



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
VIROLOGÍA

Estudio serológico y molecular del virus de la Hepatitis E en sueros de cerdos de
la República Mexicana

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA

Montserrat Elemi García Hernández

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva
Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia

COMITÉ TUTORAL

Dr. José Iván Sánchez Betancourt
Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira
Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia FESC

CDMX, MAYO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Quisiera agradecer al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante mis estudios de posgrado.

A mi comité tutorial, el Dr. José Iván Sánchez Betancourt y la Dra. Susana Mendoza Elvira por su atención y orientación durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. René Segura, MVZ Mariana García Plata y al Dr. Carlos Marchain-Williams por la donación de muestras usadas para la realización de este trabajo.

Por otro lado quisiera reconocer la importante labor de los miembros del jurado, la Dra. Elizabeth Loza Rubio, la Dra. Rocío Tirado, el Dr. José Francisco Rivera Benítez y el Dr. Salvador Fonseca Coronado por sus valiosos comentarios que me ayudaron a enriquecer la tesis.

Al Dr. Fernando González Candelas por su asesoría y atención durante mi estancia en su laboratorio.

Dr. Gilberto Vaughan Figueroa por la ayuda brindada, sus aportaciones y protocolos utilizados en este proyecto.

Al Dr. José Juan Martínez Maya por su asesoría con los análisis estadísticos.

A la Dra. Liliana Valdés Vázquez, al Sr. Mario Cruz y Armando Cruz por toda su ayuda en el laboratorio y a todos los integrantes del Laboratorio de Virología.

Debo agradecer de manera especial a mi asesora, la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por permitirme ser parte de este proyecto y por su apoyo, orientación, conocimiento y paciencia.

Este trabajo se realizó con el apoyo de proyecto CONACYT CB-221186.

Resumen

La infección por el virus de la Hepatitis E (VHE) es una de las causas más comunes de enfermedad hepática aguda en el mundo en humanos. El VHE es un virus zoonótico, siendo el cerdo su principal reservorio. En países industrializados la infección por el VHE es relacionada con viajes al extranjero y consumo de productos animales contaminados. México es considerado un país endémico del virus; sin embargo la distribución del virus en el país en cerdos no ha sido investigada a profundidad. El propósito de este trabajo fue establecer la seroprevalencia del virus en el país, así como realizar un análisis molecular de los virus circulantes. La prevalencia de anticuerpos contra el VHE en producciones porcinas fue evaluada con una muestra representativa de 954 sueros de cerdo de diferentes regiones de México. Un ensayo de ELISA comercial para el VHE fue usado para obtener la seroprevalencia. La prevalencia de anticuerpos global fue de 59.4%, la prevalencia regional más alta se estableció en la región norte (86.6%), significativamente más alta que en las regiones central (42.7%) y sur (51.5%) ($p < 0.001$). El análisis molecular se llevó a cabo por RT-PCR dirigido a una región que codifica para la proteína de cápside.

Anticuerpos contra el VHE fueron detectados en sueros porcinos provenientes de México. Los resultados mostraron una alta seroprevalencia en la región norte del país.

HEV; México; Seroprevalencia; cerdos; hepatitis

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) infection is one of the most common causes of acute liver diseases worldwide. In developing countries, HEV is commonly associated with waterborne outbreaks. Conversely, in industrialized countries, HEV infection is often associated to travel to endemic regions or ingestion of contaminated animal products. Mexico is considered an endemic country for HEV; however, the distribution of the virus in the country is largely unknown. Here, we assessed the seroprevalence and molecular detection of HEV among pigs in different geographical regions in Mexico

Findings: The prevalence of anti-HEV antibodies in swine herds in Mexico was evaluated in a representative sample including 954 pig serum specimens from different regions in Mexico. A commercial ELISA assay for HEV was used for calculating the seroprevalence. The global prevalence of anti-HEV IgG was 59.4%. According to the region, the highest prevalence was found in the northern region (86.6%), compared to 42.7% and 51.5% in the central and southern regions, respectively ($p < 0.001$)

Conclusions: Anti HEV antibodies were detected in swine sera in Mexico. The results showed that swine that HEV seroprevalence in the northern states (86.6%) is significantly higher than in other regions in the country.

Keywords: HEV; Mexico; seroprevalence; pigs

INDICE

LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	X
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	3
VIRUS	5
ESTRUCTURA.....	5
GENOMA	6
CLASIFICACIÓN	9
TRANSMISIÓN	11
EPIDEMIOLOGÍA	12
PATOGENIA.....	15
SIGNOLOGÍA	17
REPLICACIÓN.....	19
DIAGNÓSTICO	21
PREVENCIÓN Y CONTROL	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24

MATERIAL Y MÉTODOS	25
ANÁLISIS MOLECULAR POR LA TÉCNICA DE RT-PCR	25
<i>Muestras clínicas para análisis molecular</i>	<i>25</i>
<i>Extracción de ARN.....</i>	<i>25</i>
<i>Detección del genoma viral por RT-PCR.....</i>	<i>27</i>
<i>Secuenciación de genoma completo de VHE.....</i>	<i>30</i>
ANÁLISIS SEROLÓGICO POR ELISA PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VHE31	
<i>Cálculo de tamaño mínimo de muestra para análisis serológico.....</i>	<i>31</i>
<i>Ensayo Inmunoenzimático.....</i>	<i>32</i>
RESULTADOS	33
ANÁLISIS MOLECULAR	33
<i>Detección de genoma viral por RT-PCR.....</i>	<i>33</i>
<i>Diseño de oligonucleótidos para secuenciación de genoma completo</i>	<i>33</i>
ANÁLISIS SEROLÓGICO	34
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	37

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Protocolo de RT-PCR 1.....	28
Cuadro 2. Protocolo de RT-PCR anidada. El producto esperado para esta RT-PCR anidada es de 348 bp.....	29
Cuadro 3. Oligonucleótidos diseñados para la secuenciación completa del genoma viral de VHE.	33
Cuadro 4. Muestras analizadas con la prueba ELISA, divididas según su distribución estatal.	35
Cuadro 5. Muestras positivas a la prueba ELISA, divididas según su distribución geográfica y etapa de producción. Datos mostrados como n(%). Análisis de Chi-cuadrada. *p< 0.001.....	36

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema del genoma del VHE, se muestra la información de genoma en marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) y análisis mostrando la variabilidad nucleotídica a lo largo del genoma de los Genotipos 1, 3 y 4 de <i>Orthohepevirus</i> . El análisis se realizó usando DNAsp software y secuencias reportadas en NCBI.	7
Figura 2. Genotipos y subgenotipos de <i>Orthohepevirus</i> de cepas reportadas con su genoma completo obtenidas en NCBI. Dendograma realizado con el método de unión de vecinos (MEGA6).	11
Figura 3. Ciclo de replicación viral de VHE.	20
Figura 4. Alineamiento de los iniciadores utilizados a una secuencia de referencia.	27
Figura 5. Distribución y tamaño de muestra por estado	34

Abreviaturas

VHE: Virus de la Hepatitis E

ARN: Ácido Ribonucleico

OIE: Organización Internacional de la Salud

EUA: Estados Unidos de América

ORF: Marco Abierto de Lectura (Open Reading Frame)

Th: Linfocito T Cooperante

PI: Post-Infección

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

ALT: Alanina-aminotransferasa

HSPG: Heparan Sulfato

HSC70: Proteína de Shock Calórico

ELISA: Enzimoimmunoanálisis (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RT: Transcripción Reversa

TMB: Tetramethylbenzidina

DO: Densidad óptica

HRP: Peroxidasa de Rábano Picante

Introducción

El virus de la Hepatitis E (VHE) es un virus hepatotrópico que provoca hepatitis aguda, que en el caso de humanos puede ser subclínica hasta fulminante (Purcell & Emerson 2008). Es reconocido como una enfermedad emergente de distribución mundial debido al creciente número de casos en países antes considerados no endémicos. El descubrimiento de otros signos clínicos ha sido discutido por algunos investigadores ya que la vigilancia epidemiológica e investigación ha aumentado provocando que el reporte de casos positivos sea mayor que en décadas previas. El estimado actual de infecciones iniciales de acuerdo a la Organización Internacional de la Salud (OIE), es de alrededor de 20 millones, con 57,000 muertes aproximadamente. (WHO 2015)

Una característica particular de VHE entre otros virus hepatotrópicos es que, aunque los humanos son los hospederos naturales, también puede comportarse como un virus zoonótico con un amplio rango de reservorios incluyendo cerdos, marmotas, ratas, conejos, ciervos y hurones (World Health Organization. 2010; Nakamura et al. 2006; Kabrane-Lazizi et al. 1999; Cossaboom et al. 2011; Tei et al. 2003). El amplio número de posibles hospederos del virus ha aumentado el interés de estudio por la distribución y posibles vías de transmisión de la enfermedad.

México ha sido considerado un país endémico desde el descubrimiento de VHE Genotipo 2 en humanos, sin embargo la investigación de la situación epidemiológica de la enfermedad en el país ha sido escasa: no existe vigilancia epidemiológica de rutina y como resultado, la enfermedad con frecuencia no es reportada. Existen escasos estudios epidemiológicos realizados en poblaciones pequeñas de comunidades cerradas en humanos (Alvarado-Esquivel et al. 2015); aunque recientemente se publicó un estudio que calcula la seroprevalencia en un número considerable de muestras porcinas ubicadas en el centro del país, el monitoreo en cerdos no es obligatorio, resultando en que la prevalencia real de VHE en cerdos en México debe incrementarse para tener un panorama real de la situación.

Algunos grupos de estudio han reportado la identificación de VHE porcino en suero, heces e hígados en puntos de venta al público (Cooper et al. 2005; Cantu-Martinez et al. 2013), lo que genera preguntas sobre la distribución y prevalencia del virus en producciones en México. Este estudio tuvo como objetivo establecer la prevalencia y distribución de esta enfermedad en cerdos de producciones ubicadas en diferentes regiones del territorio mexicano con el uso de técnicas moleculares y serológicas.

