



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

**DETECCIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL VIRUS DE**  
**HEPATITIS E EN CERDOS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**M. en C. ALICIA SOTOMAYOR GONZÁLEZ**

**TUTORA PRINCIPAL:**

**DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**DRA. BLANCA ITZEL TABOADA RAMÍREZ**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO.**

**FEBRERO, 2019.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, Aurora y Fernando, los mejores padres que podría desear. Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido llegar a ser la persona que soy, pero más que nada, por su amor incondicional; los amo.

A mi hermano Fernando y mi cuñada Alejandra, por los ejemplos de amor y perseverancia que me han demostrado siempre, por las risas y los mejores momentos durante estos años.

A mi tía Paty, por siempre estar presente y por toda la ayuda que siempre está dispuesta a dar. A mi tía Licha (Q.E.P.D.) por ser el ejemplo de profesionista y madre, que ambos trabajos pueden ir de la mano, y a mi tío Augusto, por su optimismo y por impulsarme a seguir en investigación y en esta casa de estudios; sin ustedes la decisión de hacer un doctorado habría sido diferente.

A mi abuela, por toda su fuerza y su amor. A mi tío Rico, mi tía Lourdes, mis primos: Cesar, Delice, Anna Ximena, Frutos, Ana Sol, Alex, Dani, Rodrigo, Paola y Ricky por su calidez, y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis (incluyendo a Perdi y Rocky).

A mis amigos. Por apoyarnos mutuamente en nuestra formación profesional y personal y por muchos años más de amistad: Lurdes, Alexa, Mau, Tere, Diana, Eri, José, Ari, Julia, Oliver, Karla, Gaby, Laurita, Moni, Pablo y Jovani (Q.E.P.D.).

A mis maestros: Dra. Rosa Elena Sarmiento por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis; a la Dra. María Elena Trujillo por su apoyo durante los pasados 10 años, ha ido un placer ser su alumna; a la Dra. Blanca Taboada por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional. He disfrutado enormemente aprender de ustedes, son grandes ejemplos de mujeres extraordinarias.

A Héctor, por ser tú. Por tu apoyo incondicional estas últimas semanas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Proyecto CONACYT CB-221186 con el título “Diseño, implementación y optimización de una plataforma para la detección y caracterización molecular del genoma completo del virus de hepatitis E (VHE)”, por el financiamiento otorgado.

Al proyecto de becas CONACYT, por su compromiso y el apoyo brindado para realizar los estudios de posgrado.

A mi tutora principal, la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por introducirme al mundo de la virología y compartir conmigo su amor y curiosidad por los virus.

A mi comité tutor, la Dra. María Elena Trujillo Ortega por el apoyo incondicional durante la realización del proyecto y las batallas peleadas en defensa de éste y la Dra. Blanca Taboada por esa entrevista hace tres años en la que acepto enseñarme todo lo que ahora sé de bioinformática sin conocerme.

A los miembros del jurado. Al Dr. Carlos Arias Ortiz, por permitirme el honor de formar parte de su laboratorio, por todos sus consejos y por abrirme las puertas a una nueva vida, al Dr. Hugo Ramírez Álvarez por su paciencia y sus aportaciones que enriquecieron enormemente el presente trabajo, y al Dr. Luis Padilla Noriega por su apoyo y comprensión para concluir este ciclo.

A la Red Mexicana de Virología, por el apoyo para la asistencia a congresos y estancias, específicamente a la Dra. Susana López Charretón y el Dr. Ramón González García Conde.

A todos los integrantes del laboratorio de Virología de la FMVZ, específicamente a Don Mario, Armando, Jorge y Gerardo que fueron partícipes de este proceso.

Al programa de posgrado por el apoyo otorgado para estancia en el extranjero.

Al CEIEPP, UNAM por el apoyo proporcionado para la toma de muestras.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) y a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa durante todos estos años.

## **CONTENIDO**

DEDICATORIAS	1
AGRADECIMIENTOS	2
CONTENIDO	3
LISTA DE CUADROS	7
LISTA DE FIGURAS	9
PRÓLOGO	12
1. CAPÍTULO 1	14
1.1 RESUMEN	14
1.1.1 RESUMEN	14
1.1.2 ABSTRACT	15
1.2 INTRODUCCIÓN	16
1.2.1 ANTECEDENTES	17
1.2.2 ETIOLOGÍA	19
1.2.3 DISTRIBUCIÓN	27
1.2.4 TRANSMISIÓN	33
1.2.5 PATOGENIA	36
1.2.6 SIGNOS CLÍNICOS	40
1.2.7 DIAGNÓSTICO	43
1.2.8 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO	46
1.3 JUSTIFICACIÓN	49
1.4 HIPÓTESIS	49

1.5 OBJETIVOS	49
1.5.1 GENERAL	49
1.5.2 PARTICULARES	49
1.6 MATERIAL Y MÉTODOS	50
1.6.1 MUESTREO	50
1.6.2 ESTANDARIZACIÓN DE PCR	53
1.6.3 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	58
1.6.4 SECUENCIACIÓN MASIVA	58
1.6.5 ANÁLISIS DE CÁPSIDE	60
1.6.6 ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN	60
1.7 RESULTADOS	61
1.7.1 ESTANDARIZACIÓN DE PCR	61
1.7.2 PCR	62
1.7.3 SECUENCIACIÓN MASIVA	66
1.7.4 ANÁLISIS DE LA CÁPSIDE	74
1.7.5 ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN	76
1.8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	77
1.9 ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS	82
1.10 REFERENCIAS	83
2 CAPÍTULO 2	96
2.1 INTRODUCCIÓN	96
2.2 MATERIAL Y MÉTODOS	98

2.2.1 MUESTRAS DE PACIENTES	98
2.2.2 EXTRACCIÓN DE RNA DE VHE DEL SUERO DE LOS PACIENTES	98
2.2.3 PCR SEMI-ANIDADA PARA LA AMPLIFICACIÓN VHE ORF2	99
2.2.4 SECUENCIA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO	99
2.3 RESULTADOS	100
2.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	102
2.5 REFERENCIAS	104
3 CAPÍTULO 3	109
3.1 INTRODUCCIÓN	109
3.2 MATERIAL Y MÉTODOS	111
3.2.1 MUESTREO	111
3.2.2 ENCUESTA	115
3.2.3 ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)	115
3.2.4 ANÁLISIS MOLECULAR	116
3.2.5 EXTRACCIÓN	116
3.2.6 TRANSCRIPTASA REVERSA (RT)	116
3.2.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	117
3.2.8 ELECTROFORESIS	117
3.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	117
3.3 RESULTADOS	117
3.3.1 ELISA	117
3.3.2 RT-PCR	118

3.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	118
3.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	119
3.5 REFERENCIAS	122
4 CAPÍTULO 4	128
4.1 INTRODUCCIÓN	128
4.2 MATERIAL Y MÉTODOS	131
4.2.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	131
4.3 RESULTADOS	132
4.3.1 CIRCOVIRUS PORCINO	133
4.3.2 ASTROVIRUS PORCINO	134
4.3.3 PASIVIRUS	136
4.4 DISCUSIÓN	138
4.5 REFERENCIAS	142
5 ANEXOS	146
5.1 ANEXO 1	146

## **LISTA DE CUADROS**

### **CAPÍTULO 1**

Cuadro 1. Muestras obtenidas en rastro hasta diciembre del 2015.

Cuadro 2. Muestras obtenidas de cerdos de granja.

Cuadro 3. Técnicas de extracción utilizadas en diversos estudios a partir de distintos tipos de muestras.

Cuadro 4. Resultados de PCR de las muestras procesadas de hígado, bilis y heces de cerdo para la detección del virus de hepatitis E (VHE).

Cuadro 5. Análisis del número de “reads” recibidos y “reads” útiles tras filtración de mala calidad.

Cuadro 6. Identidad de nucleótidos y aminoácidos (%) del aislamiento de VHE porcino MXCDg3\_B1c|\_2016 con secuencias completas del genoma de diversos genotipos recuperados de GenBank con más del 75% de homología.

Cuadro 7. Sustituciones de aminoácidos identificadas en MXCDg3\_B1c|\_2016 y MXCDg3\_C3Acons|\_2016 en comparación con otros aislados de genotipo 3 disponibles. Los colores indican el tipo de mutación entre las secuencias encontradas en este estudio (MXCDg3\_B1c|\_2016/MXCDg3\_C3Acons|\_2016) y la secuencia cristalizada informada 3HAG: cian para aminoácidos de la misma propiedad, verde para aminoácidos de propiedades diferentes y rojo para aminoácidos distintos.

### **CAPÍTULO 3**

Cuadro 1. Muestras de suero de médicos veterinarios y otras personas relacionadas al trabajo con cerdos para el diagnóstico del virus de hepatitis E (VHE) obtenidas por dos años consecutivos (2016-2017) en el congreso nacional de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos.

Cuadro 2. Resultados positivos de la prueba de ELISA para detección de anticuerpos anti-VHE en los sueros de los médicos veterinarios y voluntarios.

#### CAPÍTULO 4

Cuadro 1. Secuencias virales encontradas en el análisis de secuenciación masiva de las muestras de bilis, hígado y heces de cerdos.

Cuadro 2. Porcentaje de similitud de nucleótidos de las secuencias consenso de circovirus, astrovirus y pasivirus obtenidas en este estudio. Solamente se reportan las cinco secuencias más similares para cada uno de los virus.

## **LISTA DE FIGURAS**

### CAPÍTULO 1

Figura 1. Árbol filogenético de secuencias completas del virus de Hepatitis E que esquematiza la actual clasificación de la familia Hepeviridae (Kamar et al., 2014).

Figura 2. Esquematación del genoma del virus de hepatitis E (VHE) (Ahmad et al., 2011, Chandra et al., 2008).

Figura 3. Estructura cristalina del VHE. Los dominios S, M y P de la proteína de la cápside se indican con rosa, verde y azul, respectivamente. El virus se compone de sesenta subunidades de la cápside que forman ejes icosaédricos de -2, -3 y -5 formando una simetría  $T = 1$  (Yamashita et al., 2009).

Figura 4. Distribución geográfica de los diferentes genotipos del virus de hepatitis E (Perez-Gracia et al., 2015).

Figura 5. Áreas endémicas a HEV y seroprevalencia global. Los países en gris oscuro son los reportados como hiperendémicos, mientras los países en gris claro son considerados de baja endemicidad (Chandra et al., 2008).

Figura 6. Distribución del virus de hepatitis E (VHE) en cerdos y otros reservorios a nivel mundial (Sridhar et al., 2015).

Figura 7. Prevalencia o porcentaje de muestras positivas reportadas en México (Cantu-Martinez et al., 2013, Medrano et al., 2012, Alvarado-Esquivel et al., 2015, Alvarado-Esquivel et al., 2014b, Cooper et al., 2005, Redlinger et al., 1998).

Figura 8. Replicación propuesta del virus de hepatitis E (VHE).

Figura 9. Gel de agarosa mostrando el producto de amplificación por RT-PCR del control positivo separado por electroforesis. Flecha que muestra una banda del tamaño esperado de 212 pb.

Figura 10. Gel de agarosa con las muestras del POOL1 de bilis proveniente del rastro municipal Cardel, Veracruz. Carril superior izquierdo con una muestra positiva

al virus de hepatitis E (VHE). Primera ronda de RT-PCR anidado; la muestra B6 presenta un amplicon positivo. Carril inferior, segunda ronda de PCR con el amplicón de la muestra B6 del tamaño esperado (212 pb).

Figura 11. Árbol filogenético basado en secuencias de la cápside (ORF2) del virus de hepatitis E.

Figura 12. Clasificación de los “reads” obtenidos para las 5 muestras de cerdo (B1, C3A, H2, H3 y C5A) de acuerdo a la calidad y distribución en Mala calidad, Desconocidos, Virales y No virales.

Figura 13. Árbol filogenético de secuencias completas y parciales (ORF2) del virus de hepatitis E.

Figura 14. Representación esquemática de la secuencia genómica del virus de Hepatitis E, cepa MXCDg3\_B1c|2016.

Figura 15. Árboles filogenéticos a nivel de amino-ácidos de los tres marcos de lectura abiertos el virus de Hepatitis E. La secuencia encontrada en este estudio está indicada con color rojo.

Figura 16. Representación gráfica de la secuencia completa MXCDg3\_B1c | \_2016 y análisis de cápside.

## CAPÍTULO 2

Figura 1. Árbol filogenético de secuencias de referencia del virus de Hepatitis E (VHE), incluyendo dos muestras provenientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Las secuencias obtenidas en este estudio están indicadas por un diamante negro. La inferencia evolutiva se realizó con el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo de Tamura-Nei con una distribución gamma discreta y valores permisibles para regiones invariables. Con un bootstrap de 1000.

### CAPÍTULO 3

Figura 1. Gráfica de los individuos seropositivos al virus de hepatitis E (VHE) por rango de edad.

### CAPÍTULO 4

Figura 1. Figura 1. Árbol filogenético construido con secuencias derivadas de genomas completos de circovirus, incluyendo la secuencia parcial de 531 bases encontrada en este estudio (identificada en negritas).

Figura 2. Figura 2. Árbol filogenético de secuencias de genoma completo de astrovirus porcino que incluye 65 secuencias reportadas en cerdos y otras especies alrededor del mundo al 2018 y la secuencia de 6,641 bases (99% del genoma) encontrada en el presente estudio (identificada en negritas).

Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias de genoma completo reportadas de pasivirus. Se incluyeron 10 secuencias para el análisis; incluyendo la secuencia parcial de 1,174 bases encontrada en este estudio (identificada en negritas), y una secuencia de Potamipivirus como “outgroup”.

## **PRÓLOGO**

Este estudio forma parte del Proyecto CONACYT: CB-221186 con el título: Diseño, implementación y optimización de una plataforma para la detección y caracterización molecular del genoma completo del virus de hepatitis E (VHE).

Anterior al presente trabajo se realizó una determinación de prevalencia por parte de una alumna de Maestría en Ciencias, con lo cual se publicó el artículo científico: García-Hernández, M. E., Cruz-Rivera, M., Sánchez-Betancourt, J. I., Rico-Chávez, O., Vergara-Castañeda, A., Trujillo, M. E., & Sarmiento-Silva, R. E. (2017). Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC veterinary research*, 13(1), 289. En el cual se exponen los resultados encontrados sobre la presencia de anticuerpos anti-hepatitis E en cerdos de distintas regiones de México.

De esta manera este trabajo continúa con los objetivos del proyecto principal al estandarizar técnicas moleculares para el diagnóstico del virus y determinar los genotipos de VHE que circulan en poblaciones porcinas en México.

Esta tesis está organizada en cuatro capítulos de investigación principales que comprenden cuatro manuscritos. Fui el autor principal de todos los manuscritos y el trabajo del laboratorio. El primer capítulo describe el tema central del proyecto con la estandarización de la plataforma de diagnóstico por medio de PCR para la identificación del virus de Hepatitis E a partir de diferentes tejidos o muestras de cerdos y la obtención del genoma completo de la cepa viral obtenida. Este capítulo es el más extenso e incluye la revisión bibliográfica que compete a los 4 capítulos, así como la hipótesis y objetivos fundamentales del proyecto. Los posteriores capítulos están escritos a manera de artículo para hacer más breve y práctica su lectura, con una breve introducción enfocada al tema en particular tratado y con su respectivo procedimiento, resultados, discusión y conclusiones. El capítulo 2 describe la obtención de secuencias del VHE a partir de muestras de humanos que se obtuvieron gracias a la colaboración con el Dr. Francisco Arenas Huertero,

Director de Patología Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez; los resultados serán publicados como parte de un artículo de investigación que incluye datos clínicos, serológicos y moleculares sobre la detección del genotipo 3 del VHE en pacientes pediátricos del hospital, siendo el primer reporte en humanos de éste genotipo zoonótico en México. El tercer capítulo describe un estudio epidemiológico realizado a médicos veterinarios que reportan contacto con cerdos, evaluando posibles factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos detectados por medio de pruebas serológicas. Finalmente, en el capítulo 4 investigamos la diversidad viral encontrada en las muestras de cerdos analizadas por medio de secuenciación masiva. Aunado al hallazgo de VHE, en algunas muestras fue posible recuperar fragmentos de genomas virales de otros virus de interés para la porcicultura y que consideramos notable reportar. Estos 2 análisis se publicarán de manera pertinente en revistas adecuadas a cada tema.

La publicación del artículo que comprende el trabajo principal de este estudio se realizó en la revista "Viruses" en el año 2018 y se encuentra anexado al final de este documento. El artículo es "Open Access" y su referencia es la siguiente: Alicia Sotomayor-González, María E. Trujillo-Ortega, Blanca I. Taboada-Ramírez, Carlos Sandoval-Jaime, and Rosa E. Sarmiento-Silva. Phylogenetic Analysis and Characterization of the Complete Hepatitis E Virus Genome (Zoonotic Genotype 3) in Swine Samples from Mexico. *Viruses*. 2018 Aug; 10(8): 391. PMID: PMC6115897. doi: 10.3390/v10080391.

## **1. CAPÍTULO 1.**

### **DETECCIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL VIRUS DE HEPATITIS E EN CERDOS**

#### **1.1 RESUMEN**

##### **1.1.1 RESUMEN**

El virus de la hepatitis E (VHE) es un problema de salud emergente con 20 millones de infecciones cada año. El VHE se clasifica en el género *Orthohepevirus*, con cuatro especies que afectan a diferentes huéspedes (A-D). En México, la especie A, genotipo 2 se ha reportado exclusivamente en humanos y el genotipo 3 en cerdos. El VHE es la causa de zoonosis emergentes que se transmiten principalmente por agua y alimentos, y se considera al cerdo como el principal reservorio. Estudios indican que en el 12% de las hepatitis virales en humanos no se identifica al agente etiológico. Investigar al VHE es necesario para determinar los genotipos y subgenotipos presentes, y así, comprender las características y dinámica de infección en granjas porcinas con el fin de implementar programas de vigilancia y evaluar los riesgos de salud pública. En este estudio, se utilizó secuenciación de nueva generación para obtener un genoma completo del VHE. Se tomaron muestras de hígado, heces y bilis en rastro y en granja. Se utilizó RT-PCR para determinar las muestras positivas y se realizó la secuenciación tipo Sanger para confirmar la presencia del genoma viral. De 185 muestras de rastro, solo 1 bilis fue positiva (B1) (0.54%). De 21 “pools” de muestras de animales de granja, 14 fueron positivos (66.66%) pertenecientes a todas las etapas de producción. El genoma del VHE, cepa MXCDg3\_B1c|\_2016, se obtuvo de la bilis de un cerdo en etapa de engorda. Se obtuvieron dos secuencias parciales más MXCDg3\_H2cons|\_2016 (1473 nt) y MXCDg3\_C3Acons|\_2016 (4777 nt). El análisis de las secuencias mostró relación con el genotipo 3 subgenotipo a, reportado en casos de hepatitis aguda en humanos en los EE. UU., Colombia, China y Japón. Se necesitan más estudios para determinar si podría ser la cepa más frecuente en América.

Palabras clave: virus, hepatitis, zoonosis, cerdos, bilis, hepatitis E.

### **1.1.2 ABSTRACT**

Hepatitis E (HEV) is an emerging health problem with 20 million infections each year. The HEV is classified in the genus Orthohepevirus, with four species that affect different hosts (A-D). In Mexico, species A, genotype 2 has been reported exclusively in humans and genotype 3 in pigs. HEV is the cause of emerging zoonoses that are transmitted mainly by water and food, and swine are considered the main reservoir. Studies indicate that in 12% of viral hepatitis in humans the etiological agent is not identified, but there are no publicly available diagnostic tests for the detection of HEV. Investigating the HEV it is necessary to determine the genotypes and subgenotypes present to understand the characteristics and dynamics of the infection in pig farms in order to implement surveillance programs and evaluate public health risks. In this study, NGS was used to obtain a complete HEV genome. Samples of liver, feces and bile were taken on slaughterhouses and farm. RT-PCR was used to determine the positive samples and Sanger sequencing was performed to confirm the presence of the virus. From 185 slaughterhouse samples, only 1 bile was positive (B1) (0.54%). Of 21 pools of farm animal samples, 14 were positive (66.66%) belonging to all stages of production. The VHE genome, strain MXCDg3\_B1c|\_2016, the title of a pig was obtained in the fattening stage. Two more partial sequences were obtained MXCDg3\_H2cons|\_2016 (1473 nt) and MXCDg3\_C3Acons|\_2016 (4777 nt). The analysis of the sequences shows its relation with the genotype 3 subgenotype a, report of cases of acute hepatitis in humans in the USA, Colombia, China and Japan. More studies are needed to determine if it could be the most frequent strain in America.

Key words: virus, hepatitis, zoonoses, swine, bile, hepatitis E.

## 1.2 INTRODUCCIÓN

Las hepatitis virales son una de las causas principales de daño hepático en personas alrededor del mundo incluyendo a México. Éstas pueden ser causadas por seis virus que afectan a los humanos y que no se encuentran relacionados taxonómicamente, los cuales incluyen a: virus de hepatitis A (VHA), virus de hepatitis B (VHB), virus de hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D (VHD), virus de hepatitis E (VHE), virus de hepatitis F (VHF) y virus de hepatitis G (VHG). Estos virus solo se encuentran agrupados debido a la enfermedad que ocasionan, que clínicamente se describe como inflamación del hígado. Sin embargo, difieren significativamente entre sí en su organización genómica, la familia viral a la que pertenecen, las tasas de mortalidad que ocasionan, la capacidad para causar enfermedad aguda y crónica, y la severidad (Mushahwar, 2008, Salehi et al., 2014, Klevens et al., 2014).

Específicamente, la hepatitis E es un problema de salud emergente en los países tropicales y subtropicales donde causa epidemias, así como en países industrializados donde causa casos esporádicos (Bouquet et al., 2012, Behrendt et al., 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta en su portal de internet que cada año se estiman 20 millones de infecciones por hepatitis E, de las cuales 3 millones tienen una presentación aguda y ocasiona 56 600 muertes. De manera particular y a modo de ejemplo, en el año 2012, Rein y colaboradores realizaron un estudio epidemiológico de casos de hepatitis E en 9 regiones de África y Asia; cubriendo el 71 % de la población a nivel mundial y estimaron 20.1 millones de personas infectadas, de las cuales 3.4 millones tienen una presentación sintomática, ocasionando 70 000 muertes y 3 000 nacidos muertos (Rein et al., 2012). A diferencia del VHA, la infección con el VHE alcanza una tasa de mortalidad mayor que va del 1% al 4% (VHA ocasiona una tasa de mortalidad del 0.1% al 2%) (Pavio et al., 2010a).

La mayor peculiaridad del VHE, a comparación de las otras hepatitis virales, radica en ser la única que presenta huéspedes de diferentes especies, volviéndose una enfermedad de carácter zoonótico (Pavio et al., 2010a, Park et al., 2016).

### **1.2.1 Antecedentes**

Las hepatitis virales fueron identificadas desde mediados del siglo IIX con brotes de enfermedad hepática aguda durante guerras y desastres naturales. A mediados del siglo XX se hablaba de dos tipos de hepatitis aguda: la hepatitis infecciosa (adquirida por transmisión entérica) y la hepatitis sérica (transmitida por rutas parenterales). En 1970 estos agentes fueron denominados hepatitis A y hepatitis B respectivamente. Posteriormente, con el desarrollo de pruebas serológicas para su diagnóstico, los médicos se percataron de la presencia de otro agente que ocasionaba casos clínicos de hepatitis aguda que no era ninguno de los mencionados (Aggarwal, 2013).

El VHE obtuvo atención por primera vez como un agente infeccioso, en un brote de hepatitis aguda en el valle de Cachemira, India en 1978 (Rein et al., 2012). El brote comenzó como una epidemia con 275 casos de hepatitis icterica que ocasiono 10 muertes. La enfermedad tenía características clínicas y epidemiológicas únicas: transmisión por agua, no se produjeron casos clínicos secundarios de hepatitis, afección a adultos jóvenes (entre 11 y 40 años), aumento de la incidencia y gravedad de la enfermedad en mujeres embarazadas y que todos los pacientes que sobrevivieron tuvieron enfermedad autolimitada (Aggarwal, 2013).

Hasta 1980 solamente se conocía al VHA como el único tipo de hepatitis que tenía como vía de transmisión principal el agua contaminada. Estudios serológicos realizados a pacientes de este brote, así como, un estudio retrospectivo realizado a sueros obtenidos durante tres brotes anteriores en la India demostró una baja presencia de anticuerpos contra el VHA y VHB. Estos resultados llevaron a la confirmación de un nuevo tipo de hepatitis entérica NO-A y NO-B (ET-NANB, por

sus siglas en inglés, “enterically transmitted non-A, non-B”) que se transmitía por el agua. En los siguientes años, reportes de esta enfermedad aumentaron en países como Nepal, África y México (Aggarwal, 2013).

El virus de la hepatitis E fue aislado por primera vez de las heces de reclutas militares soviéticos en Afganistán en 1983 cuando el virólogo Mikhail Balayan, experimentalmente ingirió una suspensión fecal del conjunto de muestras de varios pacientes y recogió sus heces durante el período de incubación, por medio de inmuno-electromicroscopía (IEM) demostró la presencia del virus en sus heces y posteriormente logró replicar la enfermedad con éxito en simios (*Macaca fascicularis*) (Rein et al., 2012).

Finalmente, en el año de 1990 Reyes y colaboradores (año) clonaron y lograron secuenciar con éxito el virus a partir de una muestra de bilis obtenida después de varios pases en simios (*Macaca fascicularis*). Los investigadores descubrieron un virus de una sola cadena con un genoma de ARN de sentido positivo de aproximadamente 7.5 kb y lo nombraron “virus de hepatitis E” (HEV, por sus siglas en inglés, hepatitis E virus) (Reyes et al., 1990). Un año después el mismo grupo de investigación describió la organización genómica del virus: el extremo 5' codifica para las proteínas no estructurales y el extremo 3' codifica para las proteínas estructurales. Así mismo, establecen que la expresión del virus implica el uso de tres marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés, Open Reading Frames) (Tam et al., 1991).

En estos primeros estudios, el nuevo virus descubierto se clasificó en la familia *Caliciviridae* debido a la semejanza física y molecular con este grupo. Sin embargo, análisis posteriores revelaron que el VHE estaba más relacionado genéticamente con el virus de la rubéola, aunque no fueran similares estructuralmente. Actualmente el VHE se clasifica en el género *Orthohepevirus*, ya que se le concedió su propio género y familia llamada *Hepeviridae* (Purcell and Emerson, 2008, Tam et al., 1991).

En México, los primeros brotes de hepatitis aguda se produjeron a finales de 1986 en el Estado de Morelos. El primer brote comenzó en la localidad de Huitzililla localizada en el Municipio de Ayala al centro del Estado. El primer caso se reportó en junio de ese año y se describieron 94 pacientes con casos ictericos, de los cuales dos mujeres no embarazadas murieron. Las tasas de ataque fueron mayores para las personas mayores de 15 años (10%) que para las personas más jóvenes y los factores de riesgo que se identificaron asociaron la enfermedad con el agua. El segundo brote comenzó en agosto de 1986 en la localidad de Telixtac en el municipio de Axochiapan, al sureste del Estado de Morelos, colindando con el Estado de Puebla. El brote comenzó con la aparición de 129 casos, de los cuales solo una mujer falleció y una mujer embarazada tuvo un parto prematuro en el cual él bebe murió a los tres meses de causas desconocidas. Los hallazgos epidemiológicos reportados fueron similares a los de Huitzililla, sin ser tan clara como factor de riesgo la presencia de agua contaminada (Velazquez et al., 1990, Control, 1987, Aggarwal, 2013).

