ,78	9 ,63	9 ,95	9 ,18	9 ,01	9 ,75	9 ,66	# ###									
JN837481.1_Human_3_USA_2008	9 ,74	9 ,57	9 ,72	9 ,01	9 ,14	9 ,77	9 ,51	9 ,37	9 ,13	9 ,91	9 ,92	# ###								
AB481228.1_Swine_3a_Japan_2008	9 ,74	9 ,66	9 ,64	9 ,12	9 ,22	9 ,48	9 ,78	9 ,67	9 ,77	9 ,68	9 ,09	9 ,11	# ###							
AB074918.2_Human_3a_Japan_2001	9 0,5	9 ,37	9 ,57	9 ,08	9 ,69	9 ,61	9 ,14	9 ,97	9 ,68	9 ,38	9 ,52	9 ,21	9 ,15	# ###						
AB074920.3_Human_3a_Japan_2001	9 ,52	9 ,04	9 ,44	9 ,09	9 ,14	9 ,72	9 ,61	9 ,55	9 ,91	9 ,56	9 ,03	9 ,24	9 ,44	9 ,01	# ###					
FJ426404.1_Swine_3a_South_Korea_2007	9 ,18	9 ,04	9 ,49	9 ,78	9 ,43	9 ,94	9 ,08	9 ,66	9 ,63	9 ,58	9 ,29	9 ,83	9 ,09	9 ,57	9 ,04	# ###				
AB369689.1_Human_3_Japan_2004	8 ,51	8 ,45	8 ,88	8 ,99	8 ,13	8 ,71	8 ,96	8 ,01	8 ,16	8 ,73	8 ,99	8 ,79	8 ,77	8 ,27	8 ,64	8 ,62	# ###			
AB591734.1_Mongoose_3a_Japan_2008	8 ,93	8 ,52	8 ,63	8 ,69	8 ,29	8 ,12	8 ,07	8 ,72	8 ,14	8 ,52	8 ,01	8 ,55	8 ,03	8 ,04	8 ,04	8 ,97	8 ,56	# ###		
AB630970.1_Human_3a_Japan_2007	8 ,89	8 ,64	8 ,07	8 ,26	8 ,06	8 ,89	8 ,06	8 ,44	8 ,17	8 ,48	8 ,15	8 ,69	8 ,64	8 ,55	8 ,08	8 ,16	8 ,71	8 ,52	# ###	
AB740232.1_Swine_3_Japan_2011	8 ,85	8 ,62	8 ,02	8 ,21	8 ,28	8 ,01	8 ,13	8 ,22	8 ,48	8 ,07	8 ,96	8 ,88	8 ,75	8 ,48	8 ,54	8 ,85	8 ,86	8 ,67	8 ,33	### ###

10. DISCUSION GENERAL

En los últimos años se ha visto un incremento significativo en la literatura científica mundial sobre el HEV, lo que ha contribuido a mejorar el entendimiento de las características genéticas, epidemiológicas y clínicas de este virus. Hoy es considerado como uno de los virus hepatotrópicos mas importantes en salud pública mundial, por su ubicuidad en una gran cantidad de regiones alrededor del mundo, por su carácter zoonótico emergente y por el papel que tiene en la presentación de enfermedad crónica en pacientes Inmunocomprometidos y en mujeres en embarazo (Aggarwal, 2011; Kamar *et al.*, 2013; Navaneethan *et al.*, 2008; Scobie & Dalton, 2013).

Con la descripción del HEV en cerdos en 1997 se abrió una intensa búsqueda de sus características patológicas y moleculares en estos animales que actúan como reservorio principalmente del genotipo 3, genotipo encontrado en casi todos los países donde la crianza de cerdo es una de las actividades económicas fundamentales para el desarrollo (Meng, 2010; Meng *et al.*, 1998; Pavio *et al.*, 2015; Purdy & Khudyakov, 2010).

Con excepción de Ecuador y las Guayanas, en todos los países suramericanos se ha encontrado evidencia serológica y/o molecular de la circulación del virus tanto en humanos como en cerdos (Echevarría *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2012, 2014b; Ibarra *et al.*, 2007; Mirazo *et al.*, 2012; Munné *et al.*, 2006, 2014; dos Santos *et al.*, 2009). En Colombia solo desde hace corto tiempo se han venido realizando trabajos para entender la dinámica de infección en el país (Betancur *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2014a, b; Peláez *et al.*, 2014).

Esta investigación fue diseñada para entender la frecuencia de la infección, las alteraciones histopatológicas asociadas y la diversidad genética del HEV en la población porcina en edad de beneficio el Departamento de Antioquia.