Antecedentes

Los primeros reportes históricos de brotes ictericos en humanos que pueden ser asociados a VHE datan del s. XVII (Dalton 2014), sin embargo el primer caso

documentado de una enfermedad provocada por este virus ocurrió en Kashmir, India en 1978 cuando un brote de hepatitis viral afectó alrededor de 52,000 pacientes y cerca de 1700 muertes, este brote estuvo limitado a la población que consumía agua de una misma fuente, la cual reveló tener contaminación fecal (Khuroo 1980). Pruebas serológicas para Hepatitis A y B resultaron negativas, lo que indicaba un virus de hepatitis no reportado previamente. Años después, la transmisión experimental de la enfermedad fue realizada en un voluntario, ingiriendo muestras de pacientes de un caso previo de hepatitis, confirmando la transmisión fecal-oral del virus (Balayan et al. 1983). En 1986, en México un virus relacionado con VHE de India fue el responsable de 223 casos de hepatitis y tres muertes, este virus fue clasificado como VHE Genotipo 2 (Velázquez et al. 1990).

En 1995 y 1997 se identificó por primera vez un virus en cerdos infectados naturalmente en Nepal y EUA, él cual estaba relacionado con VHE en humanos. Análisis filogenéticos de VHE porcino mostraron una relación cercana con cepas obtenidas en humanos de la misma región geográfica, lo que sugiere la posibilidad de infecciones interespecies y transmisión zoonótica del virus (Huang et al. 2002), este virus se clasificó como VHE genotipo 3. En 1998 el cuarto genotipo de VHE fue identificado en muestras de casos en humanos y cerdos en China (Hsieh et al. 1998).

Más evidencia de la naturaleza zoonótica del virus se obtuvo en 2003 cuando VHE fue encontrado en hígados de cerdos en tiendas de venta al público, las

secuencias obtenidas de estas cepas tenían un similitud cercana a las obtenidas de pacientes en la misma región que reportaron haber consumido hígado de cerdos, estos resultados demostraron que la infección de Hepatitis E puede ser causada por ingestión de productos animales contaminados (Yazaki et al. 2003).

Con estos descubrimientos se comenzó la investigación del VHE como virus de importancia zoonótica. Así mismo, se ha encontrado también positividad serológica al virus fue encontrada en otras especies animales como son: marmotas, ciervos, ratas, perros, gatos, vacas, ovinos y gallinas (Zhang et al. 2008; Wang et al. 2002; Nakamura et al. 2006) esto sugirió la posibilidad que no solamente los cerdos, sino también otras especies animales pudieran funcionar como reservorios para el virus y representar una posible fuente de infección.

Hasta la fecha ARN viral ha sido confirmado en ratas, marmotas, ciervos, gallinas, conejos y camellos (Cossaboom et al. 2012; Woo et al. 2014; Kabrane-Lazizi et al. 1999; Nakamura et al. 2006; Tei et al. 2003; Huang et al. 2002), lo cual provocó una clasificación del virus y sus 4 genotipos establecida en 2014 dentro del Género *Hepevirus* de acuerdo con la especie hospedera.

Virus

Estructura

Los viriones de Hepatitis E son partículas esféricas, no envueltas con simetría icosaédrica. Las partículas virales son de aproximadamente 32 a 34 nm de diámetro y compuestas principalmente por la proteína de cápside (pORF2) (Xing

et al. 1999). La proteína pORF2 se autoensambla para formar la cápside que contiene el genoma viral la cual está conformada por 180 capsómeros, formando una partícula muy similar para los cuatro genotipos, la cápside se asocian con lípidos y la proteína ORF 3 (pORF3) en la superficie viral. (Johne et al. 2014; Okamoto 2013)

Genoma

El genoma viral consiste en ARN de cadena sencilla y sentido positivo de aproximadamente 7.2 kilobases de longitud. Consiste en un extremo terminal 5' con cap, el cual es esencial para la infectividad, seguida por una región no codificante de 27 a 35 nucleótidos, y tres marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican para las proteínas estructurales y de replicación, finalmente otra región no codificante de 65 a 74 nt seguida por una cola de poli-A (Emerson & Purcell 2003) (Figura 1).

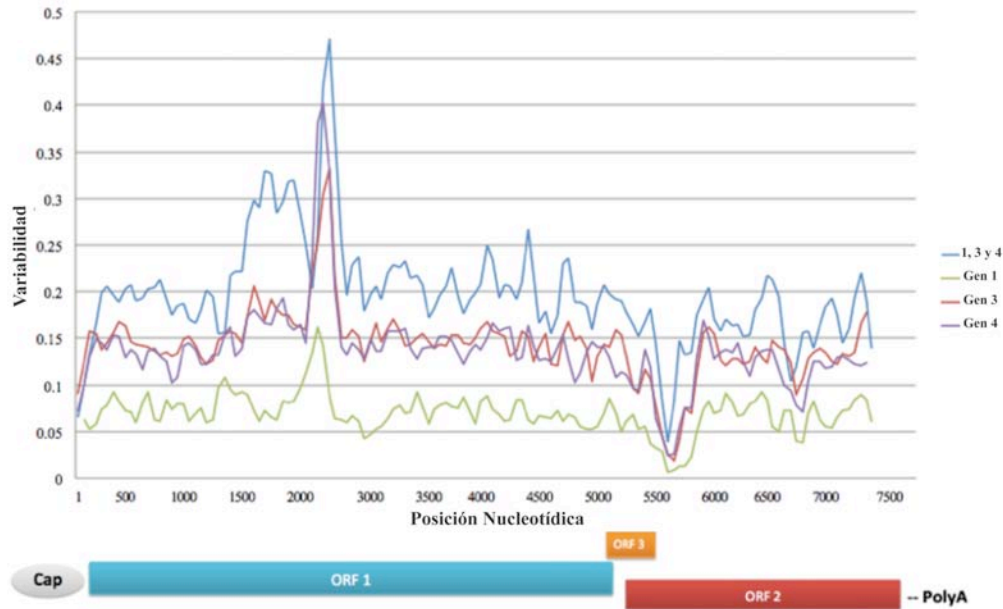


Figura 1. Esquema del genoma del VHE, se muestra la información de genoma en marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) y análisis mostrando la variabilidad nucleotídica a lo largo del genoma de los Genotipos 1, 3 y 4 de *Orthohepevirus*. El análisis se realizó usando DNAsp software y secuencias reportadas en NCBI.

El primer ORF (ORF1) consiste en 5109 nt (27-5135) codificando una proteína larga no estructural de 1702 aa involucrada en la replicación viral. Los dominios para las funciones de esta proteína están basadas en secuencias conocidas de otros virus y aún no están completamente comprobadas, estos dominios son: una metiltransferasa, proteasa cisteína, ARNhelicasa y una polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Koonin et al. 1992). Cuando es expresada en un sistema de baculovirus, la proteína ORF1 es procesada en proteínas más pequeñas que corresponden a los dominios funcionales propuestos (Sehgal et al. 2006).

La actividad de RdRp carece de un mecanismo de corrección de errores resultando una tasa de mutación de $1.40-1.72 \times 10E^3$ sustituciones de base por sitio, por año, responsables de una variabilidad genética significativa del virus (Takahashi et al. 2004). Dentro del ORF1, la región que comprende los nucleótidos 80 al 450 ha demostrado ser útil en análisis filogenéticos considerando que obtiene un árbol filogenético consistente con secuencias del genoma completo (Schlauder & Mushahwar 2001). El grado de variabilidad en secuencias entre los aislados de diferentes regiones del mundo ha sido calculado en 12% dentro del mismo genotipo y 19% entre genotipos (Lara et al. 2014).

El ORF2 consiste en 1983 nt que codifican para la proteína estructural de la cápside viral, contiene una región rica en arginina que puede estar involucrada en la encapsidación del ARN. La proteína es sintetizada como un precursor el cual es modificado por glicosidación en tres sitios para producir una proteína madura (P Vasickova et al. 2007), que contiene 3 dominios lineales: el dominio S (aa:119-319) y los dominios M (aa:320-454) y P (aa:320-606) que quedan en la superficie externa del virión, el dominio P es el posible sitio de reconocimiento de anticuerpos neutralizantes.

ORF3, tiene 345 nt de longitud y codifica para una fosfoproteína de 114 aminoácidos que se encuentra entre las regiones ORF 1 y 2, se sobrelapa con ORF1 en su terminal 5' y con ORF2 en su extremo 3' por 328 nt, pORF3 es necesario para la salida del virus de la célula infectada (Wang et al. 2000). Esta

proteína es necesaria para la infección *in vivo* (Graff et al. 2005), parece regular el medio ambiente de la célula huésped a través de su interacción con diversas vías intracelulares, favoreciendo la replicación viral y evitando la muerte de las células infectadas.

Clasificación

Definida al inicio como Hepatitis no-A, no-B, VHE fue originalmente clasificado dentro la de familia *Pircornaviridae* (Balayan et al. 1983). Sin embargo, fue posteriormente clasificado en la familia *Caliciviridae* debido a la morfología y organización genómica, esto fue modificado en 1997 luego de un análisis filogenético hecho por Reyes *et al.* (Reyes et al. 1990) fue clasificado como el único miembro del género *Hepevirus*.

El virus de la Hepatitis E está actualmente clasificado dentro de un género que comprende las cepas que afectan a aves y mamíferos denominado *Orthohepevirus*. Este a su vez se divide en especies: *Orthohepevirus A* que incluye las variantes que afectan humanos (Genotipos 1 - 4), así como aislados de camello, jabalí y otros mamíferos. *Orthohepevirus B*, incluye las variantes encontradas en aves. *Orthohepevirus C* corresponde a las variantes que afectan ratas y hurones. *Orthohepevirus D* incluye las cepas que infectan murciélagos. (Johne et al. 2010; Lack et al. 2012)

Actualmente existen cuatro genotipos principales de VHE dentro de la especie *Orthohepevirus A*, con un rango del 12% de divergencia de nucleótidos en el genoma completo dentro de cada grupo.