Durante estos brotes, los signos clínicos que se observaron fueron ictericia, malestar general, anorexia, dolor abdominal, artralgia y fiebre. De los 62 pacientes estudiados en Huitzililla y 53 pacientes estudiados en Telixtac sólo dos de este último sitio resultaron serológicamente positivos a la infección reciente por hepatitis A o B. Por otra parte, dos de las ocho muestras de heces de Huitzililla y una de las ocho muestras de heces de Telixtac fueron positivas por IEM para partículas virales de 32 a 34 nm similares a las observadas en los casos de hepatitis ET-NANB reportados en Asia. Éste fue el primer reporte de un caso de hepatitis ET-NANB en América (Velazquez et al., 1990, Control, 1987, Aggarwal, 2013).

### **1.2.2 Etiología**

El virus de hepatitis E pertenece a la familia *Hepeviridae*, género *Orthohepevirus*, especie A. Esta familia contiene dos géneros: *Pischihepevirus*, el cual afecta

solamente a peces y *Orthohepevirus*, que tiene un amplio rango de huéspedes entre ellos el humano (Prpic et al., 2015, Okamoto, 2013, ICTV, Perez-Gracia et al., 2015).

El género *Orthohepevirus* se compone por cuatro especies distintas, las cuales difieren marcadamente en su distribución, presentación clínica y la especificidad de especie. El virus que afecta a aves se llama orthohepevirus B y presenta aproximadamente 50% de identidad de su secuencia de nucleótidos con los virus de mamífero y ocasiona el síndrome de hepatitis-esplenomegalia. Las secuencias que fueron obtenidas a partir de roedores, topos, musarañas y carnívoros se clasificaron como especie orthohepevirus C. Una secuencia obtenida de un murciélago forma la especie orthohepevirus D. Finalmente la especie con mayor rango de hospederos es la orthohepevirus A, la cual incluye 7 genotipos reportados que infectan a los humanos (1, 2, 3, 4 y 7), cerdos (3 y 4), conejos (3), jabalís (3, 4, 5 y 6), mangostas (3), ciervos (3), yaks (4) y camellos (7) (Smith et al., 2016b, Ahmad et al., 2011, Perez-Gracia et al., 2015, Park et al., 2015). La profundización en el estudio de la enfermedad ha permitido encontrar a los diferentes reservorios asociados y ha contribuido a comprender que los VHE tienen varios reservorios animales con compleja ecología y diversidad genética (Sridhar et al., 2015). La actual clasificación es la más reciente (2016, figura 1), anteriormente solo se conocían cinco genotipos, siendo el 5 el orthohepevirus B de aves y los genotipos 1-4 serían relativamente equivalentes a la actual clasificación de orthohepevirus A. Debido a esto, en algunas de las secciones la información disponible aún se describe utilizando la clasificación anterior de cuatro genotipos que afectan humanos (1-4), y así se hará mención de ellos. Los virus reportados en truchas, aves, murciélagos y pequeños carnívoros y roedores no se han asociado a casos en humanos por lo cual no se hará mención de ellos en el presente trabajo.

Los cuatro genotipos más estudiados (1-4) se han dividido en diferentes subgenotipos basados en análisis filogenéticos. El genotipo 1 se ha dividido en cinco subtipos, el genotipo 2 en dos subtipos, el genotipo 3 es el más diverso y se ha

dividido en 10 subtipos y el genotipo 4 se ha dividido en siete subtipos (figura 1) (Perez-Gracia et al., 2015).

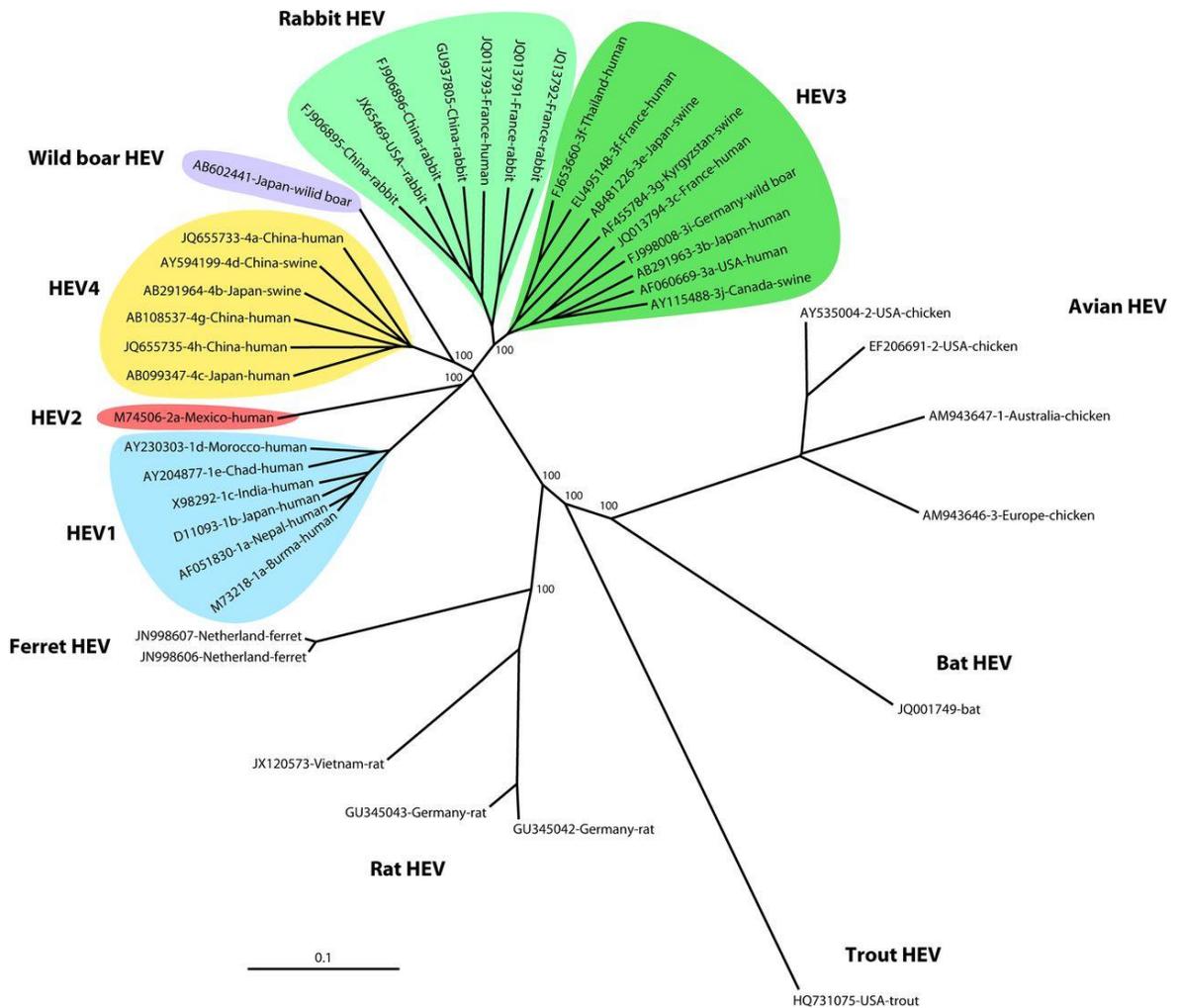


Figura 1. Árbol filogenético construido con secuencias completas del virus de hepatitis E que esquematiza la actual clasificación de la familia *Hepeviridae* (Kamar et al., 2014). Se puede observar la separación de los grupos para los Orthohepevirus B (Avian HEV), Orthohepevirus C (Rat HEV and Ferret HEV), Orthohepevirus D (Bat HEV) y Orthohepevirus A (HEV1, HEV2, HEV4, HEV3, Wild boar HEV, Rabbit HEV).

Es relevante mencionar que a pesar de la variabilidad entre ellos, todos los genotipos comparten al menos un epítipo, y serológicamente pertenecen a un solo

serotipo (Organization, 2010, Kuniholm et al., 2015). Las regiones genómicas que se han utilizado para identificar a los distintos genotipos incluyen una secuencia de 301 nucleótidos (nt) en el extremo 5' de la región ORF2 y una secuencia de 306 nt en el extremo 3' del ORF1, dentro de la región de la polimerasa (Ahmad et al., 2011). La división en siete genotipos y los criterios que se utilizaron para su clasificación se basan en distancias de aminoácidos encontrados en ORF1 y ORF2, sin tomar en cuenta las regiones hipervariables de aminoácidos del ORF1 que se encuentran en las posiciones 706-778 y 928-929 (Smith et al., 2016b).

El VHE es un virus pequeño de aproximadamente 27-34 nm de diámetro, con simetría icosaédrica, con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 7.2 kb de longitud y sin envoltura, aunque recientemente se ha reportado la presencia de un virus envuelto durante la fase de viremia. El genoma viral contiene regiones cortas no codificantes de 27 a 35 nt en el extremo 5' y de 65 a 75 nt en la región 3' terminando con una cola de poli A de tamaño variable; y contiene tres marcos de lectura abiertos discontinuos y parcialmente superpuestos (ORF 1-3) (figura 2)(Knipe et al., 2007, Yamashita et al., 2009, Organization, 2010, Behrendt et al., 2014, Anang et al., 2016).

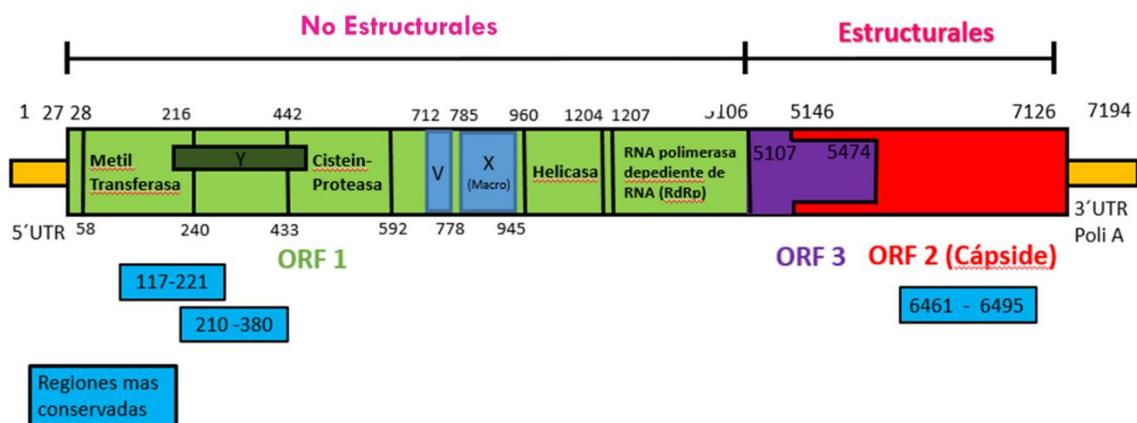


Figura 2. Esquematización del genoma del virus de hepatitis E (Ahmad et al., 2011, Chandra et al., 2008).

El ORF1 es el marco de lectura abierto más grande, codifica para las proteínas no estructurales esenciales para la replicación viral que se consideran dominios conservados y consisten principalmente en una metiltransferasa, una proteasa, un macrodominio, una helicasa y una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). También codifica para los dominios X, Y, V y 7DUF3729 de funciones desconocidas. La metiltransferasa localizada en el extremo 5' del genoma viral, es capaz de catalizar la transferencia de un grupo metilo de S-adenosil metionina a GTP, para producir m7GTP y también forma un complejo covalente con m7GMP, indicando una actividad asociada a guanililtransferasa. La proteasa desubiquitina el gen 15 AMC estimulado por interferón (ubiquitina-7-amino-4-metilcumarina). La helicasa es un nucleósido trifosfatasa con la capacidad de desenrollar el ARN en dirección 5' a 3'. La "X" o macrodominio que puede ser un antagonista del interferón que inhibe la fosforilación del factor 3 regulador del interferón (IRF-3) y la RdRp viral que es esencial para la replicación viral (Kenney et al., 2015, Okamoto, 2013, Bouquet et al., 2012, Anang et al., 2016).

ORF2 y ORF3 se traslapan y se traducen a partir de un único ARN subgenómico bicistrónico de 2.2 kb de longitud (Okamoto, 2013). El ORF2 es una glicoproteína que codifica para la proteína estructural de la cápside que trabaja para el ensamblaje de las partículas virales, la unión a las células huésped y la producción de anticuerpos neutralizantes. Se ha demostrado que la glicosilación de ORF2 es importante para la formación de partículas virales infecciosas mediante la unión a la región 5' del ARN genómico que induce estrés en el retículo endoplásmico (RE) y explota la vía de degradación asociada al RE para obtener acceso al citoplasma donde inhibe la actividad NFκB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) del huésped el cual regula la respuesta inmune ya que las cadenas ligeras kappa son componentes fundamentales de las inmunoglobulinas (Anang et al., 2016, Yamashita et al., 2009).

Se ha dilucidado la estructura cristalina de una proteína recombinante de ORF2 trunca del genotipo 3, pero la estructura de toda la proteína de la cápside aún no se

ha obtenido. La proteína trunca de la cápside tiene 3 dominios definidos que han sido designados como S (“Shell”), M (“middle”) y P (“protruding”) compuestas por los residuos de aminoácidos 129-319, 320-455 y 456-606, respectivamente (figura 3). El dominio S, que forma una estructura interna se pliega en una estructura anti-paralela de barriles-beta sándwich tipo remolino con ocho láminas beta y cuatro alfa-hélices cortas que se conservan en las cápsides de muchos genomas virales. El dominio M es uno de los dominios característicos y tiene una estructura de barril beta anti- paralelo trenzado compuesto de seis laminas beta y cuatro alfa-hélices cortas. Los dominios M y P están vinculados con una larga bisagra rica en prolina (aminoácidos 445-467). El dominio P, a diferencia de otros virus reportados anteriormente se compone de un único dominio individual que forman una estructura de láminas beta con cadenas antiparalelas trenzadas, lo que demuestra que la proteína de la cápside de HEV tiene pliegues significativamente diferentes a los de calicivirus (Yamashita et al., 2009). Yamashita y colaboradores (2009) reportaron la estructura cristalizada de la proteína truncada con una forma icosaédrica con simetría T=1, sin embargo, concluyen que esta formación produce una partícula de menor tamaño que el virus silvestre, por lo que sugieren, de acuerdo a la literatura de otros virus similares que de manera normal el virus debe tener una forma icosaédrica T=3 (Yamashita et al., 2009).

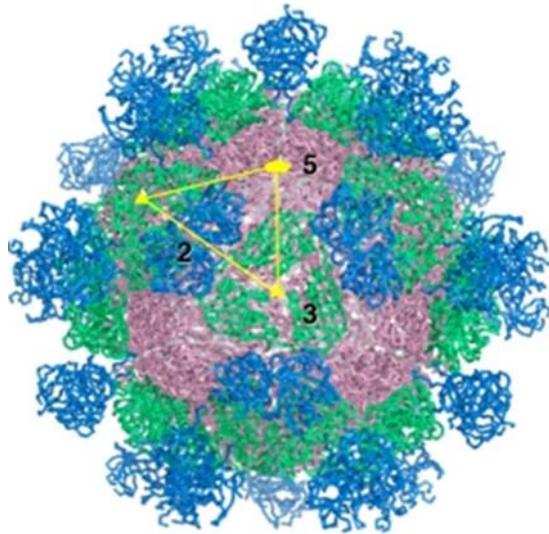


Figura 3. Estructura cristalina del VHE. Los dominios S, M y P de la proteína de la cápside se indican con rosa, verde y azul, respectivamente. El virus se compone de sesenta subunidades para la cápside que forman ejes icosaédricos de -2, -3 y -5 logrando una simetría  $T = 1$  (Yamashita et al., 2009).

En la secuencia del ORF2, Yamashita y colaboradores (2009) proponen tres sitios posibles de N-glicosilación: Asn-137-Leu-Ser, Asn-310-Leu-Thr y Asn-562-Thr. Mutaciones encontradas en Asn-137 o Asn-310 con un cambio a Glu producen un defecto en el ensamblaje del virión. Por otro lado, Asn-562 es mapeado en la región central de la parte superior del dímero P y expuesto en la superficie del HEV (Yamashita et al., 2009). Entre las regiones conservadas de la cápside de los genotipos que afectan a mamíferos se encuentran una secuencia señal en el extremo N y 3 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), pero aún se desconoce su importancia en el ciclo replicativo viral (Yamashita et al., 2009).

El ORF3 codifica para una fosfoproteína de 113 o 114 aminoácidos (aa), involucrada en el ensamblaje y liberación de los virus, así mismo, se ha demostrado que interactúa con factores celulares del huésped modulando su actividad. Por ejemplo, se une al gen 101 asociado a la susceptibilidad tumoral (TSG101) regulando la liberación de viriones y activa la MAP quinasa por medio de la unión y la inactivación

de la fosfatasa (MKP) promoviendo la supervivencia celular al favorecer la homooligomerización de la porina de membrana mitocondrial externa VDAC, aumentando los niveles de hexoquinasa, reduciendo así, la despolarización mitocondrial y la inhibición de muerte celular activada por la vía intrínseca (Chandra et al., 2008, Anang et al., 2016). Así mismo, se ha reportado como una proteína tardía viral sintetizada a partir del ARN subgenómico, que se genera después de la replicación del ARN genómico, y por lo tanto, no es esencial para la replicación pero si para la liberación de las partículas virales (Behrendt et al., 2014, Bouquet et al., 2012, Anang et al., 2016). Anang y colaboradores (2016) sugieren que el ORF 3 regula la liberación de viriones al secuestrar el dominio X y evitar su asociación con la metiltransferasa al tener una afinidad mayor; la metiltransferasa está asociada al dominio X en las etapas tempranas de replicación viral; al interponerse el ORF3 se desvía la replicación del virus al empaquetado y liberación de progenie (Anang et al., 2016). Por otra parte, se ha reconocido como modulador de la fase aguda de la respuesta inmunológica en donde se ha encontrado en endosomas iniciales inhibiendo el movimiento de los receptores del factor de crecimiento activados a endosomas finales, lo cual prolonga la señalización del factor de crecimiento de endomembranas y contribuye a la supervivencia celular. A través de este mecanismo, el ORF3 también reduce el transporte nuclear de pSTAT3, un factor de transcripción esencial para la expresión de genes de respuesta de fase aguda. Por último, se ha reportado que produce inmunosupresión al promover la secreción de  $\alpha$ 1-microglobulina (A1M), una proteína inmunosupresora que suprime la respuesta inmunológica de linfocitos y neutrófilos (Chandra et al., 2008).

Como se ha mencionado, el VHE se caracteriza por su variabilidad genética debido a una alta velocidad de replicación viral y a la falta de corrección de la ARN polimerasa dependiente de ARN. La diferenciación entre sub-genotipos se basa en una variación de aproximadamente un 12% (Pavio et al., 2010a, Behrendt et al., 2014). En el caso específico del genotipo 3, se ha encontrado una variación del 26% a nivel de nucleótidos, con diferencias de hasta el 22% en el ORF1 , 12% en el

ORF2 y 22% en ORF3 en su secuencia de aminoácidos (Smith et al., 2015b). Recientemente se ha reportado la recombinación intra e inter-genotipo en los genomas del VHE, que aunque parece ser poco frecuente se debe considerar como una posibilidad en el aumento de la diversidad viral (Ahmad et al., 2011).

### **1.2.3 Distribución**

Como se mencionó anteriormente, el virus de hepatitis E presenta una distribución mundial; sin embargo, la distribución es diferente para cada uno de los genotipos (Alvarado-Esquivel et al., 2014b). Los genotipos 1 y 2 infectan exclusivamente humanos y con frecuencia están asociados con grandes brotes y epidemias en países en desarrollo con condiciones sanitarias deficientes, se consideran zonas de alta endemia a Asia, África y América Central. Los genotipos 3 y 4 tienen la capacidad de infectar a humanos, cerdos y otras especies animales y han sido responsables de casos esporádicos que presentaron enfermedad en países desarrollados y en vías de desarrollo. El genotipo 3 presenta la mayor distribución a nivel mundial, mientras que el genotipo 4 se ha reportado exclusivamente en Asia (Rein et al., 2012, Mesquita et al., 2016, Perez-Gracia et al., 2015). Inicialmente los casos se asociaban a pacientes que habían hecho viajes a zonas de alta endemia, sin embargo, el descubrimiento de casos autóctonos en países industrializados ha generado mayor interés en el estudio del VHE.

De manera particular, el genotipo uno ha sido identificado específicamente en casos epidémicos y esporádicos en partes de Asia y África, donde la enfermedad es hiperendémica. También se ha aislado en áreas endémicas bajas a partir de pacientes que reportan viajes a zonas hiperendémicas (Perez-Gracia et al., 2015).

En cuanto al genotipo 2, las secuencias fueron reportadas primero en el brote de hepatitis E en México previamente descrito; sin embargo, también se han reportado brotes recientes en el oeste de África (Nigeria y Chad). Estas cepas presentan una

homología de nucleótidos de sólo el 75% y una homología de aminoácidos del 86% con aislamientos del genotipo uno (Perez-Gracia et al., 2015).

El genotipo tres se identificó primero en casos de humanos los cuales adquirieron la infección localmente en los Estados Unidos (EE. UU.); estos genotipos mostraron un 92% de homología entre sí, pero sólo 74-75% de homología de nucleótidos con los genotipos uno y dos. Desde entonces, el genotipo tres es reconocido como el que presenta una mayor distribución y ha sido reportado en casos humanos de varios países industrializados de Europa (Reino Unido, Francia, Países Bajos, España, Austria, Grecia, Italia), Japón, Australia y Nueva Zelanda; algunos casos también se han registrado en Corea y Argentina (Perez-Gracia et al., 2015).

Finalmente, el genotipo cuatro se ha encontrado en casos esporádicos de hepatitis E aguda en China, Taiwán, Japón y Vietnam y se encuentra limitado solamente a Asia (Perez-Gracia et al., 2015). La figura 4 muestra de forma esquemática la distribución de los diversos genotipos.

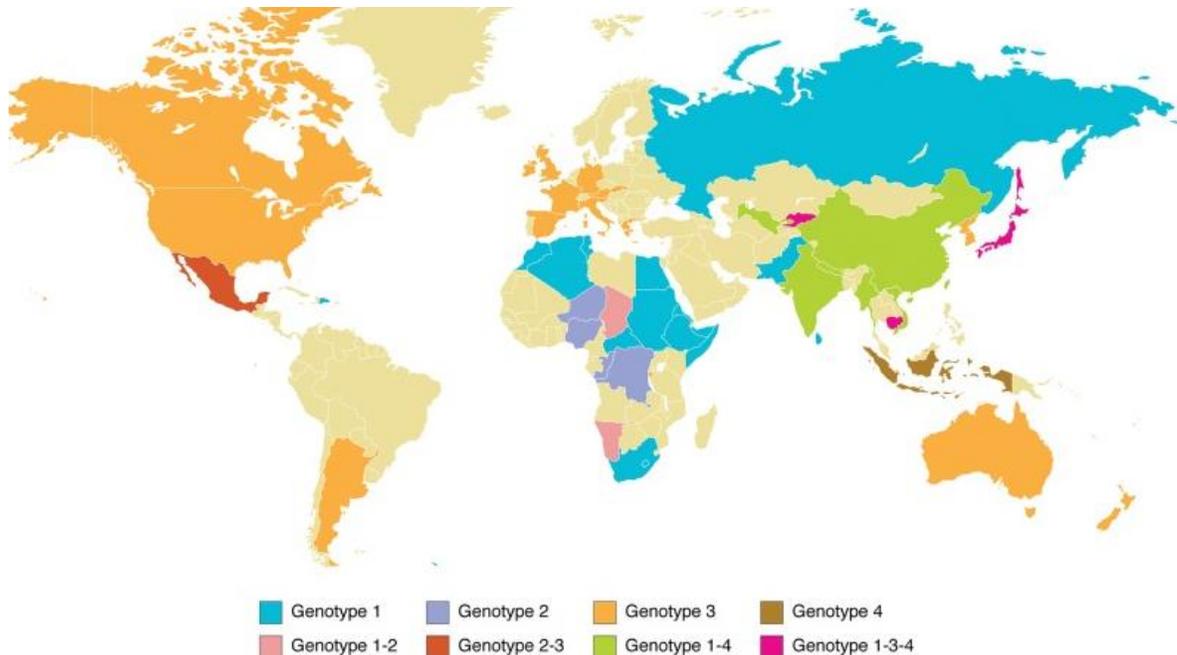


Figura 4. Distribución geográfica de los diferentes genotipos del virus de hepatitis E (Perez-Gracia et al., 2015).

Las tasas de seroprevalencia más altas se observan en las regiones donde los bajos niveles de saneamiento aumentan el riesgo de transmisión del virus. Más del 60% de todas las infecciones de hepatitis E y 65% de todas las muertes ocasionadas por el virus se producen en el Este y Sur de Asia, donde las tasas de seroprevalencia de 25% son comunes. Un ejemplo de esta situación se observa en Egipto, donde la mitad de la población de más de cinco años de edad es serológicamente positiva para el virus de la hepatitis E (Behrendt et al., 2014).

En Europa diversos estudios epidemiológicos han mostrado que entre 1.9% y 52% de la población han presentado anticuerpos anti-VHE. Está marcada diferencia se ha atribuido a la diferente sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico utilizadas, así como, las diferentes poblaciones estudiadas. En los EE.UU. se ha reportado una seroprevalencia alrededor del 25%. Variaciones similares se pueden ver en las zonas endémicas, donde se informan prevalencias entre 30-80%. Así mismo se ha observado que la seroprevalencia contra el VHE aumenta conforme aumenta la edad (Behrendt et al., 2014, Mesquita et al., 2016).

Algunos ejemplos recientes de prevalencias reportadas para el VHE son 10% en Reino Unido estando presentes los genotipos tres principalmente y recientemente el dos (Tedder et al., 2016); prevalencias que van del 2% al 11% se han reportado en Holanda con el genotipo tres (Tholen et al., 2016); en India es considerado hiperendémico el VHE y se considera involucrado en el 30% a 70% de los casos de hepatitis aguda (Singh et al., 2016). La figura 5 muestra las seroprevalencias publicadas en algunos países hasta el año 2008.

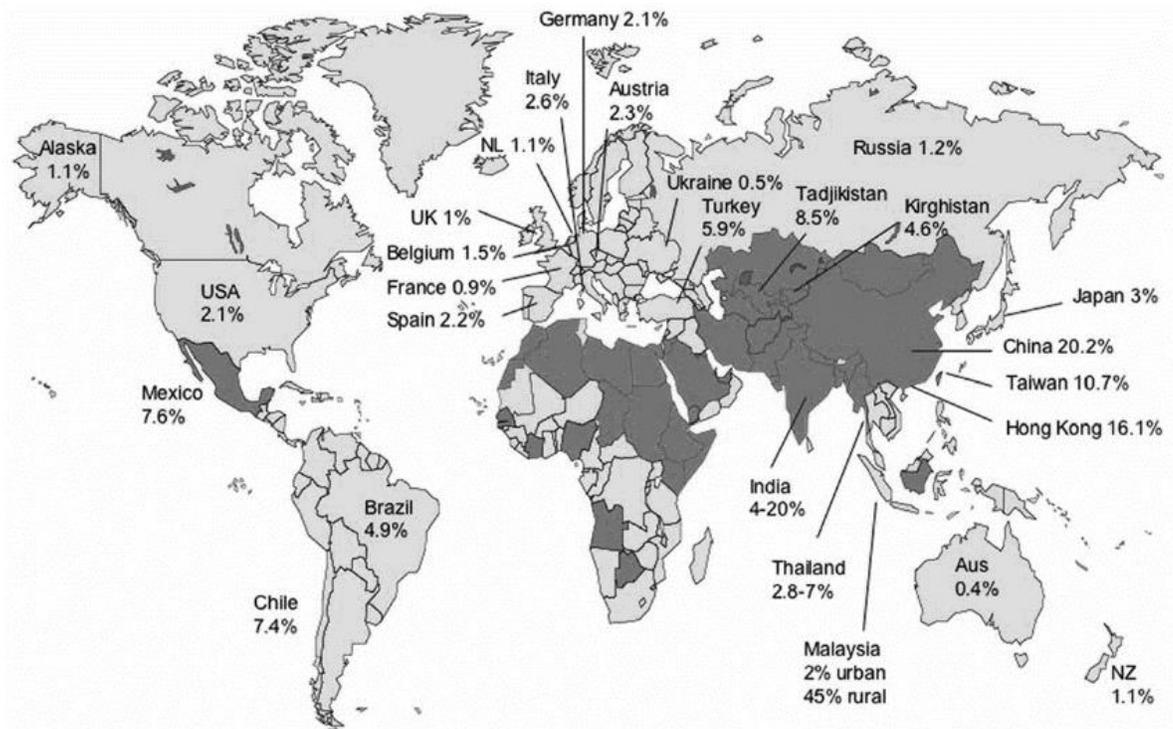


Figura 5. Áreas endémicas al VHE y seroprevalencia global. Los países en gris oscuro son los reportados como hiperendémicos, mientras los países en gris claro son considerados de baja endemicidad (Chandra et al., 2008).