Con respecto a la frecuencia de infección se observó que todos los cerdos estuvieron expuestos al virus en algún momento de su etapa productiva como lo indica la frecuencia del 100% de anticuerpos tipo IgG, la cual está por encima de la reportada en otros países, como Francia (Rose *et al.*, 2011), Canadá (Yoo *et al.*, 2001), China (Li *et al.*, 2009) e Italia (Di Bartolo *et al.*, 2011). Al igual que para IgG, la prevalencia de anticuerpos tipo IgM en suero y la presencia del genoma viral en heces, son altas comparadas a las reportadas por otras investigaciones similares (Berto *et al.*, 2012; Crossan *et al.*, 2014; Di Martino *et al.*, 2010; Wacheck *et al.*, 2012); la diferencia en estas prevalencias puede estar relacionada con la relativa baja densidad de animales por corral con la que se suele criar los cerdos en otros países, lo cual reduce la exposición dentro de la piara (Bouwknegt *et al.*, 2008; Rose *et al.*, 2011). También se ha reportado que las granjas dedicadas a la etapa de finalización tienen más probabilidad de tener animales seropositivos (Rose *et al.*, 2011)

Excepto por la subregión Suroeste, que presentó las mayores frecuencias de cerdos positivos para IgM, con una diferencia estadísticamente significativa en la detección del genoma sobre las demás subregiones, en general, la prevalencia IgM y del genoma viral se presentó sin diferencias estadísticamente significativas entre las subregiones de procedencia de los animales estudiados, lo que sugiere que o hay factores diferenciadores particulares para la infección entre esta región y las distintas subregiones estudiadas en Antioquia.

Las razones de esta diferencia podría estar relacionado con el manejo de los protocolos de sanidad en cada granja ligados a la tecnificación de las producciones porcinas de estas subregiones (Bouwknegt *et al.*, 2009; Seminati *et al.*, 2008; Walachowski *et al.*, 2014). Este tipo de información sobre el nivel de tecnificación de las granjas de donde procedían los animales evaluados estaba por fuera de los objetivos de este estudio, por lo que sería necesario hacer nuevos estudios para investigar la influencia de estos factores en el momento en que se produce la infección por el HEV en cerdos de diferentes regiones o diferentes granjas.

Las diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de detección del HEV en heces entre las plantas de beneficio, podrían estar relacionadas con un efecto del azar relacionado al momento en que se capturaron las muestras pues debido al corto tiempo de permanencia de los cerdos en estos establecimientos, es improbable que en las plantas de beneficio estudiadas se presentaran un factor que haya influido en la excreción del virus; sin embargo, sería interesante investigar si las prácticas sanitarias implementadas en la línea de faenado tienen un efecto en la contaminación de los hígados que se comercializan para el consumo humano.

Los cerdos que llegaron a las plantas de beneficio en Antioquia presentaron diferentes patrones de infección, es decir que a pesar de que todos los cerdos estuvieron expuestos al virus (IgG+), hubo algunos que pudieron tener infección activa productiva (IgM+, RNA-HEV+, Ag+), otros infección activa no productiva (IgM+, RNA-HEV+, Ag-), y otros que podrían haber resuelto la infección (IgM-, RNA-HEV-, Ag-) como lo sugiere la evaluación de los diferentes marcadores de infección. Además de los factores antes mencionados, la susceptibilidad del hospedero y la patogenicidad pueden afectar el curso de la infección en cerdos y explicar la distribución heterogénea de los diferentes biomarcadores en los cerdos evaluados.

Tradicionalmente se ha asociado la presencia HEV en humanos a la presentación de hepatitis aguda (Aggarwal, 2013); sin embargo, reportes recientes que vinculan el genotipo 3 del HEV con hepatitis crónica en pacientes inmunocomprometidos (Aggarwal, 2011; Niet *et al.*, 2012; Parvez, 2013). Y la demostración de que la infección experimental con el HEV puede inducir lesiones de tipo crónico en conejos (Han *et al.*, 2014), refuerzan la idea de que el HEV puede generar una infección crónica en los cerdos, lo que ayudaría a explicar la alta frecuencia de hallazgos de lesiones crónicas en los cerdos incluidos en este estudio.

Aunque se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del genoma viral y las lesiones hepáticas inflamatorias, la fuerza de

estas asociaciones no fueron altas, lo que sugiere, que si bien el genoma del HEV está presente en el tejido hepático de los tejidos evaluados la presencia de lesiones inflamatorias puede estar influida por otros factores tales como la confección con otros patógenos (Rosell *et al.*, 2000) o la presencia de micotoxinas (Casteel *et al.*, 1993).

Los análisis filogenéticos de segmentos del ORF1 y del ORF2 del genoma del HEV indican que las cepas que han circulado recientemente en Antioquia corresponden a virus del genotipo 3a, relacionadas con las cepas encontradas en cerdos y humanos descritas en Japón, Corea, Canadá y USA entre 1993 y 2010. Las secuencias encontradas no forman un único grupo monofilético, lo que indica que el virus fue introducido en varias ocasiones al país. Además se encontró que las variantes que circulan en las producciones porcinas no tienen una estructuración geográfica; es decir que no hay evidencia de que algún linaje particular se encuentre restringido a alguna de las diferentes subregiones de Antioquia.