Los genotipos 1 y 2 están limitados a humanos y se transmiten principalmente por vía de ingestión de agua y alimentos contaminados. En países en desarrollo de Asia y África, donde se han reportado brotes epidémicos con alta morbilidad y mortalidad en mujeres embarazadas, las infecciones por estos genotipos en países desarrollados casi siempre están relacionados con viajes al extranjero. (World Health Organization. Dept. of Immunization 2010)

Los genotipos 3 y 4 son zoonóticos y son responsables de casos esporádicos de la enfermedad, mayormente en países industrializados, previamente se creía que estos casos estaban relacionados con viajes a áreas endémicas, sin embargo en los últimos años se han demostrado casos sin historial previo de viajes. Aislados autóctonos de genotipo 3 han sido reportados en países que antes se creían no endémicos (Han et al. 2014). Los genotipos zoonótico afectan un amplio rango de animales, los cerdos se consideran el reservorio principal. (Figura 2).

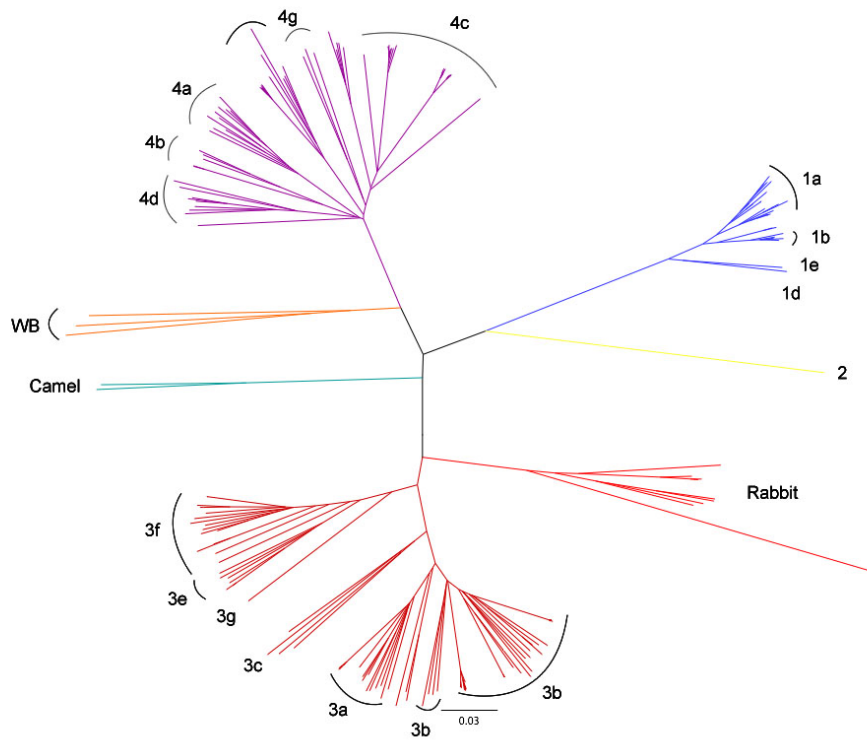


Figura 2. Genotipos y subgenotipos de *Orthohepevirus* de cepas reportadas con su genoma completo obtenidas en NCBI. Dendograma realizado con el método de unión de vecinos (MEGA6).

Transmisión

La ruta primaria de transmisión del virus es por medio de la vía oro-fecal, esto ocurre por la contaminación de agua potable con aguas negras en cerdos y humanos, sin embargo infecciones en cerdos usando inoculaciones orales requieren altas dosis del virus y son menos efectivas que las infecciones parenterales (Bouwknegt et al. 2011).

Otras formas de transmisión en humanos incluyen la ingestión de productos de carne contaminada u obtenida de animales infectados. Brotes provocados por el

consumo de productos cárnicos contaminados derivados de hígados de cerdo han sido confirmados por análisis de secuencias en Japón (Li et al. 2005; Tei et al. 2003), donde 9 de 10 pacientes diagnosticados con síntomas clínicos notificaron haber consumido hígado de cerdo. El ARN viral fue encontrado en paquetes de hígado vendidos en tiendas de la zona y las secuencias obtenidas de estos paquetes y de los pacientes tuvieron una identidad de 98.5-100%. Estudios indican que el virus es inactivado por 60 °C por 20 minutos, sugiriendo el riesgo del consumo de carne cruda o poco cocinada (Barnaud et al. 2012). Otro factor de riesgo es la ingestión de mariscos contaminados ya que han sido identificados como fuente de infección; genoma viral ha sido encontrado en mejillones, con secuencias que se agrupaban con aquellas recuperadas en humanos. (Crossan et al. 2012) Se ha concluido que la mayoría de casos de infección por genotipo 3 son causados por consumo de comida contaminada o por origen zoonótico.

Vías de transmisión menos comunes en humanos son transfusiones de sangre de donadores infectados con cuadros subclínicos, esto representa un punto de preocupación para la seguridad de transfusiones debido a la gravedad de la enfermedad en pacientes inmunosuprimidos (Tamura et al. 2007).

Epidemiología

El VHE tiene una distribución mundial, estudios de seroprevalencia en países desarrollados son diversos y de porcentajes variables en humanos y cerdos, una razón para esto es el uso de ensayos serológicos de distinta sensibilidad. Es

importante mencionar que los genotipos no pueden ser distinguidos antigénicamente sin embargo tienen una distribución distinta tanto en cerdos como en humanos.

Las seroprevalencias reportadas en cerdos varían según el país: En Japón muestras de suero porcino revelaron que la presencia de anticuerpos anti-VHE fue de 57% (Tei et al. 2003), en China se determinó en 78% (Wang et al. 2002), en Países Bajos fue de 70% (Rutjes et al. 2014) y en Reino Unido se estableció una seroprevalencia de 85% (Banks et al. 2004), en Italia la seroprevalencia fue de 87% (Di Bartolo et al. 2011), 59.4% en Canadá (Yoo et al. 2001), 64.8% fue establecido en Alemania (Baechlein et al. 2010), recientemente la seroprevalencia en México fue establecida en 30.7% (Merino-Ramos et al. 2016).

Es posible que el tipo de producción pueda influenciar el nivel de seroprevalencia. En un estudio hecho por Rutjes *et al.* 2014 (Rutjes et al. 2014) mostró que la seroprevalencia de los cerdos criados en granjas convencionales fue menor que en granjas orgánicas, la razón de esto puede ser el consumo de residuos de cocina en lugar del uso de concentrados (Xiao et al. 2012a). Un estudio comparativo entre cerdos alimentados con residuos de cocina y concentrados mostró que el porcentaje de anticuerpos anti-VHE fue de 87.1% y 53.06% respectivamente y que la positividad a presencia de ARN viral fue de 61.5% en cerdos alimentados con residuos, pero negativos en cerdos alimentados con concentrados (Xiao et al. 2012a).

Países previamente considerados no endémicos para VHE, como Francia (Mansuy et al. 2004), Reino Unido (Dalton et al. 2007), EUA (Kwo et al. 1997), Australia (Cowie et al. 2005), y España (Fogeda et al. 2009) han reportado infecciones autóctonas en humanos por genotipo 3. La identificación y caracterización del VHE porcino y su cercana relación con el VHE obtenido en humanos en áreas cercanas sugiere una posible transmisión zoonótica de VHE genotipo 3 en países industrializados, indicando la importancia de VHE como un agente zoonótico de importancia.

Estudios seroepidemiológicos en humanos han mostrado que la prevalencia de anticuerpos anti-VHE es muy diversa, por ejemplo en Francia la seroprevalencia en donadores de sangre era inicialmente alrededor de un 16% (Mansuy et al. 2008), pero resultó ser 3.1 veces mayor en un estudio posterior cuando otro kit comercial, más sensible fue utilizado (Mansuy et al. 2011). En México se han reportado diferentes seroprevalencias en humanos de poblaciones distintas: 5.7% en mujeres embarazadas, 6.7% en menonitas y 36.6 - 61% en población general en el estado de Durango (Alvarado-Esquivel, Sanchez-Anguiano, et al. 2014; Alvarado-Esquivel et al. 2015; Alvarado-Esquivel, Sanchez-Anguiano, et al. 2014) . Los datos sugieren un número elevado de casos subclínicos, debido a los pocos reportes de casos con una enfermedad clínica grave.

En países en desarrollo, han ocurrido brotes en Pakistán, Somalia, Sudán, Nepal, China, Etiopia Ghana Uganda y México entre otros países (Burans et al. 1994; Guthmann et al. 2006; Shrestha 2006; Zhuang et al. 1991; Tsega et al.

1991; Adjei et al. 2009; Teshale et al. 2010; Velázquez et al. 1990; Rab et al. 1997). Estos brotes fueron causados por contaminación de fuentes de agua por genotipos 1 y 2, los cuales no son zoonóticos, y afectaron principalmente a hombres de entre 15-35 años. La seroprevalencia en niños menores a 10 años es muy baja (Purcell & Emerson 2008). En México, además del genotipo 2, se ha reportado la presencia de VHE genotipo 3 en muestras porcinas (Cooper et al. 2005).

La prevalencia de VHE puede variar también dependiendo de la región y de la población; en China las comunidades rurales del sur del país presentaron mayor prevalencia que al norte; en Japón se descubrió una diferencia significativa en la positividad entre géneros, siendo mayor en hombres (7.8%) que en mujeres (3.4%) (Mushahwar 2008).