En relación al VHE en cerdos, éste fue identificado por primera vez en el Medio Oeste de EE.UU. Las secuencias presentan una homología a nivel de aminoácidos de aproximadamente 90%-92% en el ORF2 y del 79%-83% en el ORF3 con las secuencias reportadas en Birmania y México de casos humanos. Actualmente se ha encontrado en cerdos de casi todas las partes del mundo, independientemente del nivel de endemicidad en las poblaciones humanas de la región (WHO, 2010). En la figura 6 se puede observar la distribución de hepatitis E en cerdos a nivel mundial, así como, la distribución de distintos huéspedes donde ha sido reportada la enfermedad (Sridhar et al., 2015).

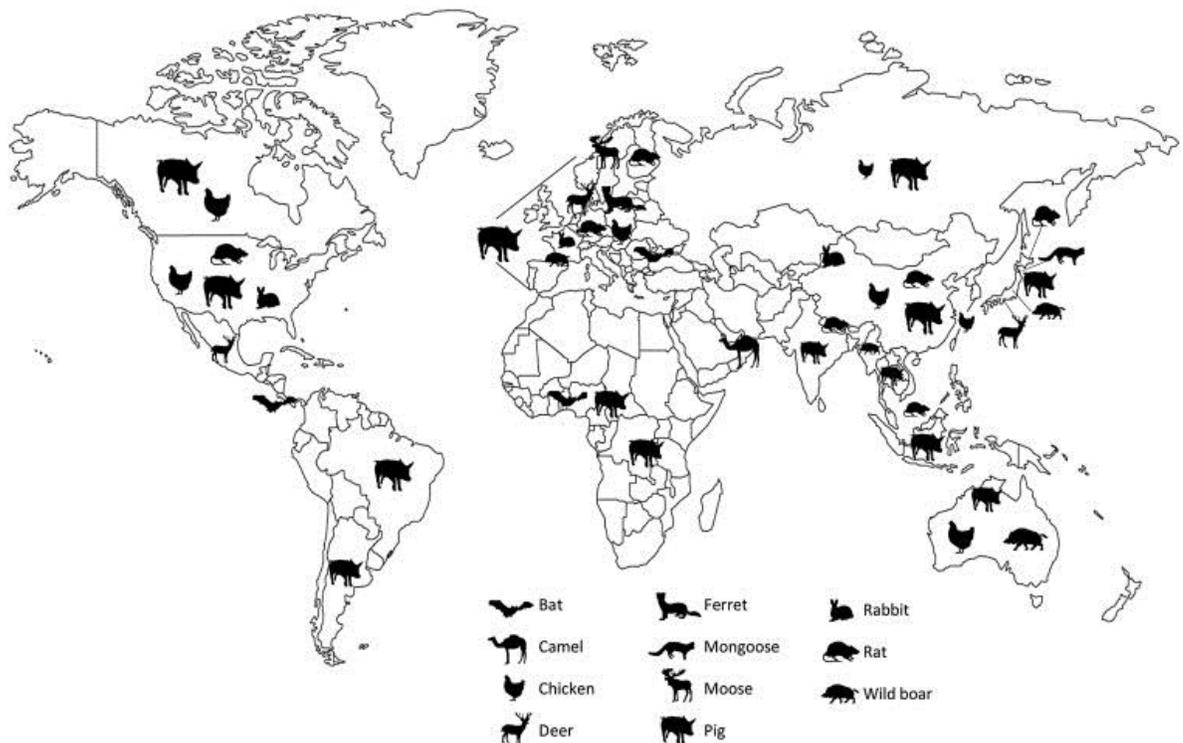


Figura 6. Distribución del virus de hepatitis E en cerdos y otros reservorios a nivel mundial (Sridhar et al., 2015).

En cuanto a la distribución y prevalencia en México, el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) de la Secretaría de Salud de México comenzó a reportar desde 1990 los casos de hepatitis ocasionadas por agentes virales en el país. De 2000 a 2007 se informó un total de 192 588 casos de hepatitis virales, de los cuales 79% correspondían al VHA, 3.3% al VHB, 6% al VHC y 11.7% no contaban con diagnóstico preciso. El diagnóstico del VHE no se encuentra disponible al público en nuestro país; por lo tanto, se puede considerar que está involucrado en el 11.7% de hepatitis virales sin agente etiológico conocido, lo cual implicaría que puede estar asociado a algunos de estos de 24 000 casos (Panduro et al., 2011).

A pesar de la baja cantidad de estudios reportados sobre el VHE en el país, de manera general se considera a México como país endémico para el genotipo 2, al cual se le nombra “cepa mexicana”. Así mismo, se han realizado estudios en otras

especies, lo que confirma la presencia de otros genotipos en el país (Cooper et al., 2005, Kuniholm et al., 2015).

En cuanto a la enfermedad en humanos, distintos autores han reportado diversas seroprevalencias en diferentes Estados de la República Mexicana y en distintas condiciones de estudio. Entre éstos, Alvarado-Esquivel y colaboradores (2014) reportan una prevalencia de 36.6% en adultos en zonas rurales de Durango, México (Alvarado-Esquivel et al., 2014b); Bernal-Reyes y colaboradores (1996) reportaron una seroprevalencia de 6.3% en residentes del Estado de Hidalgo (Bernal Reyes and Licona Solis, 1996) y Álvarez-Muñoz y su grupo de investigadores (1999) encontraron en un estudio a nivel nacional en personas de uno a 29 años, una seroprevalencia de 10.5% a la infección por el VHE (Alvarez et al., 1999). En cuanto a estudios realizados en cerdos, el artículo más reciente de seroprevalencia en México reporta una seroprevalencia de 30.75% en la población de cerdos en general. En este estudio se analizaron 683 muestras de suero de cerdos clínicamente sanos de todas las etapas de producción en 9 Estados en el centro del país. Sin embargo, no obtuvieron muestras positivas por RT-PCR a partir del análisis de heces (Merino-Ramos et al., 2016). La figura 7 muestra la seroprevalencia o porcentaje de muestras positivas que han sido reportadas en nuestro país en cerdos, venados cola blanca y humanos.

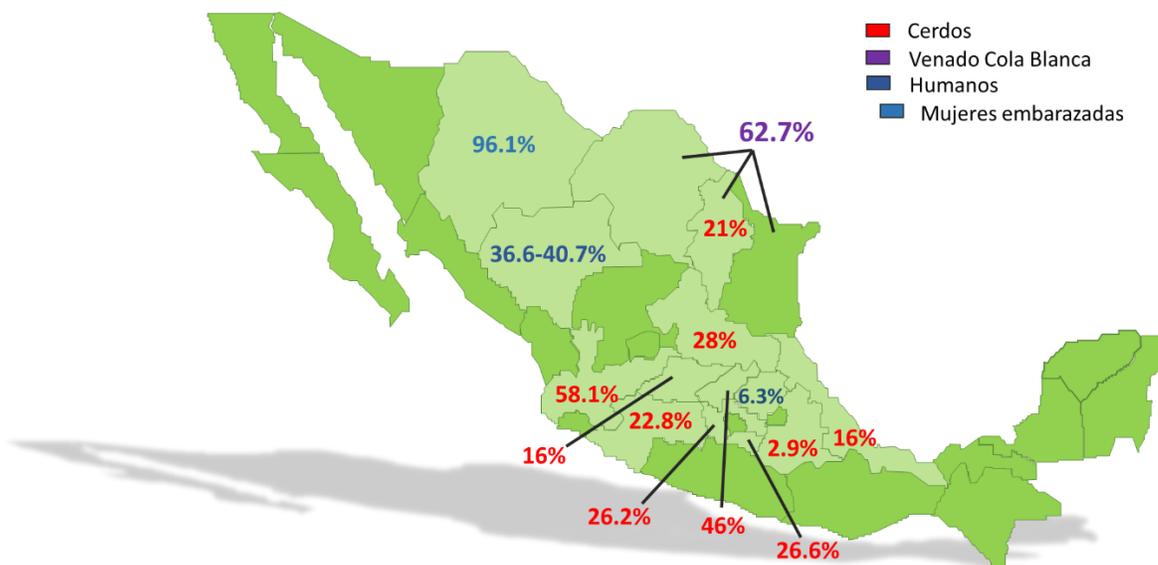


Figura 7. Prevalencia o porcentaje de muestras positivas reportadas en México en cerdos, venados y humanos (Cantu-Martinez et al., 2013, Medrano et al., 2012, Alvarado-Esquivel et al., 2015, Alvarado-Esquivel et al., 2014b, Cooper et al., 2005, Redlinger et al., 1998).

### 1.2.4 Transmisión

La vía de transmisión del virus depende del genotipo. Los genotipos 1 y 2 se transmiten principalmente de manera natural en humanos a través de la vía fecal-oral, debido a la contaminación fecal de los suministros de agua o productos alimenticios; mientras que los genotipos 3 y 4 suelen transmitirse por medio de la ingesta de alimentos contaminados (Prpić et al., 2015, Mesquita et al., 2016). Sin embargo, otras rutas de transmisión han sido descritas: la transmisión por alimentos o productos derivados de animales infectados, transfusión de productos sanguíneos infectados, la transmisión vertical de una mujer embarazada a su feto o el trasplante de órganos (Wedemeyer et al., 2012, Scobie and Dalton, 2013, Aggarwal, 2013).

El descubrimiento de la enfermedad inició con brotes de casos agudos de ictericia ocasionados por la contaminación de grandes suministros de agua. En países en

desarrollo esta es la principal vía de transmisión debido a las bajas condiciones de sanitización. Los brotes del VHE pueden ser de larga duración y pueden afectar a cientos de miles de personas. Estos brotes pueden variar de agudos a crónicos y durar hasta 1 año, durante el cual, el porcentaje de la población afectada puede variar entre 1% y 15%. Se ha reportado que la enfermedad es más frecuente en adultos (3-30%) que en los niños (0,25-10%) lo cual sugiere que los niños presentan más infecciones subclínicas. También es importante resaltar que los hombres se infectan con más frecuencia que las mujeres y que la transmisión de persona a persona es rara y es más frecuente en los miembros de una misma familia que comparten la misma fuente de agua (Perez-Gracia et al., 2015, Purcell et al., 2013).

En cuanto a la transmisión vertical del virus, se ha sugerido que sucede de manera frecuente y que suele ser perjudicial para el feto y el recién nacido. A la fecha, solo se ha reportado este tipo de transmisión en los genotipos 1 y 2 (Krain et al., 2014a).

Aunque los seres humanos se consideran el huésped natural para el VHE, se han detectado anticuerpos contra el virus en primates y varias otras especies animales (cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos, macacos, gatos, perros, ratas y ratones), los cuales muestran evidencia serológica de infección por el VHE y en algunos casos están relacionados a la transmisión zoonótica de la enfermedad (Pavio et al., 2010b). La naturaleza zoonótica del VHE fue confirmada en 1997 con la identificación de cepas del virus en cerdos en EE. UU., que estaban estrechamente relacionados con un aislado del virus de un paciente; un año después se reportó experimentalmente que ese aislado era capaz de infectar primates no humanos (Meng et al., 1997, Meng et al., 1998, Halbur et al., 2001, Organization, 2010). En estudios experimentales, aislados del genotipo tres de seres humanos y de cerdos han demostrado cruzar barreras de especies, siendo capaces de infectar cerdos libres de patógenos específicos y primates no humanos respectivamente. Además, el genotipo cuatro ha sido transmitido experimentalmente con éxito a primates (Behrendt et al., 2014, Serracca et al., 2015). Por lo tanto, actualmente se sabe que la infección por el VHE es una zoonosis que puede ocurrir a través del consumo de

alimentos de origen animal contaminados por el virus (Tei et al., 2003, Tamada et al., 2004, Meng et al., 2015, Prpić et al., 2015).

Se considera al cerdo, ya sea doméstico o silvestre, como el principal reservorio en la naturaleza y fuente primaria directa o indirecta de la infección hacia el humano (Prpić et al., 2015). Diversos estudios han mostrado la presencia del virus en distintos productos cárnicos del cerdo; entre ellos el hígado y las salchichas. Los cuales han sido detectados en Estados Unidos, Francia, Alemania y Holanda (Di Bartolo et al., 2015, Martin-Latil et al., 2014, Wilhelm et al., 2014, Forgách et al., 2010). En el caso de México, en el Estado de Nuevo León, al norte de nuestro país, Cantú-Martínez y colaboradores (2013) encontraron una positividad de 21% en promedio en hígados de cerdos destinados para consumo humano obtenidos en carnicerías y puntos de venta (Cantú-Martínez et al., 2013).

Por otra parte, también se ha reportado la presencia del virus en distintas especies de venados, a los cuales también se les considera reservorios naturales y fuente de infección zoonótica (Prpić et al., 2015). En México, Medrano y colaboradores (2012) han reportado una seroprevalencia de 62.7% en venados cola blanca en tres Estados al norte del país, los cuales se producen en ranchos cinegéticos para la caza y su posterior consumo (Medrano et al., 2012).

Así mismo, se ha reportado ampliamente que las personas que tienen contacto cercano con cerdos y ciervos, como son trabajadores de granjas, médicos veterinarios o personal de rastro, muestran una mayor prevalencia de anticuerpos contra el virus que el resto de la población (Behrendt et al., 2014, Prpić et al., 2015, Cantú-Martínez et al., 2013).

En el caso particular de los cerdos se ha demostrado la transmisión oro-fecal y por contacto directo. Recientemente se ha sugerido la posible transmisión del virus por aerosoles y se ha descartado la transmisión vertical (Prpic et al., 2015, Kasorndorkbua et al., 2004). Los cerdos alojados en un mismo corral están constantemente expuestos a la saliva, las secreciones nasales, orina y heces

debido al hacinamiento, lo que aumenta el riesgo de contraer la infección. Sin embargo, Kasorndorkbua y colaboradores (2004) realizaron un estudio para probar diferentes rutas de transmisión que incluían el uso de jeringas para varios cerdos, secreciones nasales e ingestión de heces. Los autores comprobaron que solo a los cerdos que se les administraron oralmente heces de cerdos infectados habían generado anticuerpos anti VHE y eliminado el virus en heces (Kasorndorkbua et al., 2004).

### **1.2.5 Patogenia**

El virus tiene como órgano blanco el hígado, sin embargo, se ha comprobado su replicación en otros órganos como son el colon, intestino delgado y linfonodos mesentéricos y hepáticos, así como su presencia en células mononucleares de sangre periférica (Meng, 2005, Ahmad et al., 2011).

En los humanos se ha reportado que el periodo de incubación tras la exposición varía entre tres y ocho semanas, con una media de 40 días (Wedemeyer et al., 2012). La excreción en las heces se ha demostrado desde una semana antes de la aparición de signos clínicos hasta 30 días después de la aparición de la ictericia y se deja de eliminar dos o tres semanas después de la desaparición de la ictericia (Pavio et al., 2010b). Tedder y colaboradores (2016) reportaron que la media para la eliminación del virus es de 6 semanas (Tedder et al., 2016).

Después de la entrada al hospedero, el mecanismo por el cual el VHE infecta las células aún es poco conocido debido a la falta de un cultivo celular permisible. A la fecha se han reportado algunos receptores celulares como los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) y el receptor HSC70, los cuales podrían estar involucrados en la entrada del virus a la célula (Kenney and Meng, 2015, Wedemeyer et al., 2012, Guerrero et al., 2002). También se ha sugerido que los receptores de superficie para asialoglicoproteína (ASGPR) regulan principalmente las etapas de unión y entrada del VHE interactuando directamente entre la cápside y el ectodominio de ambos

ASGR1 y ASGR2. Entre estos, la lectina tipo C es un receptor de superficie celular para las ASGPRs. Se encuentra principalmente en el hígado, actuando en la endocitosis de las glicoproteínas séricas. Así mismo, se ha reportado que el péptido de la proteína de la cápside que se encuentra en los aminoácidos 368-606 abarcando parte del dominio M y P, es capaz de unirse a varias líneas de células, lo que sugiere también que está implicado en la unión a los receptores celulares (Yamashita et al., 2009).

Durante la entrada a las células, se requiere la reorganización de la estructura del virión para la liberación del genoma de la membrana. Sin embargo, los mecanismos de desnudamiento siguen siendo desconocidos. Se ha descrito la región del centro del pentámero como un posible canal para la liberación del genoma al citosol, ya que forma una estructura similar a un canal. Ya que el virus fue internalizado, Ahmad y colaboradores (2011) proponen que una vez que el ARN viral se libera en el citosol se traduce directamente en la poliproteína ORF1, como es el caso con todos los virus ARN de sentido positivo. No está claro si la poliproteína se procesa en unidades funcionales individuales. Sin embargo, mencionan que las regiones predichas para codificar la metiltransferasa viral, helicasa y replicasa producen proteínas funcionalmente activas cuando se expresa en sistemas heterólogos. El ARN genómico produciría ARN intermedios de sentido negativo los cuales sirven como moldes para la síntesis de ARN genómicos y subgenómicos de sentido positivo, estos últimos se traducen en el ORF2 (cápside) y las proteínas del ORF3. Las proteínas del ORF2 empaquetan el ARN genómico de sentido positivo en viriones progenie, la proteína ORF3 participa posiblemente durante el proceso de gemación (figura 8) (Ahmad et al., 2011, (Kenney and Meng, 2015).

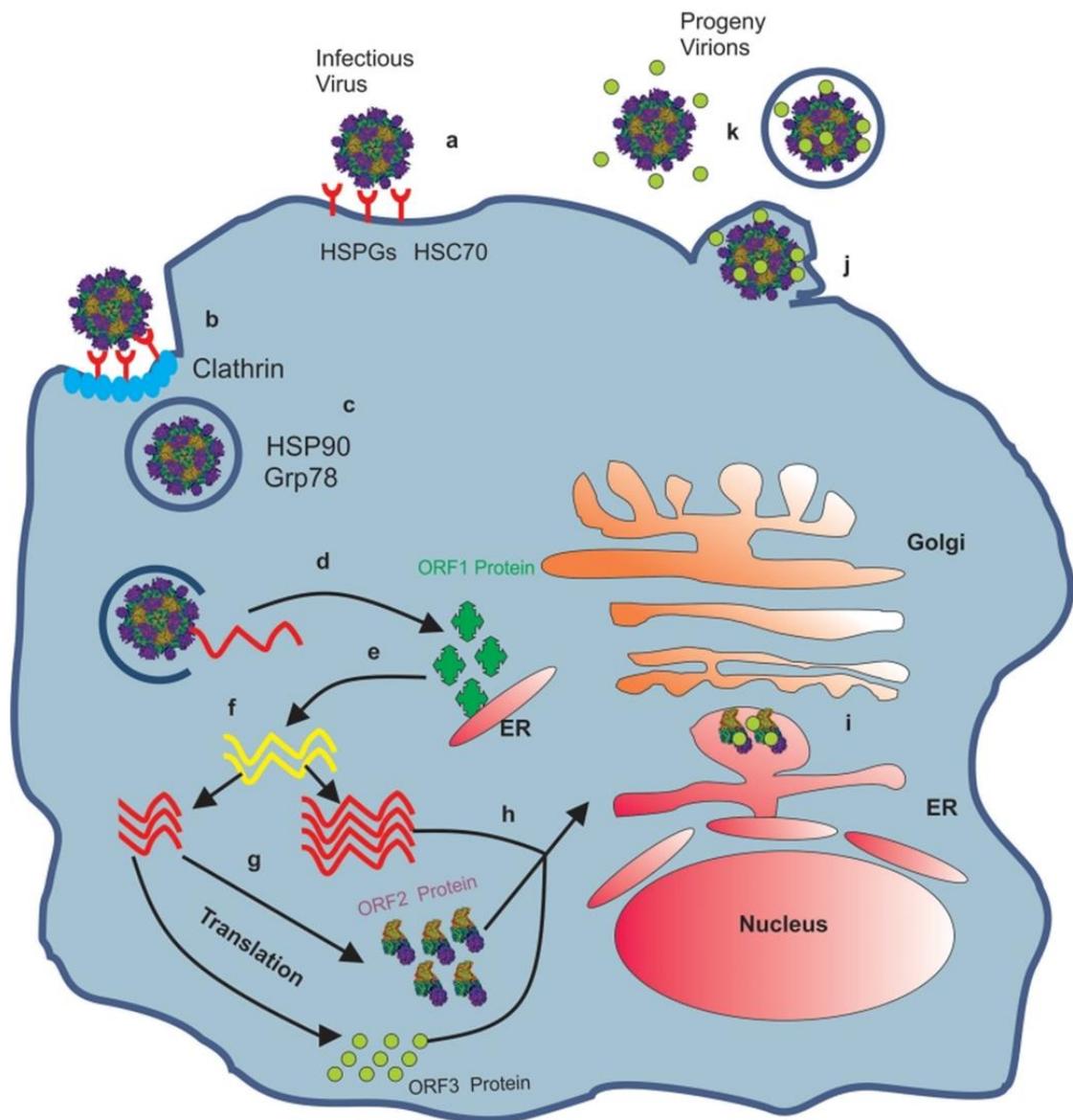


Figura 8. Replicación propuesta del virus de hepatitis E (VHE). Las partículas virales se concentran en la superficie de las células diana a través de proteoglicanos de sulfato de heparina como factores de unión y posteriormente se unen a un receptor específico (a), después de lo cual se internalizan las partículas por medio de endocitosis mediada por clatrina (b). El virus pierde la cápside (d) para liberar el ARN genómico (líneas rojas) que se traduce en el citoplasma en proteínas no estructurales. Estas proteínas no estructurales incluyen la RdRp que replica el ARN genómico de sentido positivo en sentido negativos (líneas amarillas) (f); estos

últimos actúan entonces como moldes para la síntesis de un ARN subgenómico de 2.2 kb, así como transcripciones completas de sentido positivo. El ARN subgenómico de sentido positivo se traduce en la cápside y proteínas del ORF3 (g). La proteína ORF2 empaqueta el ARN genómico en nuevos viriones (h), mientras que la proteína ORF3 puede optimizar el entorno de la célula hospedadora para la replicación viral y también se asocia con endomembranas o membranas plasmáticas lo cual ayuda en la salida de los virus. El virus interactúa con la maquinaria ESCRT del huésped para el tránsito a través de la membrana celular y la adquisición de la envoltura (k). Los viriones envueltos pierden su asociación de lípidos cuando pasan a través del sistema digestivo y se vuelven infecciosos (Kenney and Meng, 2015).

En respuesta a la infección con el virus, los anticuerpos IgG anti-VHE aparecen alrededor de la tercera y cuarta semana al mismo tiempo que la elevación de la alanina aminotransferasa (ALT) y se han reportado hasta 13 años después de la infección. Por otra parte, las IgMs aparecen solamente en el período sintomático. La respuesta inmune celular a la infección aguda está pobremente caracterizada. Se reporta expansión de células CD4+ en los pacientes, sin embargo, las proporciones de CD4+/CD69+ y CD8+/CD69+ no presentan cambios, lo cual es interesante debido a que son las células productoras de interferón gamma (IFN), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina-4 (IL-4). Así mismo, parece que la infección modula la producción de células T al observarse una disminución de células T productoras de IFN y TNF $\alpha$ , lo cual también puede ser un resultado del secuestro de las células inmunes en el hígado (Chandra et al., 2008).

En el caso de los cerdos se ha reportado que la infección por el VHE se produce normalmente entre las 8 y 12 semanas de edad. A partir de la infección la viremia dura entre una y dos semanas. El virus produce el pico máximo de anticuerpos en la doceava semana y el periodo de eliminación del virus en las heces dura entre 3 y 7 semanas (Casas et al., 2011). Estudios realizados para elucidar el periodo de viremia en los cerdos mostraron un fuerte contraste entre la prevalencia de

anticuerpos (72%) y el número de muestras de suero que fueron positivas para ARN viral (1%) (Kasorndorkbua et al., 2004). Así mismo se ha reportado que el virus se puede detectar en el hígado hasta 4 semanas después de la infección. Por lo tanto, los animales que han desarrollado anticuerpos anti VHE no deberían tener virus en ningún órgano cuando lleguen al rastro. Sin embargo, Casas y colaboradores (2011) detectaron virus en el hígado o en la bilis en algunos cerdos seropositivos a la edad de sacrificio. La mayoría de estos animales habían desarrollado anticuerpos a las 7 semanas de edad que muestra que la infección se produjo varios meses antes de la edad de rastro. Esta persistencia se atribuye a la replicación del virus en los órganos blanco; esta sugerencia aunada a una corta inmunidad protectora podría facilitar reinfecciones durante su vida productiva. De esta manera se explicaría la presencia de virus en órganos en el rastro, lo que representa un riesgo para la inocuidad de los alimentos (Casas et al., 2011).

### **1.2.6 Signos clínicos**

El VHE afecta principalmente a adultos jóvenes y de mediana edad, principalmente entre 15 y 40 años de edad. La infección provoca hepatitis aguda y en individuos inmunocompetentes crónica. Sin embargo, en la mayoría de los casos la presentación de la enfermedad es subclínica y se ha relacionado a la variación antigénica de diferentes variantes del virus (Colson et al., 2007, Schlosser et al., 2015, Wedemeyer et al., 2012, Smith et al., 2015b, Chandra et al., 2008, Smith et al., 2015a, Aggarwal, 2013).

Como se mencionó antes, sólo los genotipos 1, 2, 3, 4 y 7 son capaces de causar enfermedad aparente en los seres humanos y otros mamíferos. Específicamente, los genotipos 1 y 2 únicamente infectan a humanos, mientras que los genotipos 3, 4 y 7 son patógenos zoonóticos encontrados en el cerdo, el jabalí, los ciervos y los camellos como reservorios (Behrendt et al., 2014, Serracca et al., 2015, Organization, 2010).

Los signos y síntomas que se observan en los humanos de entre 15 y 40 años incluyen: ictericia (coloración amarilla de la piel y la esclerótica de los ojos, orina oscura y heces de color claro), anorexia (pérdida de apetito), hepatomegalia (agrandamiento del hígado), dolor y sensibilidad abdominal, náuseas, vómitos y fiebre. Estos síntomas son indistinguibles de los experimentados durante cualquier fase aguda de una enfermedad hepática y por lo general tienen una duración de una a dos semanas. La infección en niños, aunque es frecuente, es mayormente asintomática o causa una enfermedad muy leve sin ictericia que pasa sin ser diagnosticada (Aggarwal, 2013, Wedemeyer et al., 2012, Helsen et al., 2016).