En conclusión, todos los cerdos en edad de beneficio que se muestrearon en las plantas de faenado de Antioquia en el período de estudio, estuvieron en contacto con el virus en algún momento durante su vida productiva, presentaron patrones variables en los marcadores de la infección, con lesiones en el tejido hepático compatibles con procesos de daño crónico y asociadas a la presencia del HEV genotipo 3a.

Es la primera vez en Colombia, que se realiza un estudio sobre la infección por este virus en cerdos para el consumo humano y se caracterizan la secuencia completa de una cepa colombiana del HEV, además no se conocen trabajos a nivel mundial sobre la infección natural por el HEV que como este, involucre el análisis de marcadores serológicos, moleculares e histopatológicos simultáneamente en cerdos en edad de beneficio. Por lo anterior, los datos recogidos en este trabajo aportan información valiosa para las autoridades colombianas encargadas de la vigilancia y control de infecciones importantes para

la salud humana y también para las involucradas en la producción y mejoramiento en la calidad e inocuidad de los productos derivados de la cadena porcícola.

BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal, R. (2011).** Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res* **161**, 15–22.
- Aggarwal, R. (2013).** Hepatitis E: Clinical presentation in disease-endemic areas and diagnosis. *Semin Liver Dis* **33**, 30–40.
- Di Bartolo, I., Ponterio, E., Castellini, L., Ostanello, F. & Ruggeri, F. M. (2011).** Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol* **149**, 330–338.
- Berto, A., Backer, J. a, Mesquita, J. R., Nascimento, M. S., Banks, M., Martelli, F., Ostanello, F., Angeloni, G., Di Bartolo, I. & other authors. (2012).** Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes* **190**, 1–6.
- Betancur, C. A., Mejía, M. V & Portillo, S. (2013).** Seroprevalencia de hepatitis E en trabajadores de fincas porcícolas del Valle de Aburrá 2011-2012
Seroprevalence of hepatitis E in swine farms workers in Aburra Valley 2011-2012. *Acta Médica Colomb* **38**, 68–70.
- Bouwknegt, M., Frankena, K., Rutjes, S. A., Wellenberg, G. J., Husman, A. M. D. R., Poel, W. H. M. Van Der & Jong, M. C. M. De. (2008).** Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res*.
- Bouwknegt, M., Rutjes, S. a, Reusken, C. B. E. M., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M. C. M., de Roda Husman, A. M. & Poel, W. H. M. Van Der. (2009).** The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* **5**, 7.
- Casteel, S. W., Turk, J. R., Cowart, R. P. & Rottinghaus, G. E. (1993).** Chronic toxicity of fumonisin in weanling pigs. *J Vet Diagn Invest* **5**, 413–417.
- Crossan, C., Grierson, S., Thomson, J., Ward, A., Nunez-Garcia, J., Banks, M. & Scobie, L. (2014).** Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiol Infect* 1–4.
- Echevarría, J. M., González, J. E., Lewis-Ximenez, L. L., Dos Santos, D. R. L., Munné, M. S., Pinto, M. A., Pujol, F. H. & Rodríguez-Lay, L. A. (2013).** Hepatitis E virus infection in Latin America: A review. *J Med Virol* **85**, 1037–1045.

- Gutiérrez, C., Sanchez, D., Montalvo, M. C., Pujol, F. H., Rodriguez, L. A., Pinto, B., Chacon, E. P. & Guzman, M. G. (2012).** Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. *J Med Virol* **84**, 1025–1029.
- Gutiérrez, C. C., Ospina, D., Forero, J. E., Rodríguez, B. D. J., Gutiérrez, L. A., Correa, G., López Herrera, A. & Parra, J. E. (2014a).** Serological and molecular detection of Hepatitis E virus in pig farms of. *Rev CES Med Vet Y Zootec* **9**, 158–168.
- Gutiérrez, C. C., Ospina, D. A., Forero, J. E., Rodríguez, B. de J., Gutiérrez, L. A., Correa, G., López-Herrera, A. & Parra, J. E. (2014b).** Serological and molecular detection of Hepatitis E virus in pig farms of Antioquia. *Rev CES Med Vet y Zootec* 158–168.
- Han, J., Lei, Y., Liu, L., Liu, P., Xia, J., Zhang, Y., Zeng, H., Wang, L., Wang, L. & Zhuang, H. (2014).** SPF rabbits infected with rabbit hepatitis E virus isolate experimentally showing the chronicity of hepatitis. *PLoS One* **9**.
- Ibarra, H., Riedemann, S., Reinhardt, G. & Calvo, M. (2007).** Presencia de anti-VHE en un estudio de cohorte de porcinos ¿reservorio animal de hepatitis E en Chile? *Rev Med Chil* **135**, 997–1001.
- Kamar, N., Rostaing, L. & Izopet, J. (2013).** Hepatitis E virus infection in immunosuppressed patients: natural history and therapy. *Semin Liver Dis* **33**, 62–70.
- Li, W., She, R., Wei, H., Zhao, J., Wang, Y., Sun, Q., Zhang, Y., Wang, D. & Li, R. (2009).** Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. *Vet Microbiol* **133**, 75–83.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Martella, V., Di Felice, E., Francesco, C. E. D., Ceci, C. & Marsilio, F. (2010).** Detection of hepatitis E virus in slaughtered pigs in Italy. *Arch Virol* **155**, 103–106.
- Meng, X. J. (2010).** Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* **140**, 256–265.
- Meng, X. J., Halbur, P. G., Shapiro, M. S., Govindarajan, S., Bruna, J. D., Mushahwar, I. K., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (1998).** Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* **72**, 9714–9721.
- Mirazo, S., Ramos, N. & Arbiza, J. (2012).** Molecular epidemiology of Hepatitis E virus (HEV) in South America current status. *Virus Rev Res*.