Patogenia

La mayoría de infecciones por VHE en cerdos tienen un curso silencioso. El VHE ingresa en el hospedero principalmente por vía oral. Un estudio realizado en cerdos infectados experimentalmente con el virus reportó una duración de la viremia de 11 (8-13) días, detectada a partir del día 19 PI, el ARN viral fue detectado en el día 7 PI durante un promedio de 23 (18 -27) días (Bouwknegt et al. 2008). Estos animales no presentaron elevaciones inmediatas de ALT o AST. Microscópicamente se encuentra necrosis focal con acumulación de macrófagos mononucleares. El ARN viral ha sido detectado en hígado, tonsilas, nódulos linfáticos, bazo, riñones e intestino delgado y grueso (Choi & Chae

2003).

En cerdos, bajo condiciones naturales, luego de la adquisición de inmunidad pasiva a través de calostro de la madre, los anticuerpos maternos disminuyen a las 8-10 semanas de edad, posteriormente ocurre una seroconversión entre las 14-17 semanas de edad; VHE puede ser detectado en heces, bilis, hígado y nódulos linfáticos desde las 9 semanas de edad con pico a las 15 semanas, esto coincide con los títulos más altos de IgG y IgM (de Deus et al. 2008).

La presencia del genoma viral en suero y heces son muy elevados al comienzo de la infección pero disminuyen al final de esta, coincidiendo con la elevación de anticuerpos anti-VHE y la presentación de signos, esto sugiere que el mecanismo patogénico de la enfermedad puede estar asociado a la respuesta inmune, y no relacionado directamente con la replicación viral y al efecto citopático del VHE (Rodríguez-Frias et al. 2012).

En humanos el tiempo de incubación puede variar de 2 a 8 semanas seguidas a la exposición, la viremia llega a su pico durante la incubación y disminuye al inicio de los signos clínicos. El ARN-VHE se detecta en el suero de casi todos los pacientes humanos en las dos semanas tras el inicio de la enfermedad (P Vasickova et al. 2007) y puede ser positivo por 4-16 semanas. Se encuentra excreción fecal del virus en promedio cinco días antes y hasta dos semanas después del inicio de la enfermedad clínica (World Health Organization. Dept. of

Immunization 2010). A nivel hepático, antígenos del VHE, pueden visualizarse a los 7 días PI, y en el 70 al 90% de los hepatocitos en el pico de la replicación viral, simultáneamente con la aparición del VHE en bilis y heces, días antes del inicio de la elevación de la alanina-aminotransferasa (ALT).

En mujeres embarazadas infectadas por el VHE se observa una alta tasa de mortalidad en comparación con mujeres no gestantes, se ha sugerido que la mortalidad está relacionada con un cambio hacia linfocitos Th2 en el equilibrio Th1/Th2 . Los cuadros clínicos graves frecuentemente se asocian a una alta frecuencia de coagulación intravascular diseminada, relacionada con los cambios inmunológicos y hormonales durante el embarazo (Navaneethan et al. 2008), sin embargo, esta situación no ocurre en cerdas preñadas (Kasorndorkbua et al. 2003).

Signología

En cerdos

El reservorio principal para el genotipo 3 y 4 son los cerdos domésticos y jabalíes. En un estudio realizado por Halbur *et al*, 2001 (Halbur et al. 2001) los cerdos inoculados mostraron lesiones en hígado y hepatitis ligera, significativamente menos severa en cerdos inoculados con cepas de VHE humanas, que con cepas de VHE obtenidas en cerdos.

Se ha demostrado que el VHE, en la mayoría de los casos, solo provoca infecciones subclínicas en cerdos (Halbur et al. 2001), sin embargo, se han

reportado lesiones patológicas severas observadas en las necropsias de lechones coinfectados con VHE y Circovirus Porcino 2 (PCV2) en China (Yang et al. 2015). La coinfección experimental de VHE y Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) resultó en un aumento del tiempo de excreción viral de VHE (48.6 días) comparado con el tiempo de excreción en infecciones de VHE (9.7 días), esta diferencia probablemente es provocada por una respuesta humoral retardada en los cerdos coinfectados (Salines et al. 2015).

El impacto económico en la producción porcina aun es desconocido, sin embargo el riesgo para las personas que trabajan en granjas porcinas o en producción animal, al igual que en procesamiento de carne y subproductos y su desperdicio, debe ser considerado.

En humanos, desde un punto de vista clínico, Hepatitis E es muy similar a Hepatitis A, son auto-limitantes y los síntomas agudos varían en severidad de subclínica hasta fulminante (Emerson & Purcell 2003). Los signos clínicos incluyen: ictericia, hepatomegalia, dolor abdominal, náusea y vómito. Elevación en las enzimas hepáticas como alanina, aminotrasferasa y transaminasa aspartato también son comunes (WHO 2015).

La infección por genotipo 1 en mujeres embarazadas durante el segundo y tercer trimestre de la gestación lleva el mayor riesgo de hepatitis fulminante, con una tasa de mortalidad de hasta un 20%; sin embargo la infección por genotipo 3 no parece elevar el riesgo de enfermedad severa en mujeres embarazadas

(Khuroo & Kamili 2003).

Aunque muchas infecciones por VHE son subclínicas y no muestran signos, infecciones crónicas han sido documentadas en hospederos inmunocomprometidos, incluidos recipientes de trasplantes y aquellos positivos a VIH (Kamar et al. 2008).

Replicación

La replicación de VHE toma lugar en el citoplasma de los hepatocitos. El receptor específico de entrada aún se desconoce, pero un estudio hecho por Zheng en 2010 sugiere que la región C-terminal de la proteína de cápside se une con la proteína HSC70 en la superficie celular (Zheng et al. 2010). Se ha demostrado que el virus se une a receptores de Heparan Sulfato (HSPG) y entra por endocitosis mediada por clatrina (Kapur et al. 2012). El tráfico intracelular del virus es posible por la interacción con la proteína HSP90, luego la partícula pierde su cubierta en el citoplasma y el ARN viral es liberado dentro de la célula (Figura 3).

La traducción de ORF1 es iniciada por el cap (Zhang et al. 2001) en una poliproteína no estructural que probablemente es dividida posteriormente con funciones de metiltransferasa, proteasa, helicasa y polimerasa. La polimerasa sintetiza una cadena completa en sentido negativo a partir de la cadena positiva de ARN genómico, esta cadena se detecta en el nivel más alto a las ocho horas

post-infección (Varma et al. 2011). El ARN negativo sirve como un molde para la replicación del genoma viral y la transcripción de las regiones subgenómicas de sentido positivo que codifican las proteínas estructurales pORF2 y pORF3 (Varma et al. 2011); pORF2 es la proteína que encapsida el ARN genómico para formar nuevos viriones. Las partículas de VHE son secretadas a través de la membrana apical del hepatocito y desde ahí, en la bilis al intestino delgado (Arends et al. 2014).

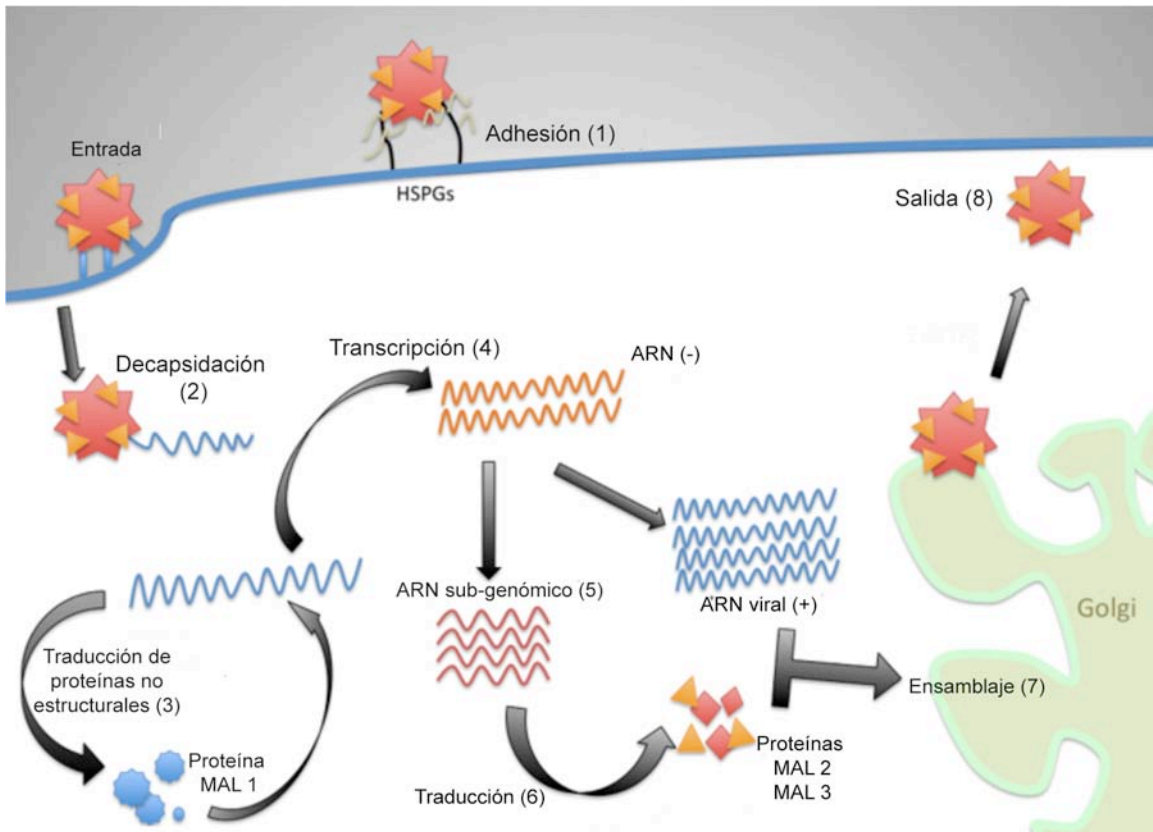


Figura 3. Ciclo de replicación viral de VHE. (Kapur et al. 2012; Varma et al. 2011; Perttola et al. 2013)

Diagnóstico

El diagnóstico por detección de ARN viral por medio de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) en suero o heces se enfoca en la detección de regiones conservadas del genoma como es la región inicial de ORF2 (Inoue et al. 2006; Huang et al. 2002).