Adicionalmente, las mujeres embarazadas se consideran un grupo vulnerable en el cual la infección por el virus puede ocasionar daño hepático fulminante (insuficiencia hepática aguda) y la muerte durante el embarazo, la cual se reporta hasta en 20% a 30% de los casos en mujeres embarazadas en el tercer trimestre (Behrendt et al., 2014, Alvarado-Esquivel et al., 2014a, Cantú-Martínez et al., 2013). A pesar de que no se conoce el mecanismo exacto con el que el virus afecta en el embarazo, se ha mencionado que puede estar relacionado a cambios inmunológicos y hormonales durante esta etapa, específicamente con la reducción en la expresión de progesterona (Wedemeyer et al., 2012). Sin embargo, varios factores pueden estar relacionados con la patogénesis, tales como el genotipo (genotipos 1 y 2 son más patogénicos, genotipo 3 no se ha reportado en casos de daño hepático fulminante), la carga viral y la presencia de coinfecciones (Pavio et al., 2010b).

Krain y colaboradores (2014) establecieron que la transmisión vertical también se lleva a cabo durante el embarazo y contribuye directamente en la morbilidad y mortalidad infantil en el periodo postnatal temprano. Se ha observado que estos pacientes nacen con la enzima ALT elevada y la presentación clínica de hepatitis la cual persiste por unas semanas. Así mismo, los autores sugieren que, en países en desarrollo, este método de transmisión puede ser responsable de más de 3 000 niños nacidos muertos cada año, incluyendo muertes fetales relacionadas con la mortalidad materna prenatal. También se ha mencionado que la infección fetal en

el útero puede en sí contribuir a la presentación de la hepatitis fulminante en las mujeres embarazadas (Krain et al., 2014a, Khuroo and Kamili, 2006).

Por otra parte, los casos de infección crónica del VHE se han reportado en personas inmunodeprimidas, por ejemplo, en personas con enfermedad hepática crónica, trasplante de órganos o personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés, human immunodeficiency virus) en los cuales la enfermedad evoluciona rápidamente a cirrosis hepática, pérdida del órgano trasplantado y muerte (Crossan et al., 2013, Kuniholm et al., 2015, Helsen et al., 2016). Kuniholm y colaboradores (2015) realizaron un estudio para relacionar la presencia de casos del VHE con pacientes diagnosticados con el HIV y reportaron el primer caso de infección crónica por el virus en uno de los tres pacientes positivos al VHE de los 2,919 pacientes con HIV estudiados (Kuniholm et al., 2015).

Recientemente también se ha relacionado al VHE con problemas neurológicos, donde han podido aislar el virus a partir de fluido espinal (Behrendt et al., 2014). Los síntomas neurológicos se han descrito para los genotipos 1 y 3. Las manifestaciones neurológicas observadas son el síndrome de Guillain- Barré, parálisis, amiotrofia neurálgica de Bell, mielitis transversa aguda y meningoencefalitis aguda (Kamar et al., 2014).

En el caso de los cerdos; la infección por el VHE es muy común, aunque no causa ninguna enfermedad clínica y pasa como una infección asintomática causando solamente una hepatitis linfoplasmocítica multifocal leve a moderada con necrosis hepatocelular focal a leve (Organization, 2010, Meng, 2005). Un estudio llevado a cabo para confirmar la transmisión vertical en cerdos determinó que este tipo de transmisión no se lleva a cabo y que no hay un efecto en el tamaño fetal, la viabilidad, el peso al nacer o la ganancia de peso (Kasorndorkbua et al., 2003).

Recientemente, hay varios reportes en los que se mencionan casos severos de morbilidad y mortalidad en los que ha sido relacionado el virus de hepatitis E en coinfecciones. En uno de estos estudios realizado en China, se reportó la presencia

del VHE en hígados de cerdos en un brote de una enfermedad desconocida en dos granjas que ocasionó una mortalidad de aproximadamente 90% en cerdos de engorda. Los animales presentaban lesiones características de circovirus porcino (CP), así como, infiltración linfocítica significativa en el área portal, y grandes áreas localizadas de fibrosis, necrosis y vacuolización en el hígado. Por medio de la tinción con inmunohistoquímica demostraron la presencia de la proteína del ORF2 del VHE distribuida en múltiples órganos, particularmente en el hígado y los riñones. Los autores concluyen que otros factores podrían estar asociados pero que la coinfección de CP y el VHE puede ocasionar una enfermedad más grave (Yang et al., 2015). En otros dos estudios se menciona la coinfección con el virus de PRRS (síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo). Salines y colaboradores (2017) demostraron en cerdos libres de patógenos específicos, que la infección con PRRSv y con el VHE genera un aumento de 10 veces el tiempo de excreción del virus, mientras que, Mao y colaboradores (2013) lo encuentran en un caso clínico con 100% de mortalidad y mencionan que podría volverse una enfermedad crónica que explicaría porque los animales que llegan a rastro siguen siendo positivos al virus en hígado (Mao et al., 2013, Salines et al., 2015).

### **1.2.7 Diagnóstico**

La OMS establece que se debe sospechar de la infección por el virus de hepatitis E en brotes de hepatitis transmitidas por el agua que sucedan en países en desarrollo, sobre todo si la enfermedad es más grave en las mujeres embarazadas y específicamente si se ha excluido la infección por virus de hepatitis A. De esta manera, es evidente que la presentación clínica de hepatitis E no es distinguible de otros tipos de hepatitis virales agudas. Por esta razón, el diagnóstico principal se basa en pruebas serológicas dirigidas a la detección de anticuerpos específicos (IgM e IgG) contra el virus a partir de una muestra de suero o el uso de técnicas moleculares para la detección del ARN viral en suero, bilis o heces (Chandra et al., 2008).

En humanos, la mayoría de los pacientes con infección aguda poseen anticuerpos detectables de IgM e IgG anti-HEV durante la aparición de los síntomas clínicos; mientras los pacientes con infecciones pasadas solo presentan IgGs. Por lo tanto, en una zona endémica, la prueba de IgM es de mayor importancia para la detección de infecciones agudas, mientras que la prueba de IgG tiene mayor importancia en los estudios de seroprevalencia. Sin embargo, las pruebas serológicas varían en sensibilidad y especificidad y desafortunadamente no están disponibles en la mayoría de los países como pruebas rutinarias (Chandra et al., 2008, Kuniholm et al., 2015, Pas et al., 2013, Dalton et al., 2009).

Los ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) utilizados comúnmente para detectar anticuerpos, contienen antígenos recubiertos derivados del ORF2 y ORF3, que están diseñados principalmente para la detección de anticuerpos contra los genotipos 1 (Birmania) y 2 (México), sin embargo, Pas y colaboradores (2009) afirman que los kits disponibles funcionan para el genotipo tres adecuadamente. Algunos de los kits comerciales más utilizados son el Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise y el Biokit; recientemente se empezó a comercializar el único ensayo ELISA que utiliza antígenos genotipo uno y tres, de la marca Mikrogen (Dalton et al., 2009, Pas et al., 2013). Otro ejemplo de estos kits de ELISA es el ImmunoVision de Springdale, AR, el cual es un kit comercial para la detección de IgM anti- HEV; el cual utiliza un sistema de detección con una combinación del VHE recombinante con un péptido derivado del ORF2 y ORF3, el cual reporta una sensibilidad y especificidad mayor a 99% (Singh et al., 2016).

Las pruebas moleculares que se pueden utilizar incluyen la microscopía inmuno-electrónica y la reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa (RT - PCR) para detectar el ARN del virus proveniente de distintos tipos de muestras y la secuenciación para identificar genotipos o subtipos. Otra técnica que ha sido descrita para el diagnóstico del VHE es la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés “loop-mediated isothermal amplification”). El

ensayo LAMP es más rápido que el PCR tiempo real y no necesita equipo especial, por lo que es ideal para las áreas de recursos limitados (Ahmed et al., 2015).

La detección del genoma del virus a partir de muestras de suero y heces con RT-PCR se ha considerado la prueba estándar para el diagnóstico de la enfermedad. En humanos el ARN se puede detectar en las heces 1 semana antes y hasta 6 semanas después de la aparición de los síntomas y en el suero durante 3-4 semanas desde el inicio de la enfermedad (Ahmed et al., 2015). En cerdos, el periodo para la detección de virus en suero se reduce a una o dos semanas después de la infección (Casas et al., 2011). Sin embargo, la ausencia de signos clínicos de la enfermedad imposibilita la toma de muestras de suero con sospecha de viremia en animales infectados naturalmente. Al igual que para cualquier virus ARN, la sensibilidad de las pruebas moleculares depende del momento de la toma de muestra, el manejo y en este caso el genotipo. Los ensayos de PCR publicados hasta la fecha tienen un alto grado de variabilidad en el rendimiento. Por lo tanto, la OMS ha recomendado un protocolo internacional para la detección del ARN del VHE que utiliza el genotipo 3 (Ahmed et al., 2015) a partir de un PCR estandarizado nacionalmente en Japón (Baylis et al., 2013). Sin embargo, a la fecha uno de los protocolos más utilizados es reportado por Huang y colaboradores (2002), el cual está constituido por un protocolo anidado con dos juegos de “iniciadores” degenerados para la identificación de cualquier genotipo (Huang et al., 2002).

A la fecha no ha sido factible utilizar el cultivo celular y aislamiento viral como una técnica de diagnóstico, ya que el virus difícilmente se adapta a los cultivos (Pas et al., 2013, Wedemeyer et al., 2012). Sin embargo, recientemente se han reportado varias líneas celulares transformadas que son permisivas para el virus y permiten su replicación. Estas incluyen líneas de células hepáticas tales como Huh7, PLC/PRF/5 y HepG2/C3A, la línea celular A549 de carcinoma de pulmón y la línea celular Caco-2 de carcinoma de colon, línea celular HepaRG derivada de un hepatoma humano y la línea celular PICM-19 que son células madre derivadas de embriones porcinos (Ahmad et al., 2011, Helsen et al., 2016, Rogee et al., 2013).

Estas líneas celulares transformadas no son las más adecuadas para estudiar cuestiones de patogenia del virus como lo serían los hepatocitos primarios humanos, sin embargo, son muy difíciles de obtener (Helsen et al., 2016).

Otras alternativas que se ha considerado son las células embrionarias humanas (hESC) o hepatocitos derivados de células madre pluripotentes (hiPSC). Actualmente se ha demostrado que los hiPSC pueden ser infectados con el VHC y el VHB, y con una cepa del VHE (Kernow -C1p6) del genotipo 3 que lleva una mutación G1634R en la región C -terminal de la polimerasa que incrementa su replicación (Helsen et al., 2016, Debing et al., 2014).

### **1.2.8 Prevención y tratamiento**

A la fecha, no existe un tratamiento disponible capaz de alterar el curso de la hepatitis aguda, sin embargo, la enfermedad suele ser autolimitante por lo que no es necesario recurrir a un tratamiento. En casos crónicos se puede utilizar una combinación de interferón y ribavirina, de los cuales se han reportado buenos resultados y podrían también ser utilizados en personas con hepatitis fulminante o mujeres embarazadas con presentación de signos clínicos (Aggarwal, 2013, Ahmad et al., 2011). Sin embargo, se han observado casos en los que el tratamiento no ha sido eficaz; se sugiere que se puede deber a una respuesta parcial o a una recurrencia viral relacionada a la reducción de la dosis debido a la anemia severa que ocasiona (Debing et al., 2014).

Como en un gran número de enfermedades la prevención es el enfoque más eficaz. Evitar la infección por transmisión con agua contaminada se puede conseguir mediante el mantenimiento de los estándares de calidad de los suministros públicos de agua, así como, el establecimiento de sistemas de eliminación adecuados para residuos sanitarios. A nivel personal, el riesgo de infección se puede reducir mediante el mantenimiento de prácticas de higiene como lavarse las manos con agua potable, sobre todo antes y después de manipular alimentos especialmente

de origen cárnico; evitando el agua de calidad desconocida y el uso de prácticas de inocuidad en alimentos (Ahmed et al., 2015).

En 2011, la primera vacuna para prevenir la infección de hepatitis E se registró en China llamada HEV 239 (Hecolin). A pesar de que no está disponible a nivel mundial, potencialmente podría llegar a ser disponible en otros países. Es una vacuna recombinante polipeptídica expresada en bacterias basada en un segmento de 26 kDa derivada del ORF2 del genotipo 1. El polipéptido toma la forma de una partícula similar a un virus con presentación superficial de epítomos inmunodominantes para una óptima inmunogenicidad. La vacuna es fabricada en China y se ha reportado una eficacia de 94-100% en un ensayo de fase III llevado a cabo en 100 000 soldados. Los estudios mostraron que la vacuna funciona adecuadamente contra los genotipos 1 y 4, aunque no se conoce su respuesta hacia el genotipo 3 (Ahmed et al., 2015, Sridhar et al., 2015). Otras vacunas ya han sido reportadas y siguen en fases de experimentación. Algunas de ellas han presentado muy buenos resultados de conversión de anticuerpos después de varias dosis; sin embargo, aún no existen estudios sobre bioseguridad e inmunogenicidad. Se debe continuar investigando las cualidades del virus de hepatitis E para continuar con el desarrollo de una vacuna eficaz para su control.

Como ya se mencionó extensamente, en varios lugares del mundo se han reportado cepas virales comunes en cerdos y en humanos. Este antecedente, junto con el hecho de que se han reportado casos de hepatitis por el VHE en humanos después de ingerir carne cruda de animales salvajes, resalta la importancia de realizar estudios epidemiológicos tanto en humanos como en porcinos que puedan ser determinantes para controlar la transmisión zoonótica del virus.

La presencia del VHE en cerdos representa un problema de salud y de seguridad de alimentos. Por consiguiente, es importante desarrollar métodos que permitan una detección rápida y sensible del virus en poblaciones porcinas y los productos derivados de estos para consumo. El estudio de la relación entre estos virus y sus interacciones con los hospederos contribuirá a entender los mecanismos que

utilizan para causar daño hepático y persistencia. En este proyecto se propone estudiar la presencia del virus de hepatitis E en muestras provenientes de cerdos destinados al consumo humano utilizando métodos moleculares de diagnóstico que permitan la genotipificación para establecer la relación genética entre ellos mismos y secuencias reportadas en humanos; así mismo, la publicación de nuevos genomas del VHE pueden ser de ayuda para el estudio de la evolución molecular y su presencia en México.

### **1.3 JUSTIFICACIÓN**

El diagnóstico del virus de hepatitis E en las producciones porcinas no se realiza debido a que este virus no representa un problema de salud aparente, sin embargo, la presencia del VHE en las piaras puede representar un problema de salud en humanos debido a que algunos genotipos son zoonóticos.

### **1.4 HIPÓTESIS**

La detección molecular y la obtención de genomas completos del virus de hepatitis E permite identificar el/los genotipo(s) que circulan en poblaciones de cerdos en México.

### **1.5 OBJETIVOS**

#### **1.5.1 GENERAL**

Demostrar la presencia del virus de hepatitis E y llevar a cabo la caracterización molecular completa a partir de muestras de cerdos provenientes de diferentes etapas productivas en granjas, de rastros y puntos de venta de hígados para consumo humano.

#### **1.5.2 PARTICULARES:**

1. Identificar el genoma del VHE en muestras de hígado, bilis y heces de cerdos.
2. Obtener el genoma completo del VHE por secuenciación de nueva generación de muestras positivas.
3. Establecer la relación genética entre virus reportados en México y secuencias reportadas en diversas regiones del mundo.

## 1.6 MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología (BSL2) del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### 1.6.1 Muestreo

Con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de la infección se utilizó la fórmula de Cannon y Roe (1982), con un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 5% (Cannon and Roe, 1982). El cálculo se realizó con la fórmula  $n = (1 - (1 - a)^{1/D}) (N - (D - 1) / 2)$ . La muestra de estudio se calculó de acuerdo a lo reportado en el año 2013 por Cantú-Martínez y colaboradores, quienes encontraron una prevalencia del 19% (Cantú-Martínez et al., 2013). El número que se obtuvo de muestras a recolectar por Estado fue un mínimo de 16.

Inicialmente se realizó un muestreo de hígados en puntos de venta sin conocimiento del origen de las muestras, con la finalidad de estandarizar la prueba; los cuales fueron transportados en refrigeración y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La primera muestra se obtuvo el día cinco de febrero del 2015 en el mercado de Culhuacán, al sur de la Ciudad de México. El segundo hígado se obtuvo de una carnicería en Topilejo el día 17 de febrero del mismo año.

Posteriormente, de acuerdo a lo recomendado por la Dra. Margarita Martín de la Universidad de Barcelona (comunicación personal) y reportado por de Deus y colaboradores (2008), el muestreo se realizó en rastro con la finalidad de obtener muestras de bilis y heces del mismo animal o lote de donde deriven la muestra de hígado (de Deus et al., 2008). Así mismo se tomó una muestra de agua para descartar la posible contaminación por este medio. Se realizó un muestreo en cuatro rastros obteniendo muestras de dos Estados diferentes (cuadro 1) hasta que se encontró una muestra positiva.

Cuadro 1. Muestras de cerdos obtenidas en rastro hasta diciembre del 2015.

<b>No.</b>	<b>Rastro</b>	<b>Fecha</b>	<b>Muestras obtenidas</b>
<b>1</b>	Temamatla, Estado de México (cerdos procedentes de Jalisco)	27 de octubre	16 hígados 16 bilis 5 heces de corral 2 heces de intestino 1 agua de barril (con órganos)
<b>2</b>	Medellin, Veracruz (cerdos procedentes de Veracruz)	18 de noviembre	16 hígados 16 bilis 16 heces de intestino 1 heces de corral 1 agua de llave
<b>3</b>	Cardel, Veracruz (cerdos procedentes de Veracruz)	19 de noviembre	16 hígados 16 bilis 16 heces de intestino 1 agua de llave
<b>4</b>	Xalapa, Veracruz (cerdos procedentes de Veracruz)	20 de noviembre	16 hígados 16 bilis 16 heces de intestino 1 agua de llave

Finalmente se realizó un muestreo en una granja de ciclo completo ubicada en Jilotepec, Estado de México. Se tomaron 30 muestras de hisopo rectal en cada etapa de producción (lechones de maternidad, destete, gestación y engorda) así como cinco muestras de cerdas de reemplazo y cinco muestras de sementales. Los hisopos se colocaron en crioviales con 1 ml de DMEM y se transportaron en refrigeración hasta ser almacenados a -70 °C.

Por otra parte, se aprovechó una necropsia realizada con fines educativos por terceras personas no involucradas en el proyecto, a 8 cerdos de la misma granja de aproximadamente 12 a 14 semanas de edad para obtener muestras de bilis, hígado y heces (en intestino) de los mismos animales. Es relevante mencionar que estos

animales fueron seleccionados por ser considerados “de retraso” debido al bajo peso que presentaban de acuerdo a la edad que tenían.

Para el procesamiento de las muestras se realizaron mezclas de trabajo (pools). El cuadro 2 explica cómo se agruparon las muestras.

Cuadro 2. Muestras obtenidas de cerdos de granja.

<b>ID del pool</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Procedencia</b>
<b>G1 (gestación)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>G2 (gestación)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>G3 (gestación)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>D1 (destete)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>D2 (destete)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>D3 (destete)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>E1 (engorda)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>E2 (engorda)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>E12 (engorda 12 semanas de edad)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>M1 (maternidad)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>M2 (maternidad)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>M3 (maternidad)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>R (reemplazos)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>S (sementales)</b>	Hisopo rectal	10	Granja
<b>H1</b>	Hígado	3	Necropsia
<b>H2</b>	Hígado	4	Necropsia
<b>H3</b>	Hígado	1	Necropsia
<b>B1</b>	Bilis	4	Necropsia
<b>B2</b>	Bilis	4	Necropsia
<b>C1</b>	Heces	4	Necropsia
<b>C2</b>	Heces	4	Necropsia

### 1.6.2 Estandarización de PCR

Debido a la falta de una prueba diagnóstica estandarizada en el país se realizó una revisión bibliográfica de los procedimientos de extracción y PCR utilizados por diferentes autores a partir de diversos productos cárnicos del cerdo y otras especies, para garantizar la función de la metodología a falta de un control positivo. La información se encuentra resumida en el cuadro 3.

Cuadro 3. Técnicas de extracción de ácidos nucleicos utilizadas en diversos estudios a partir de distintos tipos de muestras.

Referencia	Método de Extracción	Control del Material	Proceso	Tipo de PCR
<b>Di Bartolo, 2015</b>	SALCHICHAS -infectan con control -buffer de lisis, lisis del tejido, centrifugación 5000 xg 20 min, RNAeasy Midi Kit (Quiagen)	-Norovirus Murino 1 -Adenovirus (control)	-Buffer de lisis (RLT) -tissue lyser -RNAeasy Midi Kit (Quiagen)	-Tiempo Real
<b>Martin-Latil, 2014</b>	PRODUCTOS CRUDOS DE HÍGADO -3g homogenizados en 30 ml de agua destilada, incubación 10 min temp ambiente, filtrado agregar cloroformo:butanol 1:1, incubar 5 min, centrifugado a 8000 g 15 min 4°C, decantar sobrenadante y agregar 10% (wt/vol= polietilenglicol 6000 y 0.3 NaCl, incubar 2h a 4°C y centrifugar a 8000 g por 30 min a 4°C, quedarse con la pastilla reconstituirla con 3 microl NucliSens easy MAG buffer de lisis. Extracción en plataforma Nuclisens easyMAG	-Norovirus murino 1	-Agua destilada- -Stomache apparatus (Fisher Bioblock) -cloroformo -butanol - polietilengly col -NucliSens easyMAG	Tiempo Real

<b>Wilhelm, 2014</b>	HÍGADOS -pesado asépticamente y picado finamente -se pone en tubo de 15 ml con lysing matrix D ceramic beads y 5b ml de buffer de lisis, se le agrega el calicivirus felino, homogenizar en fastprep, centrifugar a 3000g por 10 min, pasar sobrenadante a tubo estéril y centrifugar a 5000g por 10 min. Seguir protocolo de RNAeasy mini kit pero hacer un segundo paso de elución con el agua libre de RNAsas	-Calicivirus felino -Calicivirus porcino entérico y rotavirus (prueba diagnóstica)	-lysing matrix D ceramic beads -buffer de lisis del kit RNAeasy mini kit - homogeniz ador - kit RNAeasy mini kit	Tiempo Real y punto final (Onestep Qiagen)
<b>Widén, 2014</b>	HÍGADOS DE RATA -se corta el hígado y la superficie fresca se raspa con un hisopo que se coloca en 850 ml de TE-Buffer, se extrae con magnatrix		-TE-Buffer -magnatrix	
<b>Forgách, 2010</b>	HÍGADO -homogenizar en mortero con arena de cuarzo y diluir en 10 ml de buffer de fosfatos, centrifugar a 1500g por 10 min, cambiar el sobrenadante a tubo estéril nuevo, centrifugar a 12000 g por 15 min, extraer con QIAamp viral RNA mini kit		QIAamp viral RNA mini kit	Punto final (Onestep Qiagen)
<b>De Deus, 2007.</b>	HÍGADO, SUERO, HECES -extracción con el procedimiento de fenol-cloroformo (Rio et al., 2010) *modificación: agregar 1 µl de glicógeno al sobrenadante recuperado antes de agregar el isopropanol.	VHE	Fenol Cloroformo Glicógeno Isopropanol Etanol	Semi-nested (ampli Taq gold DNA polymerase, Applied)

\*(Di Bartolo et al., 2015, Martin-Latil et al., 2014, Wilhelm et al., 2014, Widen et al., 2014, Forgách et al., 2010, de Deus et al., 2007a).

A partir de la información recabada y el material y equipo disponible en el Laboratorio de Virología se realizó una estandarización del proceso de extracción y RT-PCR punto final comenzando con las muestras obtenidas en los rastros. En un inicio, como control del proceso de extracción se utilizó el virus de Diarrea Viral Bovina debido a su disponibilidad en el laboratorio. Los protocolos probados fueron los siguientes:

1. Se descongeló la muestra a 37 °C, se colocaron 2 g en un tubo de 50 ml y se agregó 30 ml de agua destilada estéril, 500 µl de PBS 100 U de Nistatina, 0.8 g de arena estéril y 60 µl de virus de Diarrea Viral Bovina (NADL/DVB); se mezcló en un vibromezclador durante dos minutos y se centrifugó a 18,000 rpm durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se guardó en alícuotas a -20 °C. La extracción de ARN se realizó con el kit Quiamp RNA Viral siguiendo las recomendaciones del fabricante. La PCR se realizó con el protocolo (anidado) y los “iniciadores” reportados por Huang y colaboradores (2002) y los “iniciadores” que se utilizan en el laboratorio de diagnóstico de virología para DVB. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo con el kit RT-PCR OneStep de Quiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante con la modificación de la cantidad, optimizando cada muestra a 12 µl (Huang et al., 2002). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: para la primera RT-PCR: 50° C por 30 min; 95° C por 15 min, 35 ciclos de: 50° C por 30 min para la transcripción reversa, 94° C por 2 min, 55 ° C o 56.5° C o 57.7° C (gradiente) por 30 s, 72° C por 1.5 min; 72° C por 10 min; para la segunda PCR (anidada): 95° C por 9 min, 39 ciclos de: 1 min 94° C, 1 min 54° C, 1 min 72° C; 72° C por 7 min. Se comprobó la viabilidad viral por medio de una PCR para DVB.
2. Posterior a la obtención de un control positivo (donación del producto de amplificación del protocolo de Deus) se probó el protocolo (semi-anidado) descrito por de Deus y colaboradores (2007) (de Deus et al., 2007a). Se probaron

dos tipos de extracción: la técnica de fenol-cloroformo con glicógeno y la extracción mediante el uso de columnas con el kit comercial QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen). La PCR se realizó con el kit RT-PCR OneStep de Quiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante con la modificación de la cantidad, optimizando cada muestra a 12 µl y con una dilución 1/100 de los “pools” de las muestras.

3. Ya estandarizado el diagnóstico se utilizó un segundo protocolo de PCR reportado anteriormente para la obtención de un segmento más grande del genoma; el mencionado anteriormente en el punto 1 y descrito por Huang y colaboradores (2002) con el diseño de “iniciadores” basados en zonas conservadas del ORF2 en secuencias virales de muestras provenientes de humanos en EE. UU. y la cepa de cerdos considerada prototipo en EE.UU. (Huang et al., 2002). Se utilizó la extracción con fenol cloroformo, la RT-PCR se realizó con el kit SuperScript® Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) (en 12 µl) y el PCR con el kit Platinum Taq DNA Polimerasa (Invitrogen # 10966-018), siguiendo el protocolo reportado por el autor.

Finalmente, el diagnóstico se estandarizó de la siguiente manera:

**Extracción:** las muestras obtenidas de heces e hígados se maceraron con 1 ml de DMEM en ambiente estéril. Se almacenaron las alícuotas a -70 hasta su uso. La extracción de ARN se realizó por el método de fenol-cloroformo de la siguiente forma: se adicionaron 700 µl de Trizol y se incubó por 10 minutos a 4° C, posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo puro y se agitó en un vibromezclador durante 15 segundos. Enseguida se incubó a 4°C durante 10 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4° C. El sobrenadante se depositó en otro microtubo y se adicionó 1 volumen igual de isopropanol para ser incubado 12 horas a 4° C. Se realizó una centrifugación a 12,000 rpm durante 10 min a 4° C y una vez separado el ARN se lavó la pastilla con 200 µl de etanol al 70% mediante una centrifugación a 12,000 rpm por 10 min a 4° C. Una vez seca la pastilla se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O DEPC (0.1%) (Rio et al., 2010).