- Munné, M. S., Altabert, N. R., M, L. O. O., Vladimírsky, S. N., Moreira, R., María, P., Espul, C., Manzur, A., Soto, S. S. & other authors. (2014).** Updating the knowledge of hepatitis E : new variants and higher prevalence of anti-HEV in Argentina. *Ann Hepatol* **13**, 496–502.
- Munné, M. S., Vladimírsky, S., Otegui, L., Castro, R., Brajterman, L., Soto, S., Guarnera, E., Molina, V., Monfellano, M. & other authors. (2006).** Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol* **78**, 1579–1583.
- Navaneethan, U., Al Mohajer, M. & Shata, M. T. (2008).** Hepatitis E and pregnancy: Understanding the pathogenesis. *Liver Int* **28**, 1190–1199.
- Niet, A. De, Zaaijer, H. L., Berge, I., Weegink, C. J., Reesink, H. W. & Beuers, U. (2012).** Chronic hepatitis E after solid organ transplantation. *Neth J Med* **70**, 261–266.
- Parvez, M. K. (2013).** Chronic Hepatitis E Infection : Risks and Controls. *Intervirology* 213–216.
- Pavio, N., Meng, X.-J. & Doceul, V. (2015).** Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr Opin Virol* **10**, 34–41.
- Peláez, D., Hoyos, M. C., Rendón, J. C., Mantilla, C., Ospina, M. C., Cortés-Mancera, F., Pérez, O. L., Contreras, Lady, Estepa, Y. & other authors. (2014).** Hepatitis E virus infection in patients with clinical diagnosis of viral hepatitis in Colombia. *Biomédica* **34**, 354–365.
- Purdy, M. A. & Khudyakov, Y. E. (2010).** Evolutionary History and Population Dynamics of Hepatitis E Virus. *PLoS One* **5**, 1–9.
- Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloït, M., Madec, F. & Pavio, N. (2011).** High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **34**, 419–427.
- Rosell, C., Segalés, J. & Domingo, M. (2000).** Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* **37**, 687–692.
- Dos Santos, D. R. L., Vitral, C. L., de Paula, V. S., Marchevsky, R. S., Lopes, J. F., Gaspar, A. M. C., Saddi, T. M., Júnior, N. C. D. M., Guimarães, F. D. R. & other authors. (2009).** Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J* **182**, 474–80.

- Scobie, L. & Dalton, H. R. (2013, January).** Hepatitis E: Source and route of infection, clinical manifestations and new developments. *J Viral Hepat.*
- Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N. & Martin, M. (2008).** Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* **175**, 130–132.
- Wacheck, S., Werres, C., Mohn, U., Dorn, S., Soutschek, E., Fredriksson-Ahomaa, M. & Märklbauer, E. (2012).** Detection of IgM and IgG Against Hepatitis E Virus in Serum and Meat Juice Samples from Pigs at Slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog Dis* **9**, 655–660.
- Walachowski, S., Dorenlor, V., Lefevre, J., Lunazzi, A., Eono, F., Merbah, T., Eveno, E., Pavio, N. & Rose, N. (2014).** Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France. *Epidemiol Infect* **142**, 1934–1944.
- Yoo, D., Willson, P., Pei, Y., Hayes, M. A., Deckert, A., Dewey, C. E., Friendship, R. M., Yoon, Y., Gottschalk, M. & other authors. (2001).** Prevalence of Hepatitis E Virus Antibodies in Canadian Swine Herds and Identification of a Novel Variant of Swine Hepatitis E Virus. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 1213–1219.