Hepatitis E aguda es confirmada por la detección de IgM anti-VHE por ensayo Inmuno-enzimático indirecto (ELISA) basado en la proteína de cápside del virus: Aunque la especie de VHE *Ortohepevirus A* está dividida en 4 Genotipos, solo existe un serotipo, por lo que las pruebas comerciales son capaces de detectar los cuatro genotipos virales. Luego de una infección en humanos, la respuesta IgM suele ser detectada durante un corto periodo de tiempo, detectándose en altos niveles por 8 semanas, dejando de detectarse 32 semanas luego del comienzo del cuadro clínico (Huang et al. 2010) y es seguido por una elevación de anticuerpos IgG en la cuarta semana después de la infección, posteriormente una disminución, siendo indetectable en 28-67% de los pacientes de 1-2 años luego de la presentación de signos clínicos (Goldsmith et al. 1992).

En humanos el diagnóstico de la infección por VHE depende en gran medida de los signos clínicos y la eliminación de otras causas de hepatitis aguda que son indistinguibles basadas solo en signología, especialmente con Hepatitis A.

Prevención y Control

El control de VHE en granjas porcinas esta centrado en medidas sanitarias preventivas, el uso de agua potable en la producción así como el manejo y origen adecuado del alimento que consumen los animales es indispensable para prevenir la propagación del virus, ya que se ha sugerido que el uso de desechos humanos como alimento para los cerdos aumenta la prevalencia del virus (Xiao et al. 2012b). El tratamiento adecuado de agua y de desechos también es necesario para evitar la propagación. Las personas en contacto directo con cerdos, así como trabajadores de la industria porcina y médicos veterinarios deben tomar precauciones en el manejo de animales y sus subproductos.

La prevención de la enfermedad causada por Hepatitis E se ha centrado en la sanitación y mejoramiento del tratamiento de aguas, así como de medidas preventivas que deben ser tomadas con poblaciones en riesgo particular de hepatitis fulminante, incluyendo aquellos pacientes que estén inmunocomprometidos. En países desarrollados, donde la transmisión zoonótica es considerada la principal vía de contagio, los consumidores de carne poco cocida o cruda así como personas con relación cercana de posibles reservorios deben ser informados del riesgo y de las medidas preventivas.

Dos vacunas anti VHE han sido desarrolladas para su uso en humanos, la primera, desarrollada por la compañía GlaxoSmithKline y el Water Reed Army Institute of Research (WRAIR), ha sido probada en voluntarios estadounidenses

para pruebas en fase I, mostró ser inocua a varias dosis, en la evaluación fase II, la eficacia llegó a ser de 95.5% después de tres dosis, esta prueba fue realizada en 2000 adultos en Nepal (Shrestha et al. 2007; Arends et al. 2014).

La segunda vacuna es conocida como Hecelon y fue probada en más de 112,000 voluntarios chinos y demostró una eficiencia de alrededor de 94-100% (95% CI: 72.1-100). Esta vacuna ya tiene licencia en China desde Diciembre de 2011 (Zhu et al. 2010). Esta vacuna fue probada en conejos, los cuales indujeron títulos de anticuerpos anti-VHE y no mostraron signos de la enfermedad, al contrario del grupo control (Liu et al. 2014).

Justificación

Diversos reportes a nivel mundial han señalado a los cerdos como un reservorio natural del HEV con potencial riesgo zoonótico. El virus está presente en las granjas de cerdos en todo el mundo; en México se ha reportado la identificación del genoma viral en granjas de producción y en puntos de venta de carne de cerdo para consumo humano. Esto representa un probable riesgo de transmisión zoonótica, por lo que es importante conocer el estatus de epidemiológico de esta infección en las producciones porcinas en México.

Hipótesis

Al examinar sueros porcinos provenientes de diferentes estados de México mediante RT-PCR y ELISA, se podrá confirmar la presencia de ARN viral y

anticuerpos anti-VHE, así como su relación con las diferentes etapas de producción a las que pertenecen y su distribución geográfica.

Objetivo General

Confirmar la presencia de VHE en sueros porcinos usando la técnica de RT-PCR, así como la prevalencia de anticuerpos contra la pORF2 de VHE en sueros de cerdos de diferentes producciones y etapas productivas en México.

Objetivos Particulares

- Demostrar la presencia de VHE en cerdos provenientes de producciones porcinas en el territorio mexicano mediante la identificación molecular de un fragmento de pORF2 VHE en sueros.
- Realizar la caracterización completa del genoma del VHE por medio del uso de una plataforma de siguiente generación 454 de Roche.
- Confirmar la presencia de anticuerpos contra pORF2 en cerdos en México obtenidas en 2014 y 2015 mediante el uso del kit comercial WANTAI VHE-IgG ELISA.
- Establecer la prevalencia de anticuerpos contra VHE en cerdos de diferentes etapas de producción de una granja porcina, así como la seroprevalencia en diferentes regiones y global del territorio mexicano

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis molecular por la técnica de RT-PCR

Muestras clínicas para análisis molecular

Para llevar a cabo el análisis molecular de muestras de cerdos se realizó un muestreo en cerdos de traspatio provenientes de la delegaciones Xochimilco y Azcapotzalco en la Ciudad de México donde se obtuvieron 50 muestras de suero y 20 fecales. Se utilizaron 20 sueros del banco de sueros del laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, provenientes del Estado de México. Se examinaron también, 113 sueros de humanos del estado de Yucatán que presentaban ictericia al momento del muestreo con la intención de establecer una asociación entre los posibles aislados a obtener en estas muestras con las obtenidas en 100 sueros porcinos provenientes de la misma región, los cuales fueron proporcionados por el Dr. Carlos Marchain-Williams de la Universidad Autónoma de Yucatán*.

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó la técnica de purificación por columnas de centrifugado, donde se usó el Kit QiAamp Viral ARN mini spin (QIAGEN), usando 200 µl de suero, el procedimiento se realizó de acuerdo a las especificaciones técnicas del kit, con siguiente protocolo:

1. - Se agregaron 0.20 uL de Buffer AVL en un microtubo de 1.5ml
2. - Se agregaron 200 uL de muestra

3. – Se añadieron 200 uL de Buffer AL a la muestra y mezclaron por Vortex por 15 segundos.
4. – Se incubaron por 10 min a 56°C.
5. – Se precipitó el material genético añadiendo 200 uL de etanol al 100% y mezclar por inversión 3-6 veces
6. – Se transfirió el sobrenadante a una columna Mini Spin contenida en un tubo colector.
7. – Centrifugación a 6 000 g, 1 min.
8. – Se retiró el tubo colector con su contenido y puso la columna en un nuevo tubo colector.
9. – Se añadió 500 uL a la columna de Buffer AW1 y se centrifugó 6 000 g por 1 minuto.
- 10.– Se retiró el tubo colector con su contenido y colocó la columna en un nuevo tubo colector.
- 11.– Añadió 500 uL a la columna de Buffer AW2 centrifugó 20 000 g por 3 minutos.
- 12.– Se colocó la columna en un micro-tubo de 1.5 ml. Añadió 30 uL de agua inyectable a la columna
- 13.– Centrifugación a 8 000 rpm para obtener el material genético.

Posteriormente el ARN fue analizado con el equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer, utilizando una longitud de onda de 260 nm para la cuantificación de ARN, y la relación OD_{260}/OD_{280} para verificar la calidad de la extracción. El ARN obtenido se conservó a -70°C hasta su posterior procesamiento.

Detección del genoma viral por RT-PCR

Un PCR de tamizado se realizó en todas las muestras colectadas. Para la detección del genoma viral en las muestras se realizó el siguiente protocolo de RT-PCR con los oligonucleótidos diseñados por Youssr Ben-Ayed del Instituto Pasteur en Túnez (datos no publicados), específicos para el genotipo 3 de VHE, usando una sonda artificial como control positivo. Figura 4.

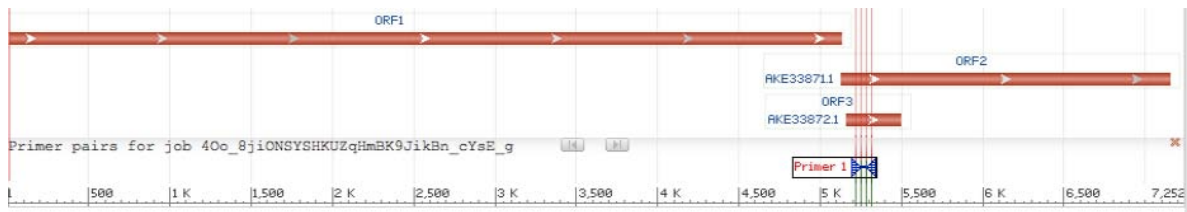


Figura 4. Alineamiento de los iniciadores utilizados a una secuencia de referencia.

Este ensayo de PCR fue diseñado en los laboratorios del CDC para la identificación rápida, sensible y sencilla de muestras positivas al genoma viral, empleando oligonucleótidos específicos para regiones altamente conservadas de la región ORF2 del genoma viral. El producto de amplificación esperado para este protocolo es de 98pb. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Protocolo de RT-PCR 1

RT	30 min	50° C
Activación	15 min	95° C
Desnaturalización	2 min	94° C
35 Ciclos		
Desnaturalización	30 seg	94 ° C
Alineación	30 seg	64 ° C
Extensión	30 seg	72 ° C
Extensión Final	10 min	72° C

Este protocolo se llevo a cabo usando el kit OneStep de Qiagen con la siguiente mezcla de reacción en un volumen final de 50 µl: 10µl del Buffer OneStep 5X, 2µl de dNTP (400 µM de cada dNTP), 2µl de mezcla de enzima RT-PCR OneStep, 1.5µl de cada iniciador (10 µM), 5 µl de ARN y agua grado molecular.