**RT-PCR:** se utilizó el kit OneStep RT-PCR de Quiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante, optimizando los reactivos a 14 µl y siguiendo el protocolo de Deus (semi-anidado) F1 5'-TTVGGGCTYCTYGACTTTGC-3', R1 5'-CCRCCRAGAAGYGTATCAGC-3' y R2 5'-CCRCGRCCCACCTCACCAAC-3') y/o Huang (F1 5'-AATTATGCCTCAGTAYCGRGTTG-3', R1 5'-CCCTTRTCYTGCTGMGCATTCTC-3', F2, 5'-GTWATGCTYTGCATWCATGGCT-3' y R2 5'-AGCCGACGAAATCAATTCTGTC-3')(de Deus et al., 2007b, Huang et al., 2002). El control positivo de RT-PCR fue un producto de amplificación del protocolo de Deus (2007) de 216 pb, amablemente donado por la Dra. Marga Martin en la Universidad de Barcelona. Posteriormente la primera muestra positiva fue utilizada como control positivo utilizando el protocolo de Huang (2002) de 348 pb. La transcripción reversa se realizó usando SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) se usó para la PCR siguiendo las instrucciones del kit utilizando 10 µL de DNAc.. El producto de 216 pb del protocolo de Deus se amplificó utilizando las siguientes condiciones: a 95 ° C durante 9 min, y 39 ciclos a 94° C durante 1 min y a 72° C durante 2 min, seguido de un ciclo final a 72° C por 7 min. Posteriormente la primera muestra positiva fue utilizada como control positivo utilizando el protocolo de Huang (2002) de 348 pb. La transcripción reversa se realizó usando SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando “random primers” que contiene el kit para el paso de transcripción reversa. El protocolo fue el siguiente: se colocaron 5 µl de ARN de la muestra y se agregó 1 µl de “random primers”, 1 µl de buffer de alineación y 5 µl de agua inyectable. La mezcla se dejó incubar a 65° C por 5 min y se colocó inmediatamente en hielo por 2 min. A cada tubo se le agregaron 10 µl de la mezcla de reacción y 2 µl de mix de enzima. Las muestras se colocaron en el termociclador y se sometieron 10 min a 25° C, 50° C por 50 min y 85° C por 5 min. Finalmente se colocaron en hielo para enfriar y se almacenaron a -20° C o se continuó la PCR. El kit Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) se usó para la PCR siguiendo las instrucciones para el kit y los “iniciadores” y condiciones reportados

por el Dr. Meng utilizando un PCR anidado con dos sets de iniciadores degenerados bajo las siguientes condiciones: 95° C por 9 min, 39 ciclos de 94° C por 1 min y 72° C por 2 min; con un ciclo final de 72° C por 7 min.

**Electroforesis.** Los productos de amplificación se visualizan en un gel de agarosa al 1.5% separados por medio de electroforesis en una cámara horizontal a 90 volts durante una hora, colocando 5 µl de la muestra con 2 µl de buffer de carga (6X de Fermentas) y con un marcador de pares de bases de 50 o 100 pb (Fermentas).

**Secuenciación.** Las muestras positivas que presentaron un amplicón del tamaño deseado se seleccionan para purificar. La purificación se llevó a cabo en un “E-Gel SizeSelect” (Invitrogen #G661012) utilizando la cámara “E-Gel Electrophoresis System”. Posteriormente se enviaron a secuenciar por el método de “Sanger” a la unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) utilizando ambos iniciadores (forward y reverse)

### **1.6.3 Análisis de las secuencias**

La edición de las secuencias se realizó con el programa BioEdit para transformar a formato fasta y obtener la secuencia consenso de los dos sentidos. El alineamiento se llevó a cabo con el programa MEGA7, utilizando el algoritmo “ClustalW” para el alineamiento de las secuencias de nucleótidos. Los árboles filogenéticos se realizaron calculando el modelo más adecuado a utilizar dependiendo de los datos. Se utilizó el genoma de *Orthohepevirus A* sub-genotipo 2 como “outgroup” y el modelo de Maximum Likelihood con un soporte estadístico de 1000 bootstrap para soportar las ramas y confirmar la relación entre las secuencias.

### **1.6.4 Secuenciación de nueva generación**

Se seleccionaron 5 muestras (dos de heces C1 y C5, dos de hígado H2 y H3 y una de bilis B1), de acuerdo a su concentración de ARN, para el análisis metagenómico y la obtención de secuencias completas del virus de hepatitis E. Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM, Cuernavaca, Morelos) las cuales se analizaron con la plataforma Illumina

NextSeq500 de 2x75, con inserto de 300 pb y una profundidad de 10 millones de lecturas y una pre-selección con perlas poli T.

Para cada muestra, se realizó un análisis previo al proceso con el programa cutadapt (1.11) para eliminar adaptadores y lecturas más pequeñas. Posteriormente, las lecturas duplicadas se eliminaron con Cd-Hit\_dup con un valor del 100% (-e 0,03), y las lecturas únicas se mapearon al 90% de identidad con BMap v36.99 contra un genoma de referencia HEV (GenBank AF060669.1), eliminando las regiones con calidad inferior a 15. Los parámetros utilizados para BMap fueron trimq = 15, minid = 0.9, sam = 1.3. Se usaron lecturas de aciertos para obtener una secuencia consenso usando Samtool 1.3.1 y bcftools (1.3.1); que se verificó manualmente para corregir posibles errores.

Con el fin de verificar el genoma obtenido, se usó NCBI BLAST (2.8.5.0) ([//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) con un BLAST de nucleótidos estándar para asegurar que la secuencia obtenida coincidiera solo con las secuencias del VHE (Zhang et al., 2000). Posteriormente, la anotación de proteínas se realizó con la herramienta ExPASy para la traducción ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) y la detección de los tres marcos de lectura abiertos (ORF).

Se descargaron todas las secuencias completas disponibles del genoma del VHE en GenBank hasta enero de 2018 para el genotipo 3 (154), así como al menos una secuencia de referencia para los genotipos 1, 2, 4-7. Se utilizó el programa CD-Hit 4.6.8 para eliminar secuencias con > 98% de similitud (-c .98) dejando un total de 100 secuencias de referencia (anexo 1). La alineación de las secuencias consenso y de referencia se realizó con Clustal W (parámetros por defecto) y se verificó manualmente usando Mega7.

El análisis filogenético del genoma completo se infirió mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR con una distribución Gamma discreta, seleccionado como el mejor modelo de ajuste y valores de bootstrap de 1000 repeticiones. El análisis involucró 101 secuencias de nucleótidos de 6.299

nucleótidos de longitud. Las secuencias se identificaron por país (primeras dos letras), huésped (HM = humano, CD = cerdo, DE = venado), genotipo (g 1-7), subgenotipo si estaba identificado (ak), número de acceso del GenBank y año de colección.

Con respecto al análisis de la proteína de la cápside, las secuencias se obtuvieron a partir de las mismas referencias que para el análisis completo del genoma. El árbol filogenético fue inferido por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR con una distribución Gamma discreta, seleccionado como el mejor modelo de ajuste y con valores de Bootstrap de 1000 repeticiones. El análisis involucró 102 secuencias nucleotídicas de 1861 nucleótidos de longitud.

### **1.6.5 Análisis de cápside**

La cápside cristalizada se descargó del sitio web Protein Data Bank (PDB). La cápside 3HAG reportada (PDB DOI: 10.2210/pdb3hag/pdb) se seleccionó con base en la mejor resolución (3,5 Å) y la homología más cercana a nuestra secuencia (93,65%). La alineación de la secuencia de aminoácidos se realizó con Clustal Omega 1.2.2 para identificar mutaciones. Se eliminaron los fragmentos de la secuencia para que coincidieran con la estructura cristalina reportada y se analizaron las diferencias entre las dos secuencias de aminoácidos.

### **1.6.6 Análisis de recombinación**

Se buscaron eventos de recombinación utilizando el programa RDP4 con todas las secuencias del genoma completo reportadas en el GenBank. Los algoritmos analizados fueron: GENECONV, BootScan, MaxChi, CHIMAERA, SIScan y 3Seq. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Todos los demás parámetros se establecieron como configuraciones predeterminadas de RDP. Solo eventos estadísticamente significativos sobre cuatro programas se tomaron en cuenta para el análisis de recombinación (Martin et al., 2015).

## **1.7 RESULTADOS**

### 1.7.1 Estandarización de PCR

De las diferentes técnicas utilizadas, la que produjo mejores resultados fue la técnica fenol-cloroformo descrita anteriormente en la sección de material y (Rio et al., 2010).

En el caso de la RT-PCR los protocolos con los que se obtuvieron muestras positivas fueron el descrito por de Deus y colaboradores (2007) y el descrito por Huang y colaboradores (2002), los cuales se describen en la sección de material y métodos (de Deus et al., 2007a, Huang et al., 2002).

La figura 9 muestra un gel de agarosa donde se separaron los productos de amplificación de la PCR por electroforesis, se observan el control positivo de 212 pb, así como el control negativo.

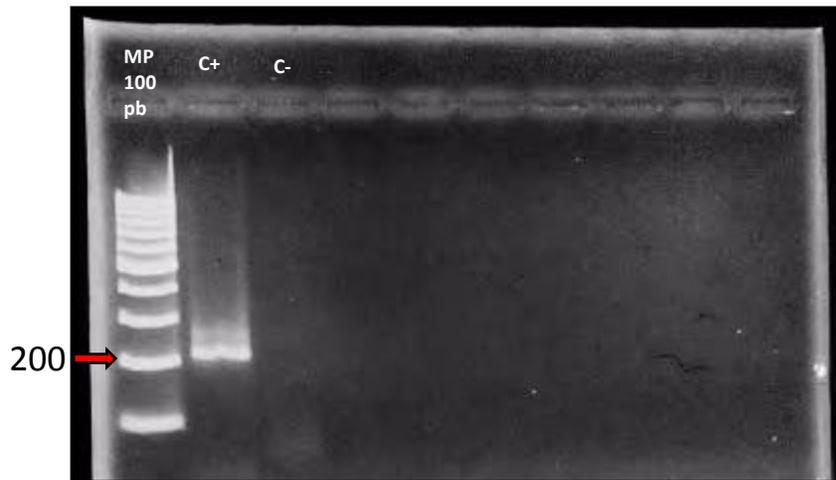


Figura 9. Gel de agarosa mostrando el producto de amplificación por RT- PCR del control positivo separado por electroforesis. Flecha que muestra una banda del tamaño esperado de 212 pb.

Posteriormente, con la detección de la primera muestra positiva se utilizó el protocolo reportado por Huang y colaboradores con la finalidad de obtener una secuencia de mayor longitud. El protocolo se encuentra previamente descrito en la sección de material y métodos (Huang et al. 2002).

La figura 10 muestra un gel de agarosa donde se separaron los productos de amplificación de la PCR por electroforesis, como se observa la muestra obtenida del rastro de Cardel, Veracruz fue positiva. Se observaron amplicones en ambas rondas del PCR anidado, a pesar de que en la primera no se contaba con control.

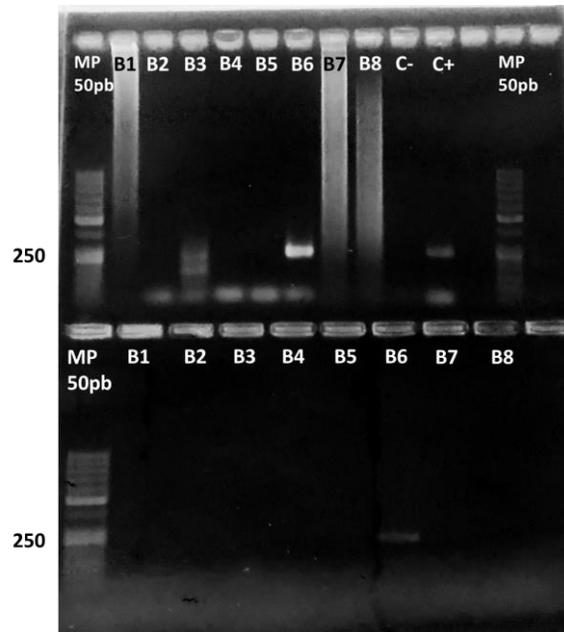


Figura 10. Gel de agarosa con las muestras del POOL1 de bilis proveniente del rastro municipal Cardel, Veracruz. Carril superior izquierdo con una muestra positiva al virus de hepatitis E (VHE). Primera ronda de RT-PCR anidado; la muestra B6 presenta un amplicón positivo. Carril inferior, segunda ronda de PCR con el amplicón de la muestra B6 del tamaño esperado (212 pb).

### 1.7.2 PCR

De las 185 muestras procesadas de rastro, solo 1 bilis fue positiva (0.54%). De los 21 pools de muestras de granja, 14 resultaron positivos (66.66) pertenecientes a diferentes etapas de producción. Los resultados se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Resultados obtenidos por RT-PCR para la detección del virus de hepatitis E (VHE) de muestras de hígado, bilis y heces de cerdos.

<b>ID</b>	<b>No. de muestras</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Muestras positivas por RT-PCR</b>
1.1	16	Hígado	Rastro	<b>N</b>
1.2	16	Bilis	Rastro	<b>N</b>
1.3	7	Heces	Rastro	<b>N</b>
2.1	16	Hígado	Rastro	<b>N</b>
2.2	16	Bilis	Rastro	<b>N</b>
2.3	16	Heces	Rastro	<b>N</b>
3.1	16	Hígado	Rastro	<b>N</b>
3.2	16	Bilis	Rastro	<b>P</b>
3.3	16	Heces	Rastro	<b>N</b>
4.1	16	Hígado	Rastro	<b>N</b>
4.2	16	Bilis	Rastro	<b>N</b>
4.3	16	Heces	Rastro	<b>N</b>
G1	10	Heces	Granja	<b>P</b>
G2	10	Heces	Granja	<b>N</b>
G3	10	Heces	Granja	<b>P</b>
D1	10	Heces	Granja	<b>P</b>
D2	10	Heces	Granja	<b>P</b>
D3	10	Heces	Granja	<b>P</b>
E1	10	Heces	Granja	<b>N</b>
E2	10	Heces	Granja	<b>P</b>
E12	10	Heces	Granja	<b>P</b>
M1	10	Heces	Granja	<b>N</b>
M2	10	Heces	Granja	<b>P</b>
M3	10	Heces	Granja	<b>N</b>
R	10	Heces	Granja	<b>N</b>
S	10	Heces	Granja	<b>N</b>

H1	3	Hígado	Granja	<b>P</b>
H2	4	Hígado	Granja	<b>P</b>
H3	1	Hígado	Granja	<b>P</b>
B1	4	Bilis	Granja	<b>P</b>
B2	4	Bilis	Granja	<b>P</b>
C1	4	Heces	Granja	<b>P</b>
C2	4	Heces	Granja	<b>N</b>

P=positivo, N=negativo.

Es relevante mencionar que la muestra H3 corresponde a un hígado que se trabajó de manera independiente ya que mostraba lesiones macroscópicas severas: la superficie hepática era lisa y pulida, de color café violáceo; se observó cirrosis y necrosis multifocal y fibrosis moderada a nivel hilar.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas por la secuenciación tipo Sanger de amplicones positivos utilizando el protocolo de Huang *et al.*, se alinearon y se construyó un árbol filogenético con estas secuencias parciales de la cápside (MXCDg3\_E2|2016, MXCDg3\_E12|2016, MXCDg3\_H2|2016, MXCDg3\_B1|2016, MXCDg3\_B6|2015). Las secuencias obtenidas ya se encuentran disponibles con número de acceso en el GenBank (MF116409, MF116410, MF116411, MF116412, la muestra B6 no tuvo la longitud necesaria para el GenBank).

El análisis filogenético (figura 11) comprobó que las secuencias obtenidas se agruparon con el genotipo 3 previamente reportado en México y separadas del genotipo 2 que ha sido reportado en México, pero solo en humanos.

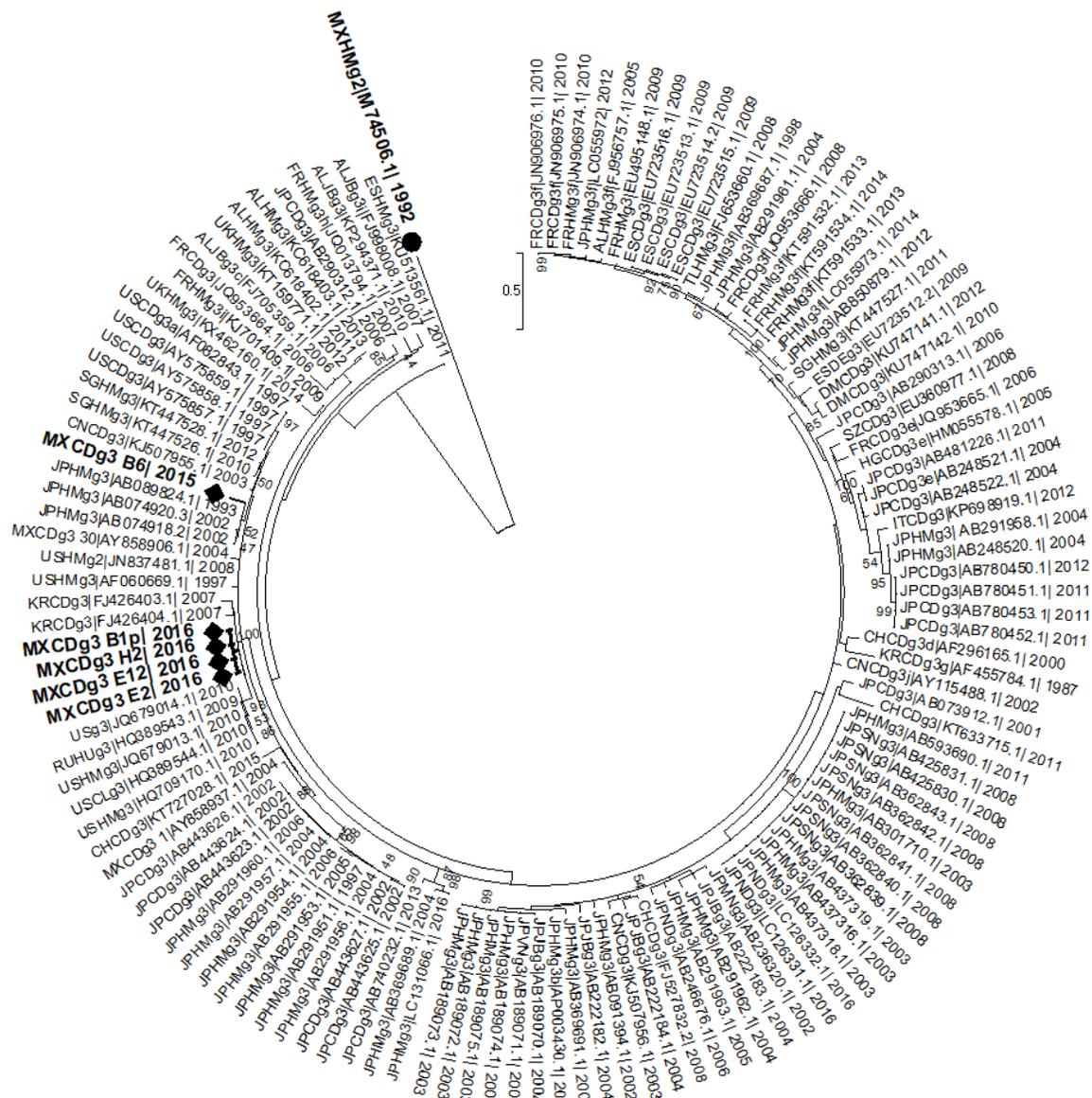


Figura 11. Árbol filogenético basado en secuencias parciales de la cápside (ORF2) del virus de hepatitis E. Se incluyeron 169 secuencias parciales para el análisis; incluyendo las encontradas en este estudio (rombo negro). La inferencia evolutiva se realizó con el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo de Tamura-Nei con una distribución gamma discreta y valores permisibles para regiones invariables, con valores de bootstrap de 1000 repeticiones. Los triángulos negros indican agrupación de secuencias, para facilitar la visualización. Cada secuencia

esta identificada por país (primeras dos letras), huésped, subgenotipo, número de acceso y año de muestreo.

### 1.7.3 Secuenciación de nueva generación

Entre las muestras positivas se seleccionaron cinco de diferente tipo para el análisis de secuenciación masiva de acuerdo a su alta concentración y calidad de ARN (B1, C3A, H2, H3, C5A). Se realizó una cobertura de 10X para el total de las muestras sometidas y no por muestra individual; lo cual disminuyó la cantidad de “reads” recibidos. Al observar la calidad de los archivos recibidos fue evidente un alto número de secuencias repetidas no específicas (poliGs); por lo cual después de filtrar y eliminar duplicados el número total de “reads” útiles quedó por debajo de lo deseado (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis del número de “reads” recibidos y “reads” útiles tras filtración de mala calidad.

<b>Muestra</b>	<b>Pair end</b>	<b>Single read</b>	<b>Total</b>	<b>Duplicados/Mala calidad</b>	<b>Promedio de pérdida</b>	<b>Reads útiles</b>
<b>B1</b>	277561	162996	440557	283972	64.45%	156585
<b>C3A</b>	423695	133462	557157	246418	44.22%	310739
<b>H2</b>	438987	170444	609431	354689	58.20%	254742
<b>H3</b>	133462	945536	1369028	1156313	84.46%	212715
<b>C5A</b>	212711	59352	272063	119772	44.02%	152291

El análisis de los “reads” útiles para la identificación de secuencias virales mostró que el rendimiento para la obtención de secuencias virales fue significativamente bajo, siendo la muestra H3 la que tuvo el menor porcentaje de secuencias virales (0.04%) y la muestra B1 la mayor cantidad (2.73%). La figura 12 muestra la clasificación de los “reads” obtenidos para las 5 muestras.

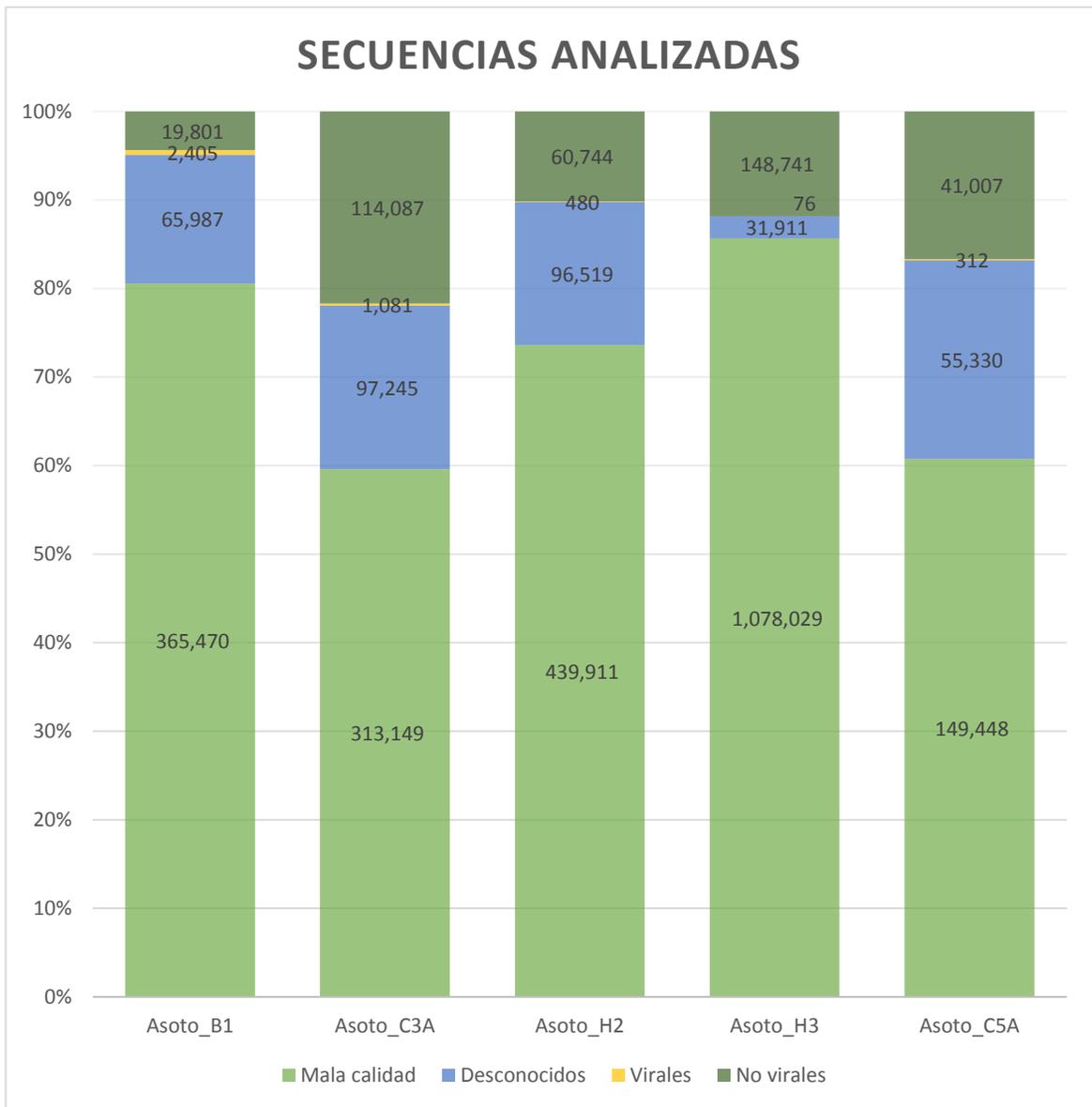


Figura 12. Clasificación de los “reads” obtenidos para las 5 muestras de cerdo (B1, C3A, H2, H3 y C5A) de acuerdo a la calidad y distribución en mala calidad, desconocidos, virales y no virales.

De las cinco muestras analizadas, solo en tres encontramos virus de hepatitis E: B1, C3A y H2. De éstas tres muestras, la de bilis presentaba el mayor número de “reads” y la menor variedad de genomas virales como se muestra en la figura 13; y fue a partir de ésta que se pudo obtener el genoma completo del virus. A partir de

las muestras H2 y C3A se obtuvieron secuencias parciales del genoma cubriendo más del 50% del genoma (2,446-7,223 para C3A y 5,771-7,223 para H2).

Se realizó un árbol filogenético a nivel nucleotídico con todos los genomas completos reportados en el GenBank hasta enero del 2018 (figura 13), la secuencia completa encontrada en este estudio (MXCDg3\_B1c|2016) y las dos parciales de mayor longitud (New|MXCDg3\_H2cons|2016, New|MXCDg3\_C3Acons|2016).

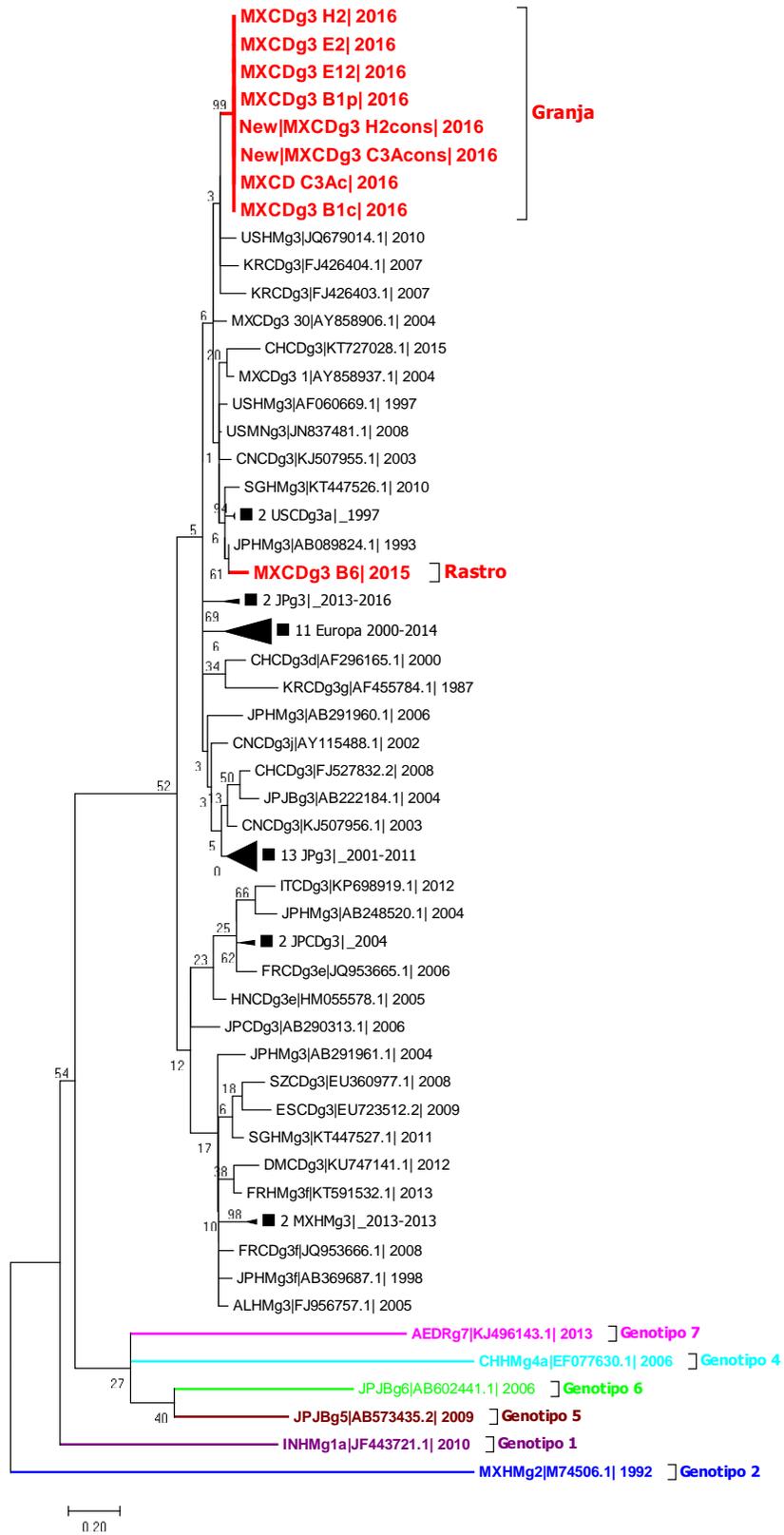


Figura 13. Árbol filogenético que incluye secuencias completas y parciales (ORF2) del virus de hepatitis E. Se incluyeron 79 secuencias parciales en total para el análisis (CD-HIT 95%); incluyendo las parciales encontradas en este estudio. La inferencia evolutiva se realizó con el método de Máxima Verosimilitud, modelo de Tamura-Nei con distribución gamma discreta y valores permisibles para regiones invariables; con valores de Bootstrap de 1000 repeticiones. Los triángulos negros indican agrupación de secuencias, para facilitar la visualización.

La caracterización del virus al alinearlo con secuencias que presentaban alta similitud (98%) comprobó la longitud de los ORFs 1, 2 y 3 que fue de 5.127 nt, 1.982 nt y 368 nt, respectivamente. Específicamente, la figura 14 muestra la posición de los 3 marcos de lectura abiertos, así como, las diferentes proteínas que se identificaron en el ORF1 de acuerdo a las reportadas previamente (Bi et al., 1993, Meng et al., 1998, Aye et al., 1992).

Con la anotación descrita anteriormente, se realizó el análisis de las secuencias de aminoácidos de cada uno de los marcos de lectura abierta (ORFs1-3) para descartar la posibilidad de recombinaciones. La figura 15 muestra la comparación de los tres árboles filogenéticos que se obtuvieron de las proteínas.

El genoma completo MXCDg3\_B1c|\_2016 se analizó usando blastn para identificar la similitud de la secuencia con secuencias del virus de hepatitis E reportadas. Para caracterizar el genoma, se realizó un BLAST entre las referencias obtenidas. La secuencia completa del genoma MXCDg3\_B1c | \_2016 compartía una alta identidad de nucleótidos con las secuencias de referencia del genotipo 3 (cuadro 6). La mayor identidad de nucleótidos del 91% se mostró con secuencias aisladas de humanos y cerdos en EE. UU., Canadá, Japón y el Reino Unido. Las identidades del ORF 1, 2 y 3 fueron 91%, 92% y 98% para nucleótidos, y 98%, 99% y 98% a nivel de aminoácidos, respectivamente. Las identidades de nucleótidos de MXCDg3a\_B1c | \_2016 con genotipo 1, genotipo 2 (cepa mexicana) y genotipo 4 fueron del 77%, 77% y 78%, respectivamente.

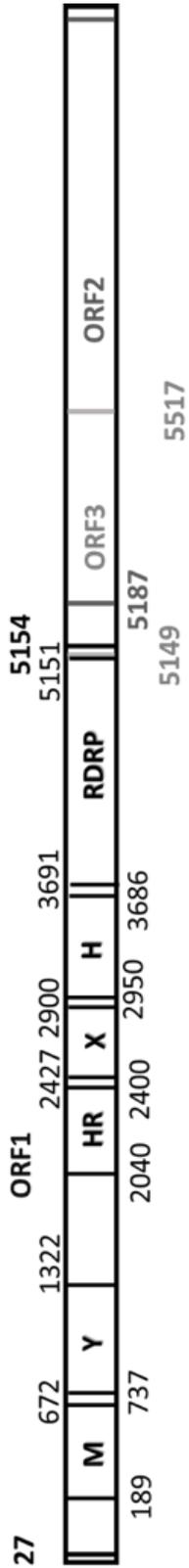


Figura 14. Representación esquemática y anotación de la secuencia genómica del virus de hepatitis E, cepa MXCDg3\_B1c|2016. La secuencia completa de 7,241 nucleótidos consiste en 5'UTR de 27 nt (1-27), ORF 1 de 5,120 nt (27-5147), ORF 2 de 1,979 nt (5185-7164), ORF 3 de 365 nt (5147- 5512) y un UTR3' de 77 nt (7164-7251).

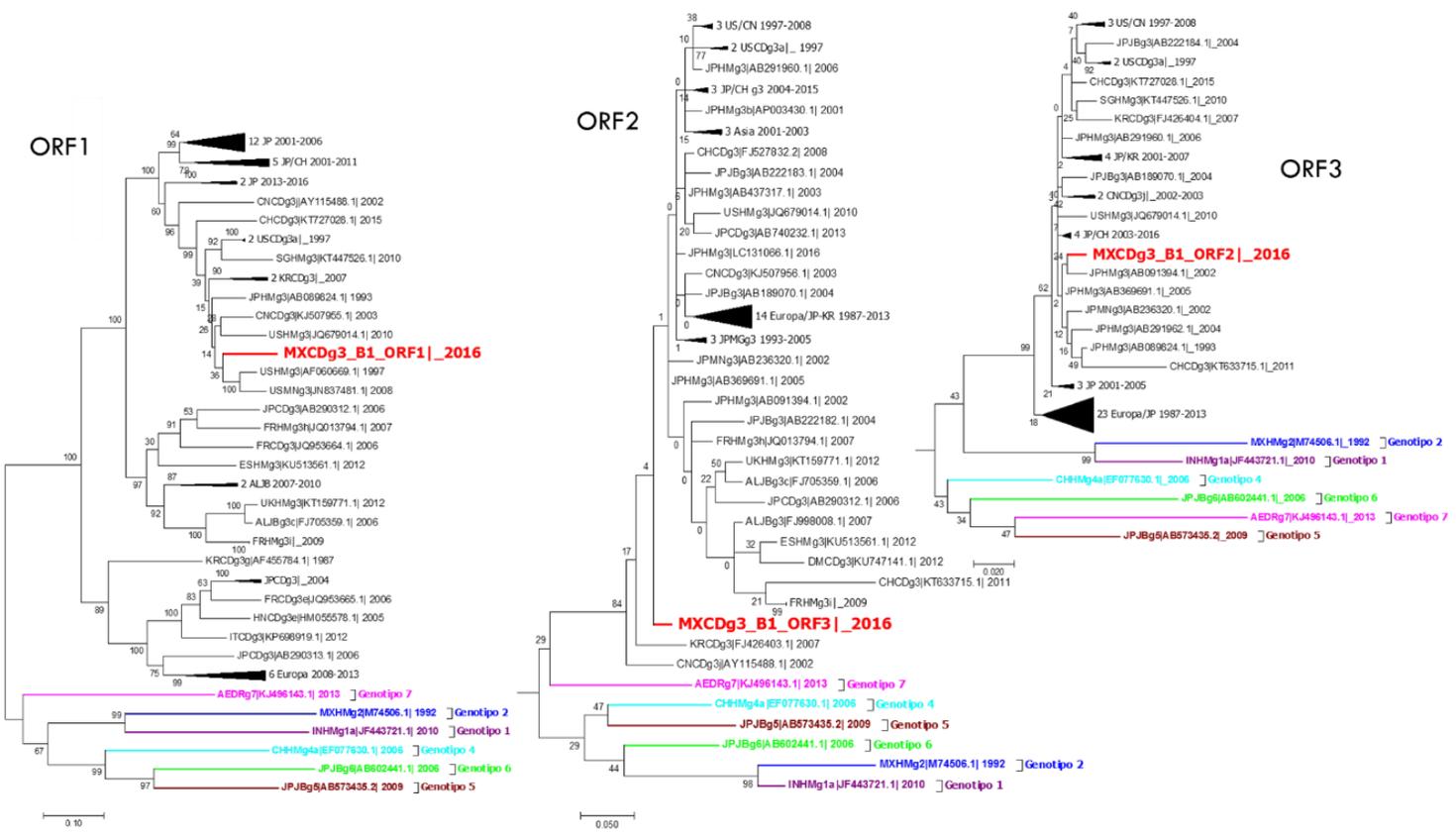


Figura 15. Árboles filogenéticos basados en secuencias de aminoácidos de los tres marcos de lectura abiertos del virus de hepatitis E. La secuencia encontrada en este estudio está indicada con color rojo.

Cuadro 6. Porcentaje de similitud de nucleótidos y aminoácidos de la secuencia del VHE porcino MXCDg3\_B1c|\_2016 con secuencias completas de genoma de diversos genotipos recuperados del GenBank con más del 75% de similitud con estos.

ID	Genoma Completo % (nt)	ORF1		ORF 2		ORF 3	
		% (nt)	% (aa)	% (nt)	% (aa)	% (nt)	% (aa)
USHM AF060669.1 g3a _1998	91	90	97	92	98	98	98
JPHM AB089824.1 g3 _1993	91	90	98	92	98	96	98
USHM JQ679014.1 g3 _2010	91	90	97	92	98	96	98
USCD AY575857.1 g3 _1997	91	90	98	92	98	96	98
USMN JN837481.1 g3 _2008	91	90	97	92	99	97	97
JPHM AB074920.3 g3 _2002	91	90	98	92	99	98	98
JPHM AB074918.2 g3 _2002	91	90	98	93	99	98	98
CNCD KJ507955.1 g3 _2003	90	90	98	92	98	97	99
KRCD FJ426403.1 g3 _2007	90	90	96	93	97	96	98
KRCD FJ426404.1 g3 _2007	90	89	96	92	98	97	98
SGHM KT447526.1 g3 _2010	90	89	97	91	98	96	96
USHM JQ679013.1 g3 _2010	90	90	93	92	98	94	97
CHCD KX981911.1 g3 _2015	89	89	96	91	98	97	98
CNCD AY115488.1 g3 _2002	87	86	95	90	98	96	98
JPHM AB091394.1 g3 _2002	87	86	97	89	99	97	97
JPCD AB740232.1 g3 _2013	87	86	96	89	98	96	98
JPHM LC131066.1 g3 _2016	87	86	96	90	99	96	96
JPHM AB437317.1 g3 _2003	87	86	97	89	99	97	96
JPHM LC176492.1 g3k _2015	87	86	96	90	98	96	96
JPHM AB369689.1 g3 _2004	87	86	96	90	99	97	97
JPHM AB291963.1 g3 _2005	87	86	96	90	98	95	93
JPJB AB222184.1 g3 _2004	87	86	96	88	98	96	96
JPMN AB236320.1 g3 _2002	87	86	97	89	98	97	97
JPJB AB222182.1 g3 _2004	87	86	96	89	98	96	96
CNCD KJ507956.1 g3 2003	87	86	97	89	98	96	93
JPJB AB222183.1 g3 _2004	87	86	97	89	98	96	93
JPCD AB073912.1 g3 _2001	87	86	96	89	98	96	96
JPJB AB189070.1 g3 _2004	87	85	96	89	98	96	96
JPHM AB437319.1 g3 2003	87	91	97	89	99	96	95
JPHM AB291960.1 g3 _2006	86	86	97	89	98	96	95
JPHM AB291952.1 g3 _2005	86	86	97	88	99	97	96

JPHM AB369691.1 g3 _2005	86	86	97	89	99	98	96
JPHM AP003430.1 g3 _2001	86	86	96	88	98	97	98
JPHM AB291962.1 g3 _2004	86	85	96	89	98	96	97
CHCD FJ527832.2 g3 _2008	86	86	96	88	98	97	98
JPND AB246676.1 g3 _2006	86	85	97	89	98	99	93
ALJB FJ998008.1 g3 _2007	85	84	96	87	99	95	94
CHCD FJ610232.1 G4 _2008	78	79	85	81	93	87	85
TWHM HQ634346.1 G4 _2010	78	78	86	81	94	90	88
CHCD KC692453.1 G4 _2011	78	78	85	80	94	88	86
EACM KJ496143.1 g7 _2013	78	78	87	80	92	87	80
CHCD GU119960.2 G4a _2009	78	77	85	81	94	89	88
JPJB AB573435.2 G5 _2009	78	77	84	80	91	86	80
CDCH GU206559.1 G4 _2008	78	79	85	81	92	86	85
INHM JF443724.1 G1 _2005	77	77	82	80	92	85	82
CHHM NC_001434.1 G1 _1987	77	77	82	80	92	85	82
CHHM JQ655734.1 G1 _2012	77	77	82	79	91	86	82
MXHM M74506.1 g2 _1992	76	77	81	79	91	85	80
JPWB AB602441.1 g6 _2006	76	NS	83	79	91	84	73

\*NS. No similarity found

#### 1.7.4 Análisis de la cápside

El cuadro 7 muestra sustituciones de aminoácidos en la secuencia de la cápside en comparación con secuencias del genotipo 3 previamente reportadas. Las secuencias de cápside de MXCDg3\_B1c|\_2016 y MXCDg3\_C3Acons|\_2016 mostraron 100% de similitud.

Cuadro 7. Sustituciones de aminoácidos identificadas en la secuencia MXCDg3\_B1c|\_2016 y MXCDg3\_C3Acons|\_2016 en comparación con otras secuencias del genotipo 3 disponibles. Los colores indican el tipo de mutación entre las secuencias encontradas en este estudio (MXCDg3\_B1c|\_2016/MXCDg3\_C3Acons|\_2016) y la secuencia cristalizada 3HAG: cian para aminoácidos con la misma propiedad, verde para aminoácidos de propiedades diferentes y rojo para aminoácidos distintos.

Posición de aminoácidos	MXCDg3_B1c _2016/ MXCDg3_C3Acons _2016	3HAG	Proteína cristalizada
114	A	S	NC
146	S	T	C
147	V	I	C
149	S	T	NC
161	S	N	C
162	S	P	C
200	N	S	C
264	T	S	C
324	T	S	C
326	T	S	C
330	R	K	C
335	A	P	C
360	G	D	NC
426	T	A	C
435	D	E	C
500	L	F	C
509	A	G	C
511	A	S	C
537	Y	F	C
575	A	P	NC
580	A	C	C
587	S	N	C
590	A	S	NC
593	T	V	NC

**NC, no cristalizada; C, cristalizada.**

La figura 16 muestra la estructura terciaria de la proteína de la cápside con sus tres dominios de manera lineal y los dos encontrados en la forma cristalizada. Las mutaciones encontradas en nuestras secuencias en comparación con la 3HAG cristalizada se identifican con diferentes colores: cian para aminoácidos con la misma propiedad, verde para aminoácidos de propiedades diferentes y rojo para aminoácidos distintos. Los epítomos antígenicos lineales están marcados en magenta.

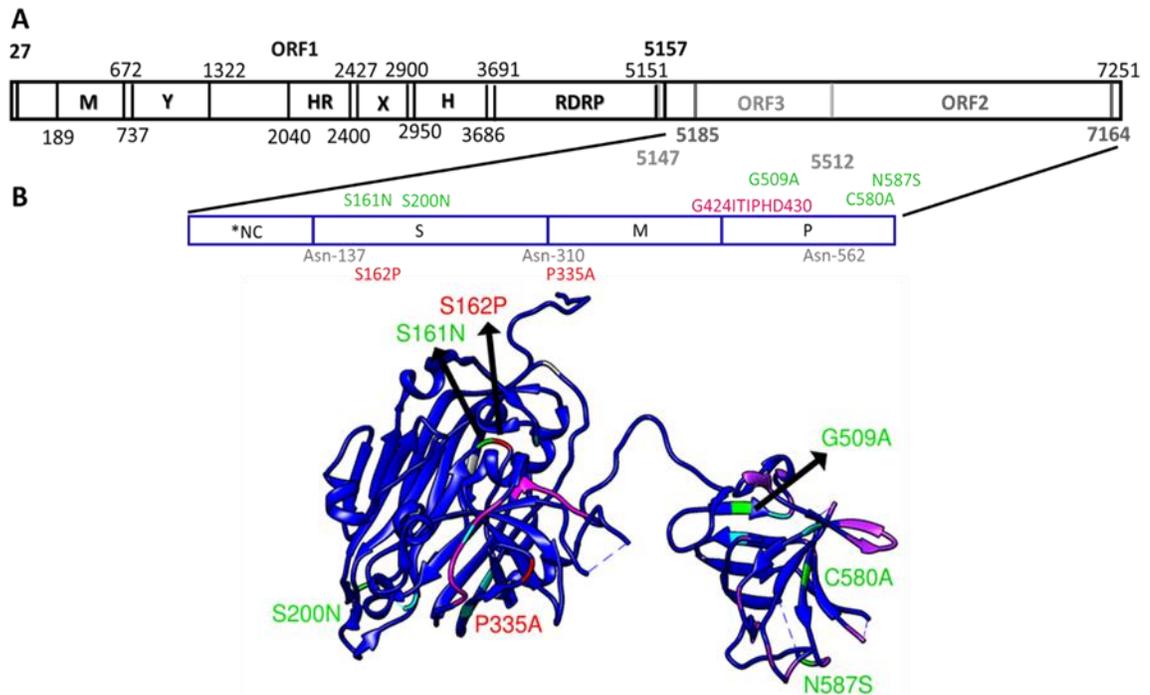


Figura 16. Representación gráfica de la secuencia completa MXCDg3\_B1c | \_2016 y análisis de la proteína de cápside. A. Secuencia completa de 7,241 nucleótidos. B. Análisis de cápside que indica mutaciones en la cápside cristalizada 3HAG; 660 aa que codifican 3 dominios definidos en la estructura cristalina: S (carcasa), M (medio) y P (que sobresalen) compuestos por los restos de aa 118-313, 314-453 y 454-606, respectivamente. Las mutaciones se identifican por diferentes colores: cian para aa con la misma propiedad, verde para aminoácidos de propiedades diferentes y rojo para aminoácidos distintos. Los epítomos antigénicos están etiquetados en magenta.

### 1.7.5 Análisis de recombinación

Los eventos de recombinación se buscaron con el programa RDP4 entre todas las secuencias recuperadas del GenBank. El análisis demostró por medio de los diferentes modelos matemáticos que la secuencia no presentaba eventos de recombinación.

## 1.8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este es el primer informe que presenta una caracterización completa del genoma del virus de la hepatitis E en México. Generar información de esta naturaleza es importante para caracterizar genéticamente los virus que circula en cerdos en diferentes etapas de producción en granjas en el país. La disponibilidad de nuevas tecnologías permitió obtener un genoma completo del virus de hepatitis E a partir de una muestra derivada de un cerdo; lo cual permitió obtener información de subgenotipo, lo que hubiera sido más complicado y laborioso con la secuenciación tipo Sanger que inicialmente se utilizó para los amplicones parciales obtenidos originalmente.

La secuencia completa del genoma del virus de hepatitis E identificada como MXCDg3\_B1c|\_2016 se obtuvo de la bilis de un cerdo ubicado en una granja de producción en México. Se utilizó como herramienta la secuenciación de nueva generación utilizando la plataforma NextSeq 500 Illumina. La secuencia del genoma de la cepa MXCDg3\_B1c|\_2016 fue de una longitud de 7241 nt, excluyendo la cola poliA. Al igual que otros *Orthohepevirus*, comprendía 3 marcos de lectura abiertos bordeados por regiones 5' y 3' no traducidas. Las longitudes de los ORFs 1, 2 y 3 fueron de 5147 nt, 1979 nt y 365 nt, respectivamente. También se obtuvieron dos secuencias parciales identificadas como: MXCDg3a\_H2cons|\_2016 de 1473 nt y MXCDg3a\_C3Acons|\_2016 de 4777 nt, ambas comprendiendo el extremo 3' del genoma. Este es el primer informe de un genoma completo del genotipo HEV 3 en México.

Los resultados del muestreo realizado en cuatro rastros (64 muestras totales de hígado, bilis y heces) identificaron solo una muestra positiva de bilis (0.54%). Un estudio anterior realizado en Nuevo León, México, reportó secuencias del VHE en carnicerías con 22.5% de resultados positivos, pero en nuestro estudio no se identificaron muestras positivas de hígado en los rastros (Cantu-Martinez et al., 2013). Un estudio realizado en Brasil que analizó 118 cerdos clínicamente asintomáticos encontró dos muestras de hígado (1.7%) y una muestra de bilis

(0.84%) positivas (Gardinali et al., 2012). Estos reportes concuerdan con nuestros resultados, tal vez debido al diseño del estudio y el procedimiento de muestreo empleado. Muchos estudios han señalado que el contacto con carne y órganos de cerdo crudos en los rastros es un factor de riesgo laboral (Forero et al., 2017, Galiana et al., 2008, Di Bartolo et al., 2012, Casas et al., 2011, Bansal et al., 2017). Específicamente, se reportó un caso en el que un trabajador de un rastro en España, sin otros factores de riesgo, presentó un caso agudo por el VHE relacionado exclusivamente con su ocupación (Galiana et al., 2008). De acuerdo con nuestros resultados, el factor de riesgo ocupacional para los trabajadores del rastro parece ser mínimo, ya que solo se encontró una muestra positiva proveniente de rastro (B6).

Según el estudio realizado por Casas et al., (2011) el muestreo de heces (hisopos rectales) lo realizaron en una granja porcina de ciclo completo para evaluar el riesgo zoonótico de las personas que trabajan o tienen contacto con cerdos, un factor de riesgo que se ha informado en varios estudios (Casas et al., 2011, Bansal et al., 2017, Perez-Gracia et al., 2007, Prpic et al., 2015). En el presente estudio se colectaron muestras de hígado, bilis y heces de 8 animales que fueron sacrificados por motivos ajenos al proyecto de la misma granja. De los 21 grupos de muestras analizados, dos provenientes de cerdos en la etapa de engorda fueron altamente positivos. Estos hallazgos coinciden con reportes previos que identifican el pico de eliminación del virus en la doceava semana de edad (Casas et al., 2011). Sin embargo, algunas muestras de cerdos en las etapas de gestación, parto y maternidad también resultaron positivas, lo que indica que el virus circula en todas las etapas de producción. Entre las muestras de la granja, el 66,66% resultaron ser positivas. Debido a que este es el primer análisis de RT-PCR realizado en cerdos de granja en México, no se pueden discutir los valores en comparación. No obstante, valores de seroprevalencia han sido reportados en algunos estudios. Un estudio realizado en granjas porcinas en diferentes áreas de México reveló una seroprevalencia de IgG contra el VHE del 42.7% en el área central del país (Garcia-

Hernandez et al., 2017). Otro estudio, realizado por Merino Ramos *et al.* (2016) que involucro 9 Estados en la región del centro del país, encontró una seroprevalencia de 30.75% (Merino-Ramos et al., 2016).

Todas las muestras obtenidas por necropsia fueron positivas, a excepción de una muestra de heces. El análisis de secuencias de los amplicones confirmó la presencia del virus, aunque con ligeras variaciones entre los nucleótidos y la secuencia del VHE encontrada en la muestra de bilis del rastro. Es importante señalar que todos los cerdos fueron seleccionados para el sacrificio con fines didácticos y fueron especialmente seleccionados debido a la reducción en el aumento de peso en comparación con otros cerdos de la misma etapa. El VHE no se ha asociado directamente con ninguna manifestación clínica en los huéspedes porcinos que pueda afectar los parámetros económicos. Sin embargo, se han reportado algunos casos específicos que muestran alta morbilidad y mortalidad, cuando se encontró el VHE junto con otros virus porcinos patógenos conocidos, como circovirus porcino 2 (PCV-2) y virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), los cuales son comunes en las granjas porcinas mexicanas (Yang et al., 2015, Mao et al., 2013).

El análisis filogenético mostró que el virus se agrupó con secuencias previamente reportadas del genotipo 3, subgenotipo a. Las secuencias reportadas de este genotipo han sido asociadas a casos de hepatitis aguda en humanos en los EE. UU. (GenBank AF060669.1) y Japón (GenBank AB089824), así como, en cerdos de China (GenBank KT727028). Las secuencias reportadas en los EE. UU. (HEV-US1, HEV-US2) fueron las primeras identificadas como genotipo 3 debido a su baja homología con las cepas de Birmania (genotipo 1) y México o genotipo 2 (73.5% - 74.5%). Estas cepas fueron aisladas de dos pacientes humanos con hepatitis aguda (Erker et al., 1999). El genotipo 3a se ha reportado recientemente en Colombia (Forero et al., 2017). Es posible que esta cepa sea la que circule en cerdos en América, aunque la falta de estudios no permite confirmar esta idea.

En cuanto al estudio sobre mutaciones en la cápside viral de las secuencias encontradas, se han descrito epítomos lineales para la proteína de la cápside del VHE en las posiciones G438IVIPHD444 e Y457DNQH461, aunque también se han identificado en I#IP#D y YD#QH (Wang et al., 2017). Estos dos motivos han sido reportados para el genotipo 4, pero se conservan en todos los genotipos y virus pertenecientes al género *Orthohepevirus* B. La secuencia de la cápside que reportamos presenta estos epítomos conservados con solo un cambio en un residuo (T por V) G424ITIPHD430, mientras que la secuencia de la proteína cristalizada 3HAG presenta en la misma posición que nuestra secuencia un cambio (A por V) G424IAIPHD430. Los aminoácidos Leucina (L), alanina (A) y treonina (T) son alifáticos y debido a que los aminoácidos en la misma serie tienen estructuras y características similares, asumimos que la mutación no causa cambios significativos en la estructura. Sin embargo, la mutación encontrada en P335A es estructuralmente cercana a este epítomo y si podría afectar la conformación estructural. Los epítomos lineales pueden reconocerse por anticuerpos neutralizantes y pueden producir una respuesta antiviral efectiva (Simanavicius et al., 2018).