Para confirmar el resultado de los oligonucleótidos usados, también se utilizó el protocolo reportado por Huang, 2002 (Huang et al. 2002) los cuales han sido ampliamente usados para detección del virus en diferentes hospederos y consiste en una RT-PCR anidada con los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótidos externos:

3156N [forward, 5'-AATTATGCC(T)CAGTAC(T)CGG(A)GTTG-3']

3157N [reverse, 5'-CCCTTA(G)TCC(T)TGCTGA(C)GCATTCTC-3']

Oligonucleótidos internos:

3158N [forward, 5'-GTT(A)ATGCTT(C)TGCATA(T)CATGGCT-3']

3159N [reverse, 5'-AGCCGACGAAATCAATTCTGTC-3'].

Cuadro 2. Protocolo de RT-PCR anidada. El producto esperado para esta RT-PCR anidada es de 348 bp

RT	30 min	50° C
Activación	15 min	95° C
Desnaturalización	5 min	94° C
40 Ciclos		
Desnaturalización	30 seg	94 ° C
Alineación	30 seg	42 ° C
Extensión	30 seg	72 ° C
Extensión Final	7 min	72° C
Protocolo Interno		
Desnaturalización	2 min	94° C
35 Ciclos		
Desnaturalización	30 seg	94 ° C
Alineación	30 seg	42 ° C
Extensión	30 seg	72 ° C
Extensión Final	10 min	72° C

Este protocolo anidado se llevo a cabo usando el kit OneStep de Qiagen con la siguiente mezcla de reacción: 10µl del Buffer OneStep 5X, 2µl de dNTP (400 µM de cada dNTP), 2µl de mezcla de enzima RT-PCR OneStep, 1.5 µl de cada iniciador externo (10 µM), 5 µl de ARN y agua grado molecular para obtener un volumen final de 50µl. Utilizando un termociclador (MasterCycler Gradient, Eppendorf). Posteriormente se tomó 1 µl de esta reacción como templado para la reacción de amplificación con los iniciadores internos usando Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) con la siguiente mezcla de reacción: 5 µl de 10x PCR Buffer, 1 µl de dNTP mix (10mM), 2 µl MgCL2 (50 mM), 1 µl de ambos iniciadores internos (10 µM), 0.2 µl de Platinum Taq Polymerase y agua grado molecular.

Es importante mencionar que la mayoría de las muestras fueron agrupadas en pools de 10 sueros para su análisis, excepto las muestras provenientes de la Ciudad de México.

Secuenciación de genoma completo de VHE.

Para la realización de la secuenciación del genoma completo de VHE, se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos basados en el genotipo 3 de VHE usando el software DNASTAR Primerselect.

Considerando la longitud de los oligonucleótidos dentro del rango de lectura de la química usada (menor a 800pb) y tomando en cuenta los requerimientos de la plataforma 454 de Roche con el protocolo GS FLX Titanium para secuenciación de amplicones.

Los oligonucleótidos de fusión consisten en 20-25bp secuencia específica a la secuencia de interés y una sección fija en el extremo 5'. Según la química GS FLX Titanium Sequencing Kit XL, para la preparación de la biblioteca según los métodos del sistema GS FLX.

Sentido (Primer A-Key):

5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-{Secuencia específica}-3'

Anti-sentido (Primer B-Key):

5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-{Secuencia específica}-3'

Análisis serológico por ELISA para detección de anticuerpos contra VHE

Cálculo de tamaño mínimo de muestra para análisis serológico

La selección de las muestras se realizó con el banco de sueros del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, que cuenta con un total de 17850 sueros colectados en diferentes estados de la República Mexicana.

El tamaño mínimo de muestra fue calculado considerando el censo de 2013 del SIAP, con base a la ecuación propuesta por Daniels para la determinación de número de muestras, ya que se estimó una seroprevalencia del 80% y un error estimado del 5%, basado en lo reportado por Cooper *et al.* 2005 .

La selección de las muestras se realizó a través de un muestreo aleatorio simple de dos etapas, en la primera se determinó el número de muestras necesarias por entidad federativa, para ello se obtuvieron números aleatorios del 1 al 17,850 y mediante una lista con las frecuencias acumuladas de los sueros se definió el número a tomar de cada entidad federativa.

Ensayo Inmunoenzimático

Los sueros fueron analizados para IgG anti-VHE por medio del kit comercial WANTAI VHE-IgG ELISA (Wantai Biopharmaceutical, Inc. Beijing, China), según las instrucciones del fabricante usando proteína A-HRP (peroxidasa de rábano picante) (Bio-Rad, CA, USA) como conjugado secundario.

EL procedimiento se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante, diluyendo las muestras 1/100 e incubándolas durante 30 minutos en una placa cubierta con la proteína viral. Luego de lavar la placa, se realizó otra incubación con la proteína A conjugada la cual se unió a los anticuerpos aún contenidos en la placa. La solución cromógena conteniendo tetramethylbenzidina (TMB) y peróxido de urea fueron añadidos a los pozos y en presencia de HRP generan color. La solución de paro (ácido sulfúrico) detiene la reacción generando color amarillo. La intensidad del color fue medida por su densidad óptica (DO) usando un espectrofotómetro a 450nm (Thermo Fisher, Waltham, MA).

El punto de corte se calculó según lo recomendado por el fabricante tomando en cuenta la DO promedio de los controles negativos con la siguiente formula:

$$\text{Punto de corte} = C(-) + 0.16$$

Resultados

Análisis Molecular

Detección de genoma viral por RT-PCR

Se analizaron un total de 278 muestras de heces y suero de las cuales ninguna resultó positiva con los oligonucleótidos diseñados en CDC; para confirmar este resultado las muestras volvieron a analizarse con el protocolo de Huang, 2002 previamente descrito. En ninguno de los dos protocolos de RT-PCR utilizados se tuvieron muestras positivas además de la sonda usada para control positivo.

Diseño de oligonucleótidos para secuenciación de genoma completo

Se diseñaron y sintetizaron 14 pares de oligonucleótidos específicos para VHE genotipo 3 con una diferencia menor a 0.5 °C en T_m para poder ser usados en el mismo protocolo, sin embargo la dificultad para conseguir una muestra positiva a ARN VHE ha sido un obstáculo para realizar la prueba de esta plataforma y por lo tanto estos oligonucleótidos no han sido probados con virus de campo.

(Cuadro 3)

Cuadro 3. Oligonucleótidos diseñados para la secuenciación completa del genoma viral de VHE.

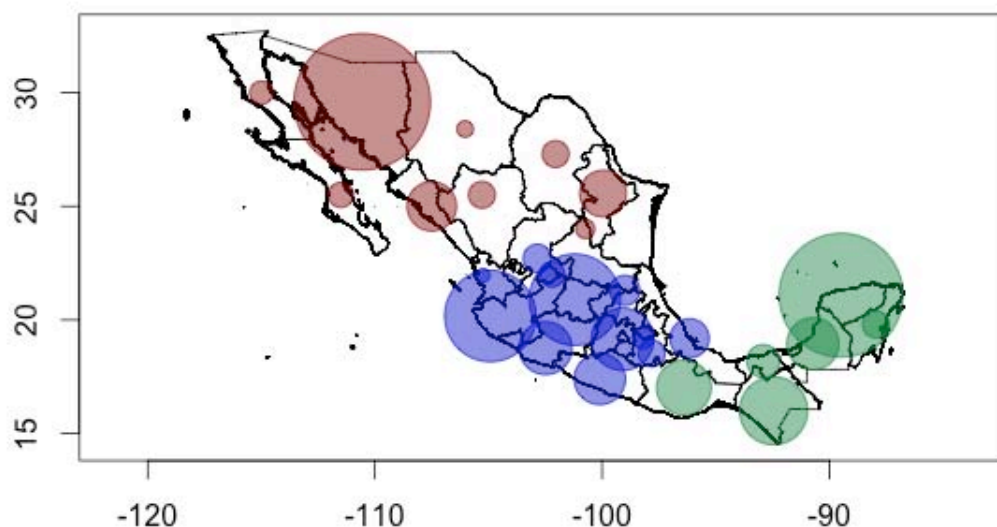
Sentido	Reverso
5 -- 3	5 --3
CGATGCCATGGAGGCCCA	GATGGAGTGCAGCATATAGACGTGTCAT
CTTTACTCTCTGCATGACCTCTGGCC	GGCATCCTCAGAGGCGTTCCA
CATATCTGGGACCGGCTCATGC	TCCAAGAAGCAGGTGCACTCCTG
CTGCCGCTGTAGGACTTTCCTAAAGA	AAGTCACTAGAAAAACCAGATGTGGACCA
CTCCCCTGGGCATATTTGGGA	GGCGGTGGTTACGCTCCCA

CAGAACCCAAAGAGGCTTGAGGC	AGCGGTGTGTAACATGCCACCA
CGCACCTGCTGCTGTTACACATGC	CGGCCATACGGCAGTGGACTAT
GCAGGGCCTGCTCTACATGCC	AACCTGATTAGCCACTGGGGCAT
TGGCCTTGAGTGTGTGGTTATGGA	GTCTGCAGCATGCCAATAAGGTTATG
GGGTAAACGAATGTTGCGCAGG	GCTGGGACTGGTCACGCCAA
CCCTATATTCATCCAACCAACCCCTT	CGTGGTCTCAACAGAGCGCCA
ACAACAACACTACCCCTACTTCTGTTGATATGAA	CCCTTATCCTGCTGCGCATTCTC
TTGTCTCAGCCAATGGCGAGC	GGCACTCCGGGCAGAAATCAT
CCGTGGTAAGCTGTCTTTCTGGGA	TTTTTTTTTCCAGGGAGCGCG

Análisis Serológico

Fueron analizadas un total de 945 muestras, de estas 292 (30.8%) fueron colectadas de estados ubicados en la región norte del país, 321 sueros (33.9%) pertenecían a las partes central y 332 a estados ubicados al sur de México (35.1%). Figura 5

Figura 5. Distribución y tamaño de muestra por estado



La prevalencia global de IgG anti-VHE fue de 59.4%. De acuerdo con la región,

la prevalencia mas alta fue encontrada en la región norte (86.6%), comparada al 42.7% y 51.5% de la región central y sur respectivamente ($p < 0.001$) como se indica en cuadro 4. Se encontró una diferencia significativa en la positividad de la región norte con la región central usada como grupo referencia ($p < 0.001$) (Cuadro 5). Los análisis estadísticos realizados fueron una prueba de Chi cuadrada y razón de momios, usando el paquete Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics v22.0, USA).

Al analizar los datos según la etapa de producción y estratificado por ubicación de granja de origen, no se observaron diferencias significativas en las regiones norte y central, sin embargo en la región sur se encontró una diferencia significativa entre las etapas de destete y reproductores ($p=0.012$). Esta diferencia entre etapas productivas no se observa a nivel global.

Cuadro 4. Muestras analizadas con la prueba ELISA, divididas según su distribución estatal.

	Muestras Analizadas	Muestras Positivas	%
Quintana Roo	8	3	37.5
Campeche	30	26	86.7
Chiapas	51	11	21.6
Guerrero	29	16	55.2
Oaxaca	33	25	75.8
Tabasco	12	1	8.3
Yucatán	169	89	52.7
	332	171	51.5
CDMX	43	20	46.5
Guanajuato	92	59	64.1
Jalisco	92	30	32.6
Michoacán	31	3	9.7
Nayarit	2	2	100.0
Puebla	8	0	0.0
Querétaro	10	5	50.0
Aguascalientes	7	1	14.3
Tlaxcala	5	2	40.0
Veracruz	17	6	35.3
Zacatecas	14	9	64.3
	321	137	42.7
Baja California	6	5	83.3
Baja California sur	7	0	0.0
Chihuahua	3	1	33.3
Coahuila	8	8	100.0
Durango	8	6	75.0
Nuevo León	24	20	83.3
Sinaloa	27	17	63.0
San Luis Potosí	4	4	100.0
Sonora	205	192	93.7
	292	253	86.6

Cuadro 5. Muestras positivas a la prueba ELISA, divididas según su distribución geográfica y etapa de producción. Datos mostrados como n(%). Análisis de Chi-cuadrada. * $p < 0.001$

Categoría	Prevalencia (%)	OR (IC 95%)
Destete	170 (56.9)	1
Engorda	202 (62.5)	1.267 (0.919-1.747)
Reproductores	189 (58.5)	1.070 (0.778-1.472)
Ubicación		
Central	137 (42.7)	1
Norte	253 (86.6)	8.712 (5.821-13.040)*
Sur	171 (51.5)	1.426 (1.0477 to 1.9422)
Positivos HEV	561 (59.4)	

Discusión y conclusiones.

En este estudio fue posible hacer un estudio serológico que abarca la mayoría del territorio nacional y establecer prevalencias global y regionales, sin embargo, el genoma viral no fue encontrado en los sueros analizados, esto puede deberse a principalmente a dos factores:

1) El bajo título viral encontrado comúnmente en este tipo de muestras en cerdos, a diferencia de muestras hepáticas o fecales, lo cual dificulta la detección de ARN viral en RT-PCR por punto final (Leblanc et al. 2010; Kasorndorkbua et al. 2004).

Es importante mencionar que a pesar de que el protocolo de CDC ha sido probado exitosamente en muestras porcinas y humanas, este ha sido usado solo en muestras fecales y hepáticas, y no en sueros, debido a esto y para confirmar los resultados negativos obtenidos, se usaron los oligonucleótidos anidados reportados por Huang, 2002 los cuales se han utilizaron en diversos tipos de muestras de cerdos y humanos.

2) La prueba molecular podría detectar el genoma viral en suero solo durante el corto período de viremia; la viremia en una infección por VHE en cerdos tiene una corta duración y ha sido detectada durante un promedio de 10.5 (8.1 – 13.0) días (Bouwknegt et al. 2008), esto da una pequeña ventana de tiempo en la cual

se puede detectar el VHE por RT-PCR en muestras serológicas después de una infección natural.

Aunque la presencia de ARN viral no pudo ser detectada en las muestras de sueros probados, se ha demostrado la alta prevalencia regional de anticuerpos contra VHE en cerdos domésticos en diferentes regiones de México. Los resultados mostraron que los animales están en contacto con el agente etiológico desde una etapa temprana de la producción, lo cual coincide con estudios realizados en otros países.

Los estudios sobre VHE en México han sido escasos. Recientemente, en un estudio realizado por Merino y colaboradores (Merino-Ramos et al. 2016), se determinó una prevalencia de 30.7% para la infección por Hepatitis E en un amplio número de muestras de cerdos de estados que integran el Bajío mexicano. Previamente la seroprevalencia en producciones porcinas había sido establecida en 81%, en granjas ubicadas en el norte del país (Cooper et al. 2005), cercano al porcentaje obtenido en la misma región en este estudio (86.6%). Seroprevalencias similares a las obtenidas han sido reportadas en Canadá, por Yoo *et al.* (2001) en 59% con una prevalencia aún más alta en algunas regiones (88.8%) y por Meng (1997) en Estados Unidos (73%). Estas diferencias regionales también fueron observadas en los resultados obtenidos en este trabajo.

El número de sueros positivos en la prueba de ELISA demuestra variaciones

significativas entre regiones, siendo la región norte la más prevalente. Las razones para esta diferencia en seropositividad pueden estar relacionadas con prácticas comunes en producciones altamente tecnificadas, que se han reportado como factores de riesgo incluyendo una alta densidad poblacional, camadas cambios de camada mayores a 25% y ciclos de producción más cortos (Walachowski et al. 2014).

La alta seropositividad observada en las 3 regiones de México, en conjunto con los reportes previos que muestran la circulación de VHE genotipos 2 y 3 en el país, sugieren una amplia distribución de VHE y resalta la importancia de infecciones no reportadas en humanos. El riesgo potencial de una infección de VHE transmitida de cerdos a humanos es un factor a ser considerado al manejar y consumir carne de cerdo y sus derivados que ha sido confirmado por diversos reportes de infección provocada por consumo de carne contaminada en otros países y el aumento en la seroprevalencia en trabajadores de industria porcina en comparación a la población general (Yazaki et al. 2003; Tei et al. 2003).

En México se han realizado escasos estudios sobre la epidemiología de VHE en poblaciones humanas. La seropositividad contra el VHE ha sido reportada en mujeres menonitas en el estado de Durango, sin embargo otras poblaciones en riesgo como trabajadores de producciones porcinas y pacientes inmunocomprometidos, no han sido estudiadas en el país. VHE no es considerada una enfermedad de reporte obligatorio, por lo tanto el análisis para su diagnóstico usualmente no se realiza y no siempre está disponible en los centros de salud, dificultando la determinación de gravedad de la enfermedad en

el país; en México, el 11.7% de los casos de hepatitis virales no tienen un agente etiológico descrito (Panduro et al. 2011), por lo que es posible que gran parte de las enfermedades hepáticas no diagnosticadas en el país estén relacionadas con infecciones agudas de VHE.

REFERENCIAS

- Adjei, A.A. et al., 2009. Hepatitis E virus infection among pig handlers in Accra, Ghana. *East African Med J*, 86, pp.359-363.
- Alvarado-Esquivel, C., Sanchez-Anguiano, L.F. & Hernandez-Tinoco, J., 2014. Hepatitis E virus exposure in pregnant women in rural Durango, Mexico. *A Hepatol*, 13(5), pp.510-517.
- Alvarado-Esquivel, C., Sanchez-Anguiano, L.F. & Hernandez-Tinoco, J., 2014. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in general population in rural Durango, Mexico. *Hepatitis Monthly*, 14(6).
- Alvarado-Esquivel, C., Sanchez-Anguiano, L.F. & Hernandez-Tinoco, J., 2015. Seroepidemiology of hepatitis e virus infection in mennonites in Mexico. *J Clin Med Res*, 7(2), pp.103-108.
- Arends, J.E. et al., 2014. Hepatitis E: An emerging infection in high income countries. *J Cli Virol*, 59, pp.81-88.
- Baechlein, C. et al., 2010. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet Microbio*, 144(1-2), pp.187-191.
- Balayan, M.S. et al., 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirol*, 20, pp.23-31.
- Banks, M. et al., 2004. Human and Porcine Hepatitis E Virus Strains, United Kingdom. *Emer Infec Dis*, 10, pp.953-955.
- Barnaud, E. et al., 2012. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *A Environ Microbio*, 78, pp.5153-5159.