Tres sitios de N-glicosilación han sido informados previamente para la secuencia consenso N-X-S/T (X, cualquier aminoácido excepto prolina) en la cápside del VHE. Estos sitios se han encontrado en Asn-137, Asn-310 y Asn-562, pero su importancia biológica no ha sido determinada. Las mutaciones encontradas en nuestra secuencia no afectaron a ninguno de estos sitios (Guu et al., 2009, Zafrullah et al., 1999). Sin embargo, las mutaciones encontradas en S161N, S162P están ubicadas estructuralmente cerca de Asn-137, aunque no es posible concluir si esto podría afectar la estructura 3-D. N137 está parcialmente oculto cerca de la superficie interna de la cubierta de la cápside y N310 está completamente oculto, lo que sugiere que la glicosilación en cualquier sitio es poco probable, sin embargo la posición N562 al estar expuesta podría representae un sitio potencial de glicosilación (Guu et al., 2009).

Aunque el VHE ha sido confirmado como causante de una enfermedad zoonótica, ha recibido poca atención en México. No hay pruebas de diagnóstico disponibles públicamente para cerdos o humanos, por lo que los casos clínicos están subestimados. Este es también el caso de otros países del continente Americano que actualmente están definiendo la importancia de esta infección (Forero et al., 2017, Munne et al., 2014, Mirazo et al., 2018, Nantel-Fortier et al., 2016). La vigilancia del VHE porcino es útil para evaluar el riesgo potencial de infección zoonótica del VHE en humanos (Di Profio et al., 2016). Nuestros hallazgos del VHE en cerdos a nivel de granja confirman la eliminación del virus en diferentes etapas, lo que sugiere un riesgo ocupacional para los trabajadores relacionados a la producción porcina, por lo que es necesario implementar medidas de bioseguridad para evitar la posible transmisión zoonótica. Algunos autores sugieren que la diferencia en la edad de inicio o diseminación de la infección puede ser el resultado de la cantidad y/o calidad del calostro que los lechones reciben con anticuerpos maternos. Además, la duración de eliminación viral en las granjas podría verse influenciada por otros patógenos; por ejemplo, un estudio demostró que la coinfección entre PRRSV/VHE extendió drásticamente el período de eliminación en un factor de 5 (Salines et al., 2015). Enfermedades como PRRS y CP2 son comunes en las piaras en México y podrían estar contribuyendo a la diseminación del virus dentro de la misma granja.

Por el contrario, los hallazgos en rastro podrían considerarse afortunados ya que solo se encontró una muestra de bilis positiva. Este resultado podría representar una limitación de este estudio en el sentido de que se carecía de un método de muestreo más estandarizado, especialmente para muestras de hígado, donde solo se utilizaba una pequeña fracción (2 g) de tejido para la extracción de ARN. Sin embargo, es un hallazgo positivo que indica un bajo riesgo de transmisión zoonótica ocupacional y de origen alimentario. La ausencia del virus en las muestras de hígado y heces aparentemente indica que el virus se elimina antes de que los cerdos lleguen al punto de venta. Se necesita más información sobre la presencia del virus

en la cadena de suministro de alimentos y se deben considerar los factores de riesgo al diseñar estrategias para prevenir la contaminación en la cadena alimentaria.

En el presente trabajo se cumplió con el objetivo de obtener una secuencia del genoma completo del virus de hepatitis E proveniente de muestras de cerdo de una granja destinada a la comercialización de carne en México. La información generada sobre el genotipo 3 del VHE brinda información sobre la situación de la infección en el país. Las secuencias están disponibles públicamente y ayudarán a desarrollar diagnósticos más específicos que proporcionarán una visión más amplia de esta infección.

## **1.9 ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS**

VHE: virus de hepatitis E

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

NGS: por sus siglas en inglés “Next Generation Sequencing”

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, Transcripción Reversa

Nt: nucleótidos

VHA: virus de hepatitis A

VHB: virus de hepatitis B

VHC: virus de hepatitis C

VHD: virus de la hepatitis D

VHG: virus de hepatitis G

OMS: Organización Mundial de la Salud

ET-NANB: por sus siglas en inglés “enterically transmitted non-A, non-B”

IEM: Inmunoelctromicroscopía

ORF: por sus siglas en inglés “Open Reading Frame”

RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN

RE: retículo endoplásmico

NFkB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

ASGPR: asialoglicoproteína

EE. UU: Estados Unidos de América

SUIVE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica

SPGs: proteoglicanos de heparán sulfato

HIV: virus de inmunodeficiencia humana

CP: circovirus porcino

PRRS: síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo

ELISA: del inglés “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”

LAMP: por sus siglas en inglés “loop-mediated isothermal amplification”

hESC: células embrionarias humanas

hiPSC: hepatocitos derivados de células madre pluripotentes

FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

IBT: Instituto de Biotecnología

## **1.10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

<http://www.senasica.gob.mx/?IdNot=2210>

[Online].

Available:

<http://www.senasica.gob.mx/?IdNot=2210>.

- AGGARWAL, R. 2013. Hepatitis e: epidemiology and natural history. *J Clin Exp Hepatol*, 3, 125-33.
- AHMAD, I., HOLLA, R. P. & JAMEEL, S. 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res*, 161, 47-58.
- AHMED, A., ALI, I. A., GHAZAL, H., FAZILI, J. & NUSRAT, S. 2015. Mystery of hepatitis e virus: recent advances in its diagnosis and management. *Int J Hepatol*, 6, 872431.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C., SANCHEZ-ANGUIANO, L. F. & HERNANDEZ-TINOCO, J. 2014a. Hepatitis E virus exposure in pregnant women in rural Durango, Mexico. *Ann Hepatol*, 13, 510-7.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C., SANCHEZ-ANGUIANO, L. F. & HERNANDEZ-TINOCO, J. 2014b. Seroepidemiology of hepatitis e virus infection in general population in rural durango, Mexico. *Hepat Mon*, 14, e16876.
- 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, 103-8.
- ALVAREZ, M., TORRES, J., DAMASIO, L., GÓMEZ, A., TAPIA, R. & MUÑOZ, O. 1999. Sero-epidemiology of Hepatitis E virus infection in Mexican subjects 1 to 29 years of age. *Arch Med Res*, 30, 251-4.
- ANANG, S., SUBRAMANI, C., NAIR, V. P., KAUL, S., KAUSHIK, N., SHARMA, C., TIWARI, A., RANJITH-KUMAR, C. T. & SURJIT, M. 2016. Identification of critical residues in Hepatitis E virus macro domain involved in its interaction with viral methyltransferase and ORF3 proteins. *Sci Rep*, 6, 25133.
- BANSAL, M., KAUR, S., DEKA, D., SINGH, R. & GILL, J. P. S. 2017. Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E virus infection in swine and occupationally exposed workers in Punjab, India. *Zoonoses Public Health*, 64, 662-672.

- BAYLIS, S. A., BLÜMEL, J., MIZUSAWA, S., MATSUBAYASHI, K., SAKATA, H., OKADA, Y., NÜBLING, C. M., HANSCHMANN, K.-M. O. & THE, H. E. V. C. S. G. 2013. World Health Organization International Standard to Harmonize Assays for Detection of Hepatitis E Virus RNA. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 729-735.
- BEHRENDT, P., STEINMANN, E., MANNS, M. P. & WEDEMEYER, H. 2014. The impact of hepatitis E in the liver transplant setting. *Journal of hepatology*, 61, 1418-1429.
- BERNAL REYES, R. & LICONA SOLIS, J. E. 1996. [Seroepidemiology of hepatitis E in the State of Hidalgo]. *Rev Gastroenterol Mex*, 61, 233-8.
- 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. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1842-1853.
- CANNON, R. & ROE, R. T. 1982. *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians*, Australian Government Publishing Service.
- CANTÚ-MARTÍNEZ, M. A., ROIG-SAGUÉS, A. X., CEDILLO-ROSALES, S., ZAMORA-ÁVILA, D. E. & ÁVALOS-RAMÍREZ, R. 2013. Detección molecular del virus de la hepatitis E en hígados de cerdo destinados al consumo humano en el estado de Nuevo León, México. *salud pública de méxico*, 55, 193-195.
- 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 micro*, 148, 27-34.
- COLSON, P., COZE, C., GALLIAN, P., HENRY, M., DE MICCO, P. & TAMALET, C. 2007. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerging infectious diseases*, 13, 648.
- CONTROL, C. F. D. 1987. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis--Mexico. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 36, 597.
- COOPER, K., HUANG, F., BATISTA, L., RAYO, C., BEZANILLA, J., TOTH, T. & MENG, X. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1684-1688.
- CHANDRA, V., TANEJA, S., KALIA, M. & JAMEEL, S. 2008. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci*, 33, 451-64.
- DALTON, H. R., BENDALL, R. P., KEANE, F. E., TEDDER, R. S. & IJAZ, S. 2009. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *New England Journal of Medicine*, 361, 1025-1027.
- DE DEUS, N., CASAS, M., PERALTA, B., NOFRARIAS, M., PINA, S., MARTIN, 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.
- DE DEUS, N., SEMINATI, C., PINA, S., MATEU, E., MARTÍN, M. & SEGALÉS, J. 2007b. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Veterinary microbiology*, 119, 105-114.
- DEBING, Y., GISA, A., DALLMEIER, K., PISCHKE, S., BREMER, B., MANN, M., WEDEMEYER, H., SUNEETHA, P. V. & NEYTS, J. A 2014. Mutation in the Hepatitis E Virus RNA Polymerase Promotes Its Replication and Associates With Ribavirin Treatment Failure in Organ Transplant Recipients. *Gastroenterology*, 147, 1008-1011.e7.
- DI BARTOLO, I., ANGELONI, G., MONINI, M., MAIONE, E., MARRONE, R., OSTANELLO, F. & RUGGERI, F. M. 2015. Complete genome sequencing of a genotype 3 hepatitis E virus strain identified in a swine farm in Italy. *Virus Res*, 211, 89-95.
- DI BARTOLO, I., DIEZ-VALCARCE, M., VASICKOVA, P., KRÁLIK, P., HERNANDEZ, M., ANGELONI, G., OSTANELLO, F., BOUWKNEGT, M., RODRIGUEZ-LAZARO, D., PAVLIK, I. & RUGGERI, F. M. 2012. Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis*, 18, 1282-9.

- DI PROFIO, F., MELEGARI, I., SARCHESE, V., ROBETTO, S., MARRUCHELLA, G., BONA, M. C., ORUSA, R., MARTELLA, V., MARSILIO, F. & DI MARTINO, B. 2016. Detection and genetic characterization of hepatitis E virus (HEV) genotype 3 subtype c in wild boars in Italy. *Archives of virology*, 161, 2829-2834.
- ERKER, J. C., DESAI, S. M., SCHLAUDER, G. G., DAWSON, G. J. & MUSHAHWAR, I. K. 1999. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol*, 80 ( Pt 3), 681-90.
- FORERO, J. E., GUTIERREZ-VERGARA, C., PARRA SUESCUN, J., CORREA, G., RODRIGUEZ, B., GUTIERREZ, L. A., DIAZ, F. J. & LOPEZ-HERRERA, A. 2017. Phylogenetic analysis of Hepatitis E virus strains isolated from slaughter-age pigs in Colombia. *Infect Genet Evol*, 49, 138-145.
- FORGÁCH, P., NOWOTNY, N., ERDÉLYI, K., BONCZ, A., ZENTAI, J., SZŰCS, G., REUTER, G. & BAKONYI, T. 2010. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Veterinary microbiology*, 143, 106-116.
- GALIANA, C., FERNÁNDEZ-BARREDO, S., GARCÍA, A., GÓMEZ, M. T. & PÉREZ-GRACIA, M. T. 2008. Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 78, 1012-1015.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, M. E., CRUZ-RIVERA, M., SANCHEZ-BETANCOURT, J. I., RICO-CHAVEZ, O., VERGARA-CASTANEDA, A., TRUJILLO, M. E. & SARMIENTO-SILVA, R. E. 2017. Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC Vet Res*, 13, 289.
- GARDINALI, N. R., BARRY, A. F., OTONEL, R. 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, 935-9.
- GUERRERO, C. A., BOUYSSOUNADE, D., ZÁRATE, S., IŠA, P., LÓPEZ, T., ESPINOSA, R., ROMERO, P., MÉNDEZ, E., LÓPEZ, S. & ARIAS, C. F. 2002.

- Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *Journal of virology*, 76, 4096-4102.
- GUU, T. S., LIU, Z., YE, Q., MATA, D. A., LI, K., YIN, C., ZHANG, J. & TAO, Y. J. 2009. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12992-7.
- HELSEN, N., DEBING, Y., PAESHUYSE, J., DALLMEIER, K., BOON, R., COLL, M., SANCHO-BRU, P., CLAES, C., NEYTS, J. & VERFAILLIE, C. M. 2016. Stem cell-derived hepatocytes: A novel model for hepatitis E virus replication. *J Hepatol*, 64, 565-73.
- HUANG, F., HAQSHENAS, G., GUENETTE, D., HALBUR, P., SCHOMMER, S., PIERSON, F., TOTH, T. & MENG, X. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1326-1332.
- ICTV. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> [Online]. Available: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- KAMAR, N., DALTON, H. R., ABRAVANEL, F. & IZOPET, J. 2014. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev*, 27, 116-38.
- KASORNDORKBUA, C., GUENETTE, D., HUANG, F., THOMAS, P., MENG, X.-J. & HALBUR, P. 2004. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *Journal of clinical microbiology*, 42, 5047-5052.
- KASORNDORKBUA, C., THACKER, B. J., HALBUR, P. G., GUENETTE, D. K., BUITENWERF, R. M., ROYER, R. L. & MENG, X. J. 2003. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res*, 67, 303-6.
- KELLY, A. G., NETZLER, N. E. & WHITE, P. A. 2016. Ancient recombination events and the origins of hepatitis E virus. *Bmc Evolutionary Biology*, 16.

- KENNEY, S. P. & MENG, X.-J. 2015. Therapeutic targets for the treatment of hepatitis E virus infection. *Expert opinion on therapeutic targets*, 19, 1245-1260.
- KENNEY, S. P., WENTWORTH, J. L., HEFFRON, C. L. & MENG, X. J. 2015. Replacement of the hepatitis E virus ORF3 protein PxxP motif with heterologous late domain motifs affects virus release via interaction with TSG101. *Virology*, 486, 198-208.
- KHUROO, M. S. & KAMILI, S. 2006. Association of severity of hepatitis E virus infection in the mother and vertically transmitted infection in the fetus. *JK Pract*, 13, 70-4.
- KLEVENS, R. M., LIU, S., ROBERTS, H., JILES, R. B. & HOLMBERG, S. D. 2014. Estimating Acute Viral Hepatitis Infections From Nationally Reported Cases. *American Journal of Public Health*, 104, 482-487.
- KNIPE, D., HOWLEY, P., GRIFFIN, D., LAMB, R., MARTIN, M., ROIZMAN, B. & STRAUS, S. 2007. *Fields virology*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA.
- KRAIN, L. J., ATWELL, J. E., NELSON, K. E. & LABRIQUE, A. B. 2014. Fetal and neonatal health consequences of vertically transmitted hepatitis E virus infection. *Am J Trop Med Hyg*, 90, 365-70.
- KUNIHOLM, M. H., ONG, E., HOGEMA, B. M., KOPPELMAN, M., ANASTOS, K., PETERS, M. G., SEABERG, E. C., CHEN, Y., NELSON, K. E. & LINNEN, J. M. 2015. Acute and Chronic Hepatitis E Virus Infection in HIV-Infected United States Women. *Hepatology*, 3, 63.
- MAO, J., ZHAO, Y., SHE, R., XIAO, P., TIAN, J. & CHEN, J. 2013. One case of swine hepatitis E virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection in weaned pigs. *Virology*, 10, 341.
- MARTIN-LATIL, S., HENNECHART-COLLETTE, C., GUILLIER, L. & PERELLE, S. 2014. Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food. *International journal of food microbiology*, 176, 1-8.

- MARTIN, D. P., MURRELL, B., GOLDEN, M., KHOOSAL, A. & MUHIRE, B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol*, 1, vev003.
- MEDRANO, C., BOADELLA, M., BARRIOS, H., CANTÚ, A., GARCÍA, Z., DE LA FUENTE, J. & GORTAZAR, C. 2012. Zoonotic pathogens among white-tailed deer, northern Mexico, 2004–2009. *Emerging infectious diseases*, 18, 1372.
- MENG, X. J. 2005. Hepatitis E as a zoonotic disease. *Viral Hepatitis, Third Edition*, 611-623.
- MERINO-RAMOS, T., MARTIN-ACEBES, M. A., CASAL, J., SAIZ, J. C. & LOZA-RUBIO, E. 2016. Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Antibodies in Mexican Pigs. *Food Environ Virol*, 8, 156-9.
- MESQUITA, J. R., MYRMEL, M., STENE-JOHANSEN, K., ØVERBØ, J. & NASCIMENTO, M. S. J. 2016. A Public Health initiative on hepatitis E virus epidemiology, safety and control in Portugal – study protocol. *BMC Infectious Diseases*, 16, 1-5.
- MIRAZO, S., GARDINALI, N. R., CECILIA, D., VERGER, L., OTTONELLI, F., RAMOS, N., CASTRO, G., PINTO, M. A., RE, V., PISANO, B., LOZANO, A., DE OLIVEIRA, J. M. & ARBIZA, J. 2018. Serological and virological survey of hepatitis E virus (HEV) in animal reservoirs from Uruguay reveals elevated prevalences and a very close phylogenetic relationship between swine and human strains. *Vet Microbiol*, 213, 21-27.
- MUNNE, M. S., ALTABERT, N. R., OTEGUI, M. L., VLADIMIRSKY, S. N., MOREIRO, R., ESPUL, M. P., ESPUL, C., MANZUR, A., SOTO, S. S., BRAJTERMAN, L. S. & GONZALEZ, J. E. 2014. Updating the knowledge of hepatitis E: new variants and higher prevalence of anti-HEV in Argentina. *Ann Hepatol*, 13, 496-502.
- MUSHAHWAR, I. K. 2008. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *Journal of medical virology*, 80, 646-658.

- NANTEL-FORTIER, N., LETELLIER, A., LACHAPELLE, V., FRAVALO, P., L'HOMME, Y. & BRASSARD, J. 2016. Detection and Phylogenetic Analysis of the Hepatitis E Virus in a Canadian Swine Production Network. *Food Environ Virol*, 8, 296-304.
- OKAMOTO, H. 2013. Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol*, 48, 147-58.
- , World Health Organization (WHO) 2010. The global prevalence of hepatitis A virus infection and susceptibility: a systematic review. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/es/>.
- PANDURO, A., ESCOBEDO MELENDEZ, G., FIERRO, N. A., RUIZ MADRIGAL, B., ZEPEDA-CARRILLO, E. A. & ROMAN, S. 2011. [Epidemiology of viral hepatitis in Mexico]. *Salud Pública Mex*, 53 Suppl 1, S37-45.
- PARK, W.-J., PARK, B.-J., AHN, H.-S., LEE, J.-B., PARK, S.-Y., SONG, C.-S., LEE, S.-W., YOO, H.-S. & CHOI, I.-S. 2016. Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. *Journal of Veterinary Science*, 17, 1-11.
- PAS, S. D., STREEFKERK, R. H., PRONK, M., ROBERT, A., BEERSMA, M. F., OSTERHAUS, A. D. & VAN DER EIJK, A. A. 2013. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *Journal of Clinical Virology*, 58, 629-634.
- PAVIO, N., MENG, X.-J. & RENOU, C. 2010a. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.*, 41, 46.
- PEREZ-GRACIA, M. T., GARCIA, M., SUAY, B. & MATEOS-LINDEMANN, M. L. 2015. Current Knowledge on Hepatitis E. *J Clin Transl Hepatol*, 3, 117-26.
- PEREZ-GRACIA, M. T., MATEOS, M. L., GALIANA, C., FERNANDEZ-BARREDO, S., GARCIA, A., GOMEZ, M. T. & MOREIRA, V. 2007. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am J Trop Med Hyg*, 77, 893-6.
- PRPIĆ, J., CERNI, S., SKORIC, D., KEROS, T., BRNIC, D., CVETNIC, Z. & JEMERSIC, L. 2015. Distribution and Molecular Characterization of Hepatitis

- E virus in Domestic Animals and Wildlife in Croatia. *Food Environ Virol*, 7, 195-205.
- PURCELL, R. & EMERSON, S. 2008. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *Journal of hepatology*, 48, 494-503.
- PURCELL, R. H., ENGLE, R. E., GOVINDARAJAN, S., HERBERT, R., ST CLAIRE, M., ELKINS, W. R., COOK, A., SHAVER, C., BEAUREGARD, M., SWERCZEK, J. & EMERSON, S. U. 2013. Pathobiology of hepatitis E: lessons learned from primate models. *Emerg Microbes Infect*, 2, e9.
- REDLINGER, T., O'ROURKE, K., NICKEY, L. & MARTINEZ, G. 1998. Elevated hepatitis A and E seroprevalence rates in a Texas/Mexico border community. *Tex Med*, 94, 68-71.
- 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.
- REYES, G., PURDY, M., KIM, J., LUK, K., YOUNG, L., FRY, K. & BRADLEY, D. 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*, 247, 1335-1339.
- RIO, D. C., ARES, M., HANNON, G. J. & NILSEN, T. W. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010, pdb. prot5439.
- ROGEE, S., TALBOT, N., CAPERNA, T., BOUQUET, J., BARNAUD, E. & PAVIO, N. 2013. New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *J Gen Virol*, 94, 549-58.
- SALEHI, M., KALBASI, N., SALEHI, H., KASSAIAN, N., SALEHI, M., KHORVASH, F. & SALEHI, M. M. 2014. Hepatitis G virus exposure in dialysis patients and blood donors in Isfahan-Iran. *International Journal of Preventive Medicine*, 5, S219-S222.
- SALINES, M., BARNAUD, E., ANDRAUD, M., EONO, F., RENSON, P., BOURRY, O., PAVIO, N. & ROSE, N. 2015. Hepatitis E virus chronic infection of swine

- co-infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Res*, 46, 55.
- SCOBIE, L. & DALTON, H. 2013. Hepatitis E: source and route of infection, clinical manifestations and new developments. *Journal of viral hepatitis*, 20, 1-11.
- SCHLOSSER, J., VINA-RODRIGUEZ, A., FAST, C., GROSCHUP, M. H. & EIDEN, M. 2015. Chronically infected wild boar can transmit genotype 3 hepatitis E virus to domestic pigs. *Vet Microbiol*, 180, 15-21.
- SERRACCA, L., BATTISTINI, R., ROSSINI, I., MIGNONE, W., PELETTO, S., BOIN, C., PISTONE, G., ERCOLINI, R. & ERCOLINI, C. 2015. Molecular Investigation on the Presence of Hepatitis E Virus (HEV) in Wild Game in North-Western Italy. *Food Environ Virol*, 7, 206-12.
- SIMANAVICIUS, M., TAMOSIUNAS, P. L., PETRAITYTE-BURNEIKIENE, R., JOHNE, R., ULRICH, R. G., ZVIRBLIENE, A. & KUCINSKAITE-KODZE, I. 2018. Generation in yeast and antigenic characterization of hepatitis E virus capsid protein virus-like particles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102, 185-198.
- SINGH, M. P., MAJUMDAR, M., GOYAL, K., LAKSHMI, P. V., BHATIA, D. & RATHO, R. K. 2016. Investigation of suspected viral hepatitis outbreaks in North West India. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 84, 309-14.
- SMITH, D. B., IJAZ, S., TEDDER, R. S., HOGEMA, B., ZAAIJER, H. L., IZOPET, J., BRADLEY-STEWART, A., GUNSON, R., HARVALA, H. & KOKKI, I. 2015b. Variability and pathogenicity of Hepatitis E virus genotype 3 variants. *Journal of General Virology*, 96, 3255-3264.
- SMITH, D. B., SIMMONDS, P., IZOPET, J., OLIVEIRA-FILHO, E. F., ULRICH, R. G., JOHNE, R., KOENIG, M., JAMEEL, S., HARRISON, T. J., MENG, X. J., OKAMOTO, H., VAN DER POEL, W. H. & PURDY, M. A. 2016. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol*, 97, 537-42.
- SRIDHAR, S., LAU, S. K. & WOO, P. C. 2015. Hepatitis E: A disease of reemerging importance. *J Formos Med Assoc*, 114, 681-90.

- TAM, A. W., SMITH, M. M., GUERRA, M. E., HUANG, C.-C., BRADLEY, D. W., FRY, K. E. & REYES, G. R. 1991. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 185, 120-131.
- TEDDER, R. S., TETTMAR, K. I., BRAILSFORD, S. R., SAID, B., USHIRO-LUMB, I., KITCHEN, A., MORGAN, D., LATTIMORE, S., TOSSELL, J. & IJAZ, S. 2016. Virology, serology, and demography of hepatitis E viremic blood donors in South East England. *Transfusion*, 1529-36, 56.
- VELAZQUEZ, O., STETLER, H. C., AVILA, C. & ET AL. 1990. EPidemic transmission of enterically transmitted non-a, non-b hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA*, 263, 3281-3285.
- WANG, H., ZHANG, W., GU, H., CHEN, W., ZENG, M., JI, C., SONG, R. & ZHANG, G. 2017. Identification and characterization of two linear epitope motifs in hepatitis E virus ORF2 protein. *PLoS One*, 12, e0184947.
- WEDEMEYER, H., PISCHKE, S. & MANNS, M. P. 2012. Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. *Gastroenterology*, 142, 1388-1397. e1.
- WIDEN, F., AYRAL, F., ARTOIS, M., OLOFSON, A. S. & LIN, J. 2014. PCR detection and analysis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats. *Virol J*, 11, 90.
- WILHELM, B., LEBLANC, D., HOUDE, A., BRASSARD, J., GAGNE, M. J., PLANTE, D., BELLON-GAGNON, P., JONES, T. H., MUEHLHAUSER, V., JANECKO, N., AVERY, B., RAJIC, A. & MCEWEN, S. A. 2014. Survey of Canadian retail pork chops and pork livers for detection of hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus using real time RT-PCR. *Int J Food Microbiol*, 185, 33-40.
- YAMASHITA, T., MORI, Y., MIYAZAKI, N., CHENG, R. H., YOSHIMURA, M., UNNO, H., SHIMA, R., MORIISHI, K., TSUKIHARA, T., LI, T. C., TAKEDA, N., MIYAMURA, T. & MATSUURA, Y. 2009. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12986-91.
- YANG, Y., SHI, R., SHE, R., MAO, J., ZHAO, Y., DU, F., LIU, C., LIU, J., CHENG, M., ZHU, R., LI, W., WANG, X. & SOOMRO, M. H. 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, 77.

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, 4074-82.

ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L. & MILLER, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7, 203-14.

## **2. CAPÍTULO 2**

### **Hepatitis E en Pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez**

Colaboración con el Dr. Francisco Arenas Huertero, director del laboratorio de Patología Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con la cual se generó el artículo:

SEROLOGICAL AND MOLECULAR STUDY OF THE HEPATITIS E VIRUS IN PATIENTS AT THE PEDIATRIC HOSPITAL, FEDERICO GOMEZ, MEXICO

Tayde López-Santaella<sup>1.1</sup>, Teresa Álvarez y Muñoz<sup>1.1</sup>, Mara Medeiros-Domingo<sup>1.2</sup>, Sarbelio Moreno-Espinosa<sup>1.3</sup>, Alejandra Consuelo-Sánchez<sup>1.4</sup>, Onofre Muñoz-Hernández<sup>1.5</sup>, Rosa Elena Sarmiento Silva<sup>2.1</sup>, Alicia Sotomayor-González<sup>2.1</sup>, María Elena Trujillo Ortega<sup>2.2</sup>, Montserrat Elemi García Hernández<sup>2.1</sup>, Blanca Itzel Taboada-Ramírez<sup>3.1</sup>, Gustavo Ulises Martínez Ruíz<sup>4.1</sup>, Francisco Arenas-Huertero<sup>1.1\*</sup>.

El trabajo se envió a la revista “Journal of Clinical Microbiology”, y actualmente se encuentra en revisión.

### **2.1 Introducción**

La hepatitis E es un problema de salud pública en muchos países en desarrollo y una enfermedad emergente en países industrializados (Chen et al., 2012, Srivastava et al., 2007, Aggarwal et al., 2000, Lhomme et al., 2016). Se estima que 3.4 millones de casos sintomáticos de hepatitis E se presentan anualmente, resultando en 70 000 muertes y 3 000 mortinatos (Nan et al., 2017). La infección por el VHE es clínicamente similar a la ocasionada por el virus de la hepatitis A (VHA), con una presentación típica de hepatitis aguda, así mismo ambos se transmiten por vía entérica y tienen períodos de incubación similares. Recientemente se ha reportado en México la coinfección con ambos virus en pacientes con presentación de hepatitis aguda (Realpe-Quintero et al., 2018). Sin embargo, se ha reportado que

en países endémicos; el VHA se reporta más como infección infantil, mientras que, el VHE se reporta más en la adultez temprana. Debido a que clínicamente es imposible de diferenciar ambas infecciones, y que se ha reportado incluso coinfecciones, el diagnóstico para ambos virus debería realizarse en casos de hepatitis aguda.

Clínicamente, la infección ha sido asociada a presentaciones diversas y de mayor gravedad en ciertos grupos susceptibles y se caracteriza por malestar, anorexia, náusea, vómito, ictericia y dolor abdominal (Verghese and Robinson, 2014). Generalmente la presentación clínica de la infección por el virus de hepatitis E puede variar desde asintomática hasta aguda (mortalidad del 1%), o fulminante (20% mortalidad específicamente en mujeres embarazadas) (Wedemeyer et al., 2012, Smith and Simmonds, 2015). La presentación crónica del VHE ha sido descrita y se ha observado en casos de enfermedad hepática subyacente como cirrosis o condiciones inmunosupresoras, con pacientes receptores de trasplantes y con enfermedades virales inmunosupresoras (Kuniholm et al., 2015, Maylin et al., 2012, Mushahwar, 2008, Halac et al., 2012).

Recientemente se ha reportado que la infección en niños es frecuente pero normalmente asintomática y por esta razón, a menudo no se diagnostica (Wedemeyer et al., 2012, Krumbholz et al., 2014). Sin embargo, se han reportado manifestaciones no hepáticas de hepatitis E en niños, las cuales incluyen pancreatitis aguda, hemólisis inmune y trombocitopenia, daño renal y alteraciones neurológicas como síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Parsonage-Turner y parkinsonismo encefalítico agudo (Verghese and Robinson, 2014, Pasha et al., 2018, Belbezier et al., 2018, Blasco-Perrin and Peron, 2018).

Pocos grupos de investigación han reportado datos sobre el VHE en humanos en México, los pocos estudios se enfocan en seroprevalencia y ninguno se ha realizado en niños. Por ejemplo, Álvarez-Muñoz et al. (1999) informaron valores de prevalencia dependientes de la edad de 1.2-15% en un estudio realizado en el Estado de Hidalgo (Alvarez-Muñoz et al., 1999). Sin embargo, la información sobre

la prevalencia del VHE en pacientes pediátricos es escasa y en México no hay estudios que reporten presencia de secuencias virales detectadas por medio de técnicas moleculares. El primer reporte del VHE en México sucedió durante un brote en dos comunidades del Estado de Morelos en 1986, en el cual se asoció la infección con agua contaminada y se reportó por primera vez la identificación del virus tras un análisis molecular que determinó que este era diferente a los previamente reportados y se clasificó como genotipo 2, conocido actualmente como cepa México (Velazquez et al., 1990). Posterior a este reporte no se ha vuelto a identificar el virus en nuestro país.

El presente estudio fue diseñado para determinar la prevalencia de infección por el VHE entre los pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) utilizando las técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA) (inmunoglobulina (Cantu-Martinez et al.) G e IgM) y reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR). En el presente capítulo se describe la parte en la que se colaboró de manera práctica con el estudio para la determinación de la presencia del virus por medio de la técnica de RT-PCR en las muestras analizadas.

## **2.2 Material y métodos**

### **2.2.1 Muestras de pacientes**

Se enviaron al laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 38 muestras de suero provenientes de pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Las muestras pertenecían a pacientes que provenían de las diferentes especialidades del hospital.

### **2.2.2 Extracción de ARN del VHE del suero de los pacientes**

Para la extracción de ARN, se utilizaron 500 µl de suero de cada paciente y la extracción se realizó con el reactivo TRIzol (Ambion / RNA lifetechnologies <sup>TM</sup>)

siguiendo el protocolo de fenol-cloroformo descrito en el capítulo 1 y las instrucciones del fabricante (Rio et al., 2010).

### 2.2.3 PCR semianidada para la amplificación del VHE-ORF2

Para complementar y corroborar los datos previamente obtenidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez con otro protocolo para la detección del VHE; se realizó la detección del virus por medio del protocolo de PCR semianidada que amplifica un fragmento del ORF 2 del VHE descrito por de Deus y colaboradores (2007) mencionado en el capítulo 1 (de Deus et al., 2007b).

### 2.2.4 Secuencias y análisis filogenético

Los productos de PCR esperados de dos muestras se purificaron usando E-Gel Size Select Gels (Thermo Fisher Sc) y fueron secuenciados por el método de Sanger en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) en ambos sentidos para obtener una secuencia consenso.

Las secuencias de nucleótidos se editaron con BioEdit y se analizaron mediante MEGA7. El análisis involucró 40 secuencias de nucleótidos, incluidas las cepas de referencia propuestas por Smith et al. (2016) para cada genotipo y subgenotipo. Las secuencias se identificaron por país (primeras dos letras), hospedero (tercera y cuarta letras), genotipo, sub-genotipo (si estaba disponible), número de acceso y año de muestreo (Smith et al., 2016a).

El análisis filogenético se infirió con el modelo más adecuado para los datos mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei + G con valores de bootstrap de 1000 repeticiones (solo se muestran los valores > 65 en el árbol). Este análisis se realizó con un fragmento de 209 nucleótidos de la región genética relacionada con la cápside del VHE.

### **2.3 Resultados**

Entre las muestras procesadas utilizando el protocolo de Deus (2007) se obtuvieron tres casos positivos, dos de los cuales coincidieron con los resultados positivos obtenidos por los protocolos utilizados previamente (ELISA y PCR utilizado en el Hospital Infantil). Una muestra que resulto negativa según el primer protocolo de PCR fue identificada como positiva para el segundo protocolo de PCR.

Los productos de amplificación de dos muestras se enviaron para secuenciación. Las secuencias se obtuvieron de dos pacientes: uno de 8 años (MXHM\_G3\_39\_2012, número de acceso del GenBank MG570165) y el otro de 9 (MXHM\_G3\_19\_2013, número de acceso del GenBank MG570166). El análisis filogenético de las secuencias obtenidas demostró que éstas se agrupan con el genotipo 3 del VHE, subgenotipo f (figura 1).

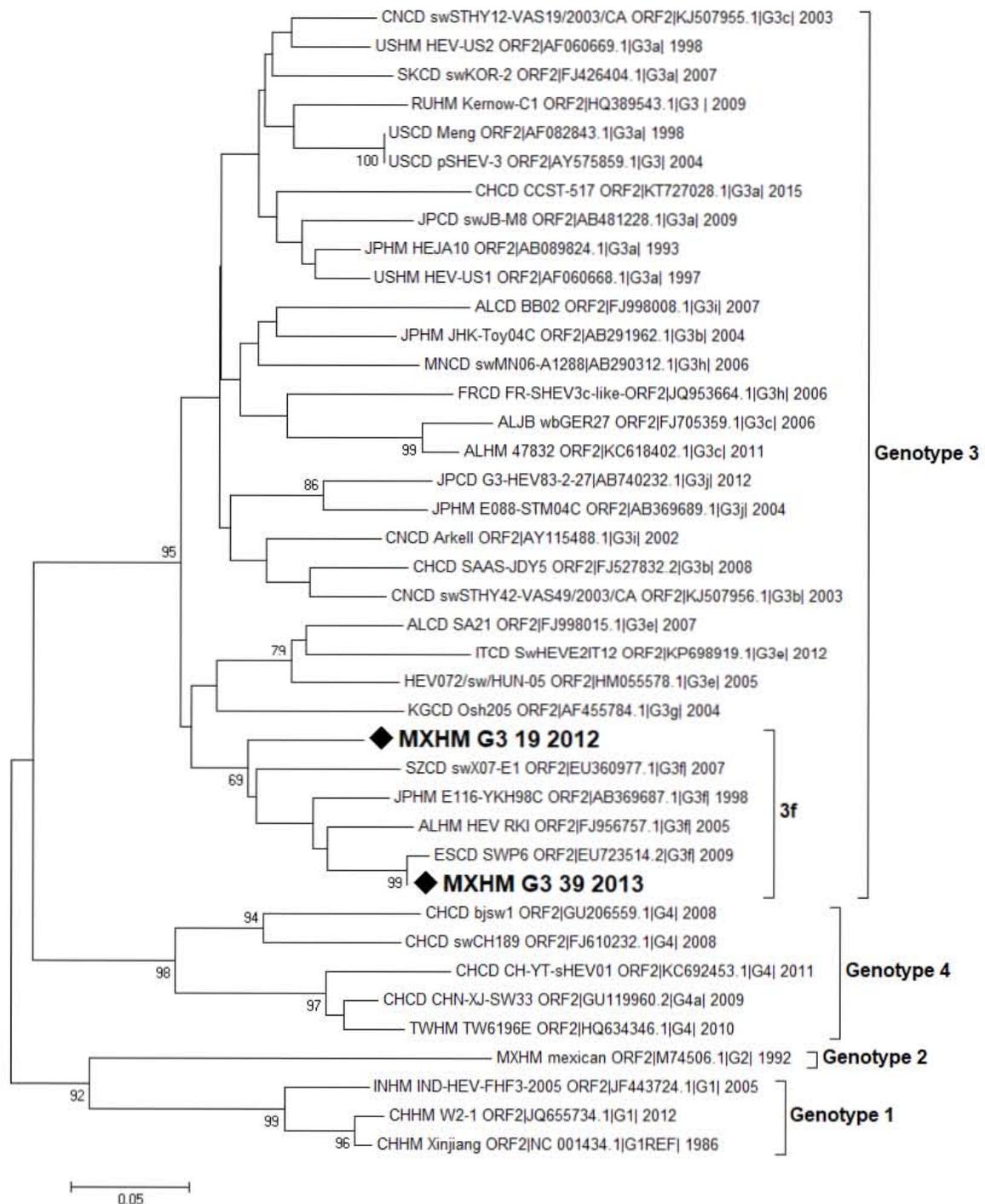


Figura 1. Árbol filogenético construido con secuencias nucleotídicas de referencia del virus de hepatitis E (VHE), incluyendo dos secuencias obtenidas de pacientes provenientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Las secuencias

obtenidas en este estudio están indicadas por un diamante negro. La inferencia evolutiva se realizó con el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo de Tamura-Nei con una distribución gamma discreta y valores permisibles para regiones invariables. Con valores de bootstrap de 1000 repeticiones, mostrando en el árbol solo valores > 65.

## **2.4 Discusión y conclusiones**

En este estudio, se identificó la presencia del genotipo 3 zoonótico del VHE en pacientes infantiles mexicanos. Como se mencionó anteriormente, el genotipo 3 presenta la mayor distribución a nivel mundial y es reconocido por su cualidad zoonótica (Khuroo et al., 2016, Ankavay et al., 2018). Este es el primer reporte del virus de hepatitis E genotipo 3 en México.

El genotipo 2 fue el primero en ser identificado en nuestro país en humanos en un brote en Morelos en 1986 (Velazquez et al., 1990). Posterior a este reporte no se ha generado otro respecto a este genotipo en el país. Se debe tomar en cuenta que la enfermedad no es muy estudiada en México y los casos provocados por el VHE deben pasar desapercibidos (Cantu-Martinez et al., 2013, Medrano et al., 2012, Alvarado-Esquivel et al., 2015, Alvarado-Esquivel et al., 2014b, Redlinger et al., 1998). Panduro y colaboradores (2011) reportaron en un estudio realizado de 1990 a 1999 que, entre las hepatitis agudas ocasionadas por virus, no se identifica al agente causal en el 12% de los casos. Esto podría indicar que el VHE pueda estar involucrado dentro de este porcentaje de casos que no obtienen un diagnóstico final (Panduro et al., 2011). Así mismo, es importante mencionar que muchos casos de hepatitis E son asintomáticos y aunque no representan un riesgo para el paciente, se desconoce los aspectos epidemiológicos en los que estos portadores pudieran estar involucrados, específicamente su participación en la transmisión del virus (Courault et al., 2017, Masclaux et al., 2013, Krumbholz et al., 2014).

En cuanto a la transmisión zoonótica, se ha reportado extensamente la presencia del VHE en cerdos, reconocidos como reservorios del virus, en jabalís y en algunas especies de venados (Meng, 2013, Doceul et al., 2016). El riesgo zoonótico de la enfermedad la ha convertido en una preocupación para la salud pública (Nan et al., 2017). En países en vías de desarrollo la presencia de la enfermedad se asocia a brotes debido a agua contaminada. En países industrializados la mayoría de las infecciones se han vinculado al consumo de carne de cerdo contaminada o de hígado de cerdo (Nan et al., 2017). En nuestro país se ha reportado la presencia del genotipo 3 del virus en cerdos en múltiples estudios incluyendo el presente (García-Hernández et al., 2017, Merino-Ramos et al., 2016, Sotomayor-González et al., 2018). A pesar de esto, las pruebas para diagnosticar la enfermedad no están disponibles al público en los hospitales y no se conoce la prevalencia de este genotipo en la población en general. Algunos estudios han reportado valores de seroprevalencia en algunos Estados, sin embargo, el virus presenta solo un serotipo y por lo tanto es imposible identificar el genotipo prevalente (Kuniholm et al., 2015). En cuanto al subgenotipo, en este estudio se encontró que las secuencias obtenidas se agruparon con el subgenotipo f, el cual ha sido reportado como el más frecuente en Europa y ha sido identificado tanto en muestras de humanos como de cerdos (Bouquet et al., 2011).

En cuanto a la infección que ocasiona el virus en niños, la enfermedad comienza con síntomas generales como fiebre, anorexia, vómitos, dolor abdominal, diarrea o estreñimiento, los cuales duran entre 2 y 3 días. Posteriormente comienza la fase de ictericia la cual dura de 10 a 14 días, esta incluye hepatomegalia leve, así como elevaciones de las enzimas hepáticas que persisten hasta 6 semanas. Entre las manifestaciones no-hepáticas de la hepatitis E que han sido documentadas en niños, se encuentran la pancreatitis aguda, hemólisis inmune y trombocitopenia, y púrpura de Henoch-Schonlein (Verghese and Robinson, 2014). En este estudio, las muestras analizadas pertenecían a pacientes del Hospital Infantil de las diferentes especialidades y con múltiples presentaciones clínicas de diferentes enfermedades,

entre ellas las más frecuentes fueron trasplante de riñón. Sin embargo, por cuestiones de ética no es posible revelar estos datos, pero es indispensable insistir en la inclusión del diagnóstico de VHE entre el panel de infecciones a analizar tanto en pacientes como en donadores para evitar la transmisión nosocomial (Colson et al., 2007).

Estos resultados enfatizan la importancia de incrementar nuestra comprensión sobre la infección crónica del VHE en pacientes inmunocomprometidos, como es el caso de los pacientes involucrados en este estudio, así como, de mejorar los estudios disponibles en nuestro país ya que la presencia y epidemiología de la infección por el virus requieren investigación adicional. Finalmente, el objetivo de generar conocimiento en este sentido es el de proveer herramientas para desarrollar estrategias que puedan ser utilizadas para la detección oportuna y eficiente del VHE.

## 2.5 Referencias

- AGGARWAL, R., KINI, D., SOFAT, S., NAIK, S. R. & KRAWCZYNSKI, K. 2000. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *The Lancet*, 356, 1081-1082.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C., SANCHEZ-ANGUIANO, L. F. & HERNANDEZ-TINOCO, J. 2014. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in general population in rural Durango, Mexico. *Hepat Mon*, 14, e16876.
- 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, 103-8.
- ALVAREZ-MUÑOZ, M. T., TORRES, J., DAMASIO, L., GÓMEZ, A., TAPIA-CONYER, R. & MUÑOZ, O. 1999. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in Mexican subjects 1 to 29 years of age. *Archives of medical research*, 30, 251-254. abreviar el journal

- ANKAVAY, M., DUBUISSON, J. & COCQUEREL, L. 2018. The hepatitis E virus, an unknown virus that reveals itself. *Med Sci (Paris)*, 34, 1071-1078.
- BELBEZIER, A., LAGRANGE, E. & BOUILLET, L. 2018. Neurologic disorders and Hepatitis E: Review of literature. *Rev Med Interne*, 39, 842-848.
- BLASCO-PERRIN, H. & PERON, J. M. 2018. Hepatic and extra-hepatic manifestations of hepatitis E virus infection. *Presse Med*, 47, 620-624.
- BOUQUET, J., TESSE, S., LUNAZZI, A., ELOIT, M., ROSE, N., NICAND, E. & PAVIO, N. 2011. Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008-2009. *Emerg Infect Dis*, 17, 2018-25.
- CANTU-MARTINEZ, M. A., ROIG-SAGUES, A. X., CEDILLO-ROSALES, S., ZAMORA-AVILA, D. E. & AVALOS-RAMIREZ, R. 2013. Molecular detection of hepatitis E virus in pig livers destined for human consumption in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Salud Pública Mex*, 55, 193-5.
- COLSON, P., COZE, C., GALLIAN, P., HENRY, M., DE MICCO, P. & TAMALET, C. 2007. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg infect dis*, 13, 648.
- abreviar journal
- COURAULT, D., ALBERT, I., PERELLE, S., FRAISSE, A., RENAULT, P., SALEMKOUR, A. & AMATO, P. 2017. Assessment and risk modeling of airborne enteric viruses emitted from wastewater reused for irrigation. *Sci of Total Enviro*, 592, 512-526.
- CHEN, X., ZHANG, Q., HE, C., ZHANG, L., LI, J., ZHANG, W., CAO, W., LV, Y. G., LIU, Z., ZHANG, J. X. & SHAO, Z. J. 2012. Recombination and natural selection in hepatitis E virus genotypes. *J Med Virol*, 84, 1396-407.
- 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.

- DOCEUL, V., BAGDASSARIAN, E., DEMANGE, A. & PAVIO, N. 2016. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses*, 8.
- GARCIA-HERNANDEZ, M. E., CRUZ-RIVERA, M., SANCHEZ-BETANCOURT, J. I., RICO-CHAVEZ, O., VERGARA-CASTANEDA, A., TRUJILLO, M. E. & SARMIENTO-SILVA, R. E. 2017. Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC Vet Res*, 13, 289.
- HALAC, U., BELAND, K., LAPIERRE, P., PATEY, N., WARD, P., BRASSARD, J., HOUDE, A. & ALVAREZ, F. 2012. [Cirrhosis due to chronic hepatitis E infection in a child post-bone marrow transplant]. *J Pediatr*, 160, 871-4.e1.
- KHUROO, M. S., KHUROO, M. S. & KHUROO, N. S. 2016. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J Gastroenterol*, 22, 7030-45.
- KRUMBHOLZ, A., NEUBERT, A., JOEL, S., GIRSCHICK, H., HUPPERTZ, H. I., KAISER, P., LIESE, J., STRENG, A., NIEHUES, T., PETERS, J., SAUERBREY, A., SCHROTEN, H., TENENBAUM, T., WIRTH, S., ZELL, R. & SAUERBREI, A. 2014. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in children in Germany. *Pediatr Infect Dis J*, 33, 258-62.
- KUNIHOLM, M. H., ONG, E., HOGEMA, B. M., KOPPELMAN, M., ANASTOS, K., PETERS, M. G., SEABERG, E. C., CHEN, Y., NELSON, K. E. & LINNEN, J. M. 2015. Acute and Chronic Hepatitis E Virus Infection in HIV-Infected United States Women. *Hepatology*, 712-20, 63.
- LHOMME, S., MARION, O., ABRAVANEL, F., CHAPUY-REGAUD, S., KAMAR, N. & IZOPET, J. 2016. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses*, 8.
- MASCLAUX, F. G., HOTZ, P., FRIEDLI, D., SAVOVA-BIANCHI, D. & OPPLIGER, A. 2013. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Research*, 47, 5101-5109.
- MAYLIN, S., STEPHAN, R., MOLINA, J.-M., PERALDI, M.-N., SCIEUX, C., NICAND, E., SIMON, F. & DELAUGERRE, C. 2012. Prevalence of antibodies

- and RNA genome of hepatitis E virus in a cohort of French immunocompromised. *J Clin Virol*, 53, 346-349.
- MEDRANO, C., BOADELLA, M., BARRIOS, H., CANTÚ, A., GARCÍA, Z., DE LA FUENTE, J. & GORTAZAR, C. 2012. Zoonotic pathogens among white-tailed deer, northern Mexico, 2004–2009. *Emerg infect dis*, 18, 1372.
- MENG, X. J. 2013. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis*, 33, 41-9.
- MERINO-RAMOS, T., MARTIN-ACEBES, M. A., CASAL, J., SAIZ, J. C. & LOZARUBIO, E. 2016. Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Antibodies in Mexican Pigs. *Food Environ Virol*, 8, 156-9.
- MUSHAHWAR, I. K. 2008. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J med virol*, 80, 646-658.
- NAN, Y., WU, C., ZHAO, Q. & ZHOU, E.-M. 2017. Zoonotic Hepatitis E Virus: An Ignored Risk for Public Health. *Front microbiol*, 8, 2396-2396.
- PANDURO, A., ESCOBEDO MELENDEZ, G., FIERRO, N. A., RUIZ MADRIGAL, B., ZEPEDA-CARRILLO, E. A. & ROMAN, S. 2011. Epidemiology of viral hepatitis in Mexico. *Salud Pública Mex*, 53 Suppl 1, S37-45.
- PASHA, S. A., PASHA, S. A., SUHASINI, T. & RAO, D. A. 2018. Hepatitis E Virus-Associated Acute Encephalitic Parkinsonism. *J Assoc Physicians India*, 66, 87-88.
- REALPE-QUINTERO, M., MIRAZO, S., VIERA-SEGURA, O., COPADO-VILLAGRANA, E. D., PANDURO, A., ROMAN, S., ARBIZA, J. & FIERRO, N. A. 2018. Hepatitis E Virus Genotype 1 and Hepatitis A Virus Dual Infection in Pediatric Patients with a Low Socioeconomic Status from Mexico. *Intervirology*, 1-6.
- REDLINGER, T., O'ROURKE, K., NICKEY, L. & MARTINEZ, G. 1998. Elevated hepatitis A and E seroprevalence rates in a Texas/Mexico border community. *Tex Med*, 94, 68-71.

- RIO, D. C., ARES, M., HANNON, G. J. & NILSEN, T. W. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010, pdb. prot5439.
- SMITH, D. B. & SIMMONDS, P. 2015. Hepatitis E virus and fulminant hepatitis--a virus or host-specific pathology? *Liver Int*, 35, 1334-40.
- SMITH, D. B., SIMMONDS, P., IZOPET, J., OLIVEIRA-FILHO, E. F., ULRICH, R. G., JOHNE, R., KOENIG, M., JAMEEL, S., HARRISON, T. J. & MENG, X.-J. 2016. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol*, 97, 537-542.
- SOTOMAYOR-GONZALEZ, A., TRUJILLO-ORTEGA, M. E. & TABOADA-RAMIREZ, B. I. 2018. Phylogenetic Analysis and Characterization of the Complete Hepatitis E Virus Genome (Zoonotic Genotype 3) in Swine Samples from Mexico. *Viruses*, 10, 391.
- SRIVASTAVA, R., AGGARWAL, R., JAMEEL, S., PURI, P., GUPTA, V. K., RAMESH, V., BHATIA, S. & NAIK, S. 2007. Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral immunology*, 20, 56-65.
- VELAZQUEZ, O., STETLER, H. C., AVILA, C. & ET AL. 1990. Epidemic transmission of enterically transmitted non-a, non-b hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA*, 263, 3281-3285.
- VERGHESE, V. P. & ROBINSON, J. L. 2014. A systematic review of hepatitis E virus infection in children. *Clin Infect Dis*, 59, 689-97.
- WEDEMEYER, H., PISCHKE, S. & MANNING, M. P. 2012. Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. *Gastroenterology*, 142, 1388-1397. e1.

### **3. CAPÍTULO 3**

#### **Seroprevalencia de anticuerpos anti-hepatitis E en Médicos Veterinarios**

Colaboración con la M. en C. Marion Galindo Castañeda.

El trabajo se envió a la revista Zoonoses and Public Health y se encuentra en revisión.

#### **3.1 Introducción**

El virus de la hepatitis E (HEV) es mejor conocido por su transmisión zoonótica y su alta prevalencia en países en desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima 20 millones de infecciones de hepatitis E cada año, causando 56,600 muertes en todo el mundo (WHO, 2017). En México, el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) de la Secretaría de Salud reportó desde 1990 los primeros casos de hepatitis causada por el VHE en el país. Sin embargo, no se han reportado más casos en humanos desde ese año.

Los primeros brotes de hepatitis E en México ocurrieron en 1986, cuando 223 pacientes de dos lugares diferentes presentaron signos clínicos de hepatitis aguda. Tres mujeres no embarazadas murieron y una tuvo un parto prematuro en el que el bebé murió posteriormente. En ambos casos, la enfermedad se asoció con agua contaminada y otros estudios determinaron la causa por el VHE, conocida en ese momento como hepatitis transmisible no A, no B (HT-NANB). Este fue el primer caso del VHE reportado en América (Velazquez et al., 1990, Aggarwal, 2013).

De 2000 a 2007, se reportaron en México un total de 192 588 casos de hepatitis viral, de los cuales el 79% fueron causados por el VHA, el 3,3% por el VHB, el 6% por el VHC y el 11,7% no tuvieron un diagnóstico preciso. El diagnóstico del VHE no se realiza de manera rutinaria en hospitales ni en bancos de sangre en México, por lo que solo se puede suponer que probablemente esté involucrado en las hepatitis virales de agentes etiológicos no identificados que son en un 11,7% de los

casos (Panduro et al., 2011). Además, la presentación clínica aguda de la hepatitis E es imposible de diferenciar de la hepatitis A, y algunos casos podrían diagnosticarse erróneamente; incluso se ha reportado la coinfección con ambos virus en cuyos casos la infección con el VHE no se detectaría (Rodriguez Lay Lde et al., 2008). Sin embargo, el VHE alcanza una mayor tasa de mortalidad de 1% a 4% en contraste a el VHA (0.1% a 2%) (Pavio et al., 2010b).

Se han identificado grupos de alto riesgo en la población, principalmente grupos de personas que tienen una mayor exposición al VHE como veterinarios, personal de rastros, criadores de cerdos y personas que viven en áreas donde se consumen productos de cerdo crudos y poco cocidos o hígado de venado, como parte de las costumbres diarias, estos presentan mayor prevalencia de anticuerpos (Van der Poel et al., 2018, Bansal et al., 2017). Los estudios que evalúan a estos grupos de alto riesgo se han realizado en India, Portugal e Italia, entre otros; y todos asocian este riesgo laboral