- Di Bartolo, I. et al., 2011. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbio*, 149(3-4), pp.330-338.
- Bouwknegt, M. et al., 2008. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res*, 39.
- Bouwknegt, M. et al., 2011. Estimation of the Likelihood of Fecal-Oral HEV Transmission Among Pigs. *Risk Anal*, 31, pp.940-950.
- Burans, J.P. et al., 1994. Threat of hepatitis E virus infection in Somalia during Operation Restore Hope. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 18, pp.100-102.
- Cantu-Martinez, M.A. et al., 2013. Molecular detection of hepatitis E virus in pig livers destined for human consumption in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Salud Publica Mex*, 55(2), pp.193-195.
- 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 of Hepatology*, 38(6), pp.827-832.
- Cooper, K. et al., 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 Microbio*, 43(4), pp.1684-1688.
- Cossaboom, C.M. et al., 2012. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J Gen Virol*, 93, pp.1687-1695.
- Cossaboom, C.M. et al., 2011. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *E inf*

- dis*, 17, pp.2047-2049.
- Cowie, B.C. et al., 2005. Hepatitis E infections, Victoria, Australia. *Emerging Inf Dis*, 11, pp.482-484.
- Crossan, C. et al., 2012. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Shellfish, United Kingdom. *Emerging Inf Dis J*, 18(12), p.2085.
- Dalton, H.R. et al., 2007. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hep*, 14, pp.304-309.
- Dalton, H.R., 2014. Hepatitis e: the «new kid on the block» or an old friend? *Transfusion medicine and hemotherapy: officielles Organ der Deutschen Gesellschaft fure*, 41(1), pp.6-9.
- de Deus, N. et al., 2008. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbio*, 132, pp.19-28.
- Emerson, S.U. & Purcell, R.H., 2003. Hepatitis E virus. *Reviews in Medical Virol*, 13, pp.145-154.
- Fogeda, M. et al., 2009. Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J Med Virolo*, 81, pp.1743-1749.
- Goldsmith, R. et al., 1992. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children. *Lancet*, 339, pp.328-331.
- Graff, J. et al., 2005. The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J virolog*, 79, pp.6680-6689.
- Guthmann, J.-P. et al., 2006. A large outbreak of hepatitis E among a displaced

population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42, pp.1685-1691.

Halbur, P.G. et al., 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J clin micro*, 39(3), pp.918-923.

Han, J. et al., 2014. Hepatitis E Virus Infection in Farmed Rabbits and Swine in the Eastern Chinese City Lianyungang : Showing no Potential Interspecies Transmission. *J Med Viro*, 1904(July), pp.1898-1904.

Hsieh, S.Y. et al., 1998. Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J Med Viro*, 55, pp.300-304.

Huang, F.F. et al., 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 Microbio*, 40, pp.1326-1332.

Huang, S. et al., 2010. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS ONE*, 5.

Inoue, J. et al., 2006. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virological Methods*, 137(2), pp.325-333.

Johne, R. et al., 2014. Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. *Infection, genetics and evolution: J of molecular epidemiology and*

evolutionary genetics in infectious diseases, 27C, pp.212-229.

Johne, R. et al., 2010. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany.

Emerging Inf Dis, 16, pp.1452-1455.

Kabrane-Lazizi, Y. et al., 1999. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *The American j tropical medicine and hygiene*, 61, pp.331-335.

Kamar, N. et al., 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *The New England J med*, 358, pp.811-817.

Kapur, N. et al., 2012. Hepatitis e virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J Viral Hep*, 19(6), pp.436-448.

Kasorndorkbua, C. et al., 2003. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *The canadian vet res*, (515), pp.303-306.

Kasorndorkbua, C. et al., 2004. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clinical Microb*, 42(11), pp.5047-5052.

Khuroo, M.S., 1980. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *American J med*, 68, pp.818-824.

Khuroo, M.S. & Kamili, S., 2003. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hep*, 10, pp.61-69.

Koonin, E. V et al., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, pp.8259-

8263.

Kwo, P.Y. et al., 1997. *Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States.*, Mayo Clin Proc 1997 Dec;72(12):1133-6

Lack, J.B., Volk, K. & Van Den Bussche, R.A., 2012. Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerg Infect Diseases*, 18, pp.1268-1273.

Lara, J., Purdy, M. a & Khudyakov, Y.E., 2014. Genetic host specificity of hepatitis E virus. *Infection, genetics and evolution, J of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 24(March), pp.127-139.

Leblanc, D. et al., 2010. Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *Int J Food Microbiol*, 139(3), pp.206-209.

Li, T. et al., 2005. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J virol*, 79(20), pp.12999-3006.

Liu, P. et al., 2014. Management of Hepatitis E Virus (HEV) zoonotic transmission: Protection of rabbits against HEV challenge following immunization with HEV 239 vaccine. *PLoS ONE*, 9.

Mansuy, J.-M. et al., 2011. Hepatitis E Virus Antibodies in Blood Donors, France. *Emerg Infect Dis*, 17, pp.2309-2312.

Mansuy, J.M. et al., 2004. Hepatitis E in the South West of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol*, 74, pp.419-424.

Mansuy, J.M. et al., 2008. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J Med Virol*, 80, pp.289-293.

- Meng, X.J. et al., 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, pp.9860-9865.
- Merino-Ramos, T. et al., 2016. Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Antibodies in Mexican Pigs. *Food Environ Virol*, pp.10-13.
- Mushahwar, I.K., 2008. Hepatitis E virus: Molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol*, 80(4), pp.646-658.
- Nakamura, M. et al., 2006. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepato Res*, 34, pp.137-140.
- Navaneethan, U., Al Mohajer, M. & Shata, M.T., 2008. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver international: official J of the International Association for the Study of the Liver*, 28(9), pp.1190-1199.
- Okamoto, H., 2013. Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol*, 48(2), pp.147-158.
- Panduro, A. et al., 2011. Epidemiología de las hepatitis virales en México. *Salud Publica Mex*, 53(SUPPL. 1).
- Perttila, J., Spuul, P. & Ahola, T., 2013. Early secretory pathway localization and lack of processing for hepatitis E virus replication protein pORF1. *J Gen Virolo*, 94(PART4), pp.807-816.
- Purcell, R.H. & Emerson, S.U., 2008. Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. *J Hep*, 48, pp.494-503.

- Rab, M.A. et al., 1997. Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan: A common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. *American J Tropical Medicine and Hygiene*, 57, pp.151-157.
- Reyes, G.R. et al., 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science (New York, N.Y.)*, 247, pp.1335-1339.
- Rodríguez-Frias, F., Jardi, R. & Buti, M., 2012. [Hepatitis E: molecular virology, epidemiology and pathogenesis]. *Enf infec microbio clínica*, 30(10), pp.624-634.
- Rutjes, S.A. et al., 2014. Seroprevalence of hepatitis E virus in pigs from different farming systems in The Netherlands. *J food protect*, 77, pp.640-642.
- Salines, M. et al., 2015. Hepatitis E virus chronic infection of swine co-infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet res*, 46, p.55.
- Schlauder, G.G. & Mushahwar, I.K., 2001. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J med virolo*, 65, pp.282-292.
- Sehgal, D. et al., 2006. Expression and processing of the Hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein. *Virolog J*, 3, p.38.
- Shrestha, M.P. et al., 2007. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*, 356, pp.895-903.
- Shrestha, S.M., 2006. Hepatitis E in Nepal. *Kathmandu University Medical J*, 4, pp.530-544.

- Takahashi, K. et al., 2004. Estimation of the mutation rate of hepatitis E virus based on a set of closely related 7.5-year-apart isolates from Sapporo, Japan. *Hepat res*, 29(4), pp.212-215.
- Tamura, A. et al., 2007. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepat res*, 37, pp.113-120.
- Tei, S. et al., 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 362, pp.371-373.
- Teshale, E.H. et al., 2010. Hepatitis E epidemic, Uganda. *Emer Inf Dis*, 16, pp.126-129.
- Tsega, E. et al., 1991. Outbreak of acute hepatitis E virus infection among military personnel in northern Ethiopia. *J Med Virol*, 34, pp.232-236.
- Varma, S.P.K. et al., 2011. Hepatitis E virus replication involves alternating negative- and positive-sense RNA synthesis. *J Gen Virol*, 92(3), pp.572-581.
- Vasickova, P. et al., 2007. Hepatitis E virus : a review. *Veterinarni Medicina*, 52(9), pp.365-384.
- Vasickova, P. et al., 2007. Hepatitis E virus: A review. *Veterinarni Medicina*, 52(9), pp.365-384.
- Velázquez, O. et al., 1990. Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA*, 263, pp.3281-3285.
- WALACHOWSKI, S. et al., 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 Infec*, 142(09),

pp.1934-1944.

Wang, Y. et al., 2000. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *J gen virol* 81, pp.1675-1686.

Wang, Y.C. et al., 2002. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol*, 67, pp.516-521.

WHO, 2015. World Health Organization Hepatitis E Fact sheet N°280. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>.

Woo, P.C.Y. et al., 2014. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Eme Inf Dis*, 20, pp.1044-1048.

World Health Organization. Dept. of Immunization, V. and B.-S. more at: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/70180#sthash.B.dpu.>, 2010. The Global Prevalence of Hepatitis E Virus Infection and Susceptibility: A Systematic Review. , (WHO/IVB/10.01), p.428.

Xiao, P. et al., 2012a. Prevalence of hepatitis E virus in swine fed on kitchen residue. *PLoS ONE*, 7.

Xiao, P. et al., 2012b. Prevalence of hepatitis e virus in swine fed on kitchen residue. *PloS one*, 7(3), p.e33480.

Xing, L. et al., 1999. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virolog*, 265, pp.35-45.

Yang, Y. et al., 2015. Fatal disease associated with Swine Hepatitis E virus and

Porcine circovirus 2 co-infection in four weaned pigs in China. *BMC vet res*, 11(1), p.77.

Yazaki, Y. et al., 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 of Gen Virol*, 84, pp.2351-2357.

Yoo, D. et al., 2001. Prevalence of Hepatitis E Virus Antibodies in Canadian Swine Herds and Identification of a Novel Variant of Swine Hepatitis E Virus. *Clin diag lab immun*, 8, pp.1213-1219.

Zhang, M., Purcell, R.H. & Emerson, S.U., 2001. Identification of the 5' terminal sequence of the SAR-55 and MEX-14 strains of hepatitis E virus and confirmation that the genome is capped. *J Med Virol*, 65, pp.293-295.

Zhang, W. et al., 2008. Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoonoses and Public Health*, 55, pp.291-298.

Zheng, Z.-Z. et al., 2010. Role of heat-shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking. *The J gen virol*, 91, pp.1728-1736.

Zhu, F.-C. et al., 2010. *Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial.*, *The Lancet* 376.9744 (2010): 895-902.

Zhuang, H. et al., 1991. Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroent Jap*, 26 Suppl 3, pp.135-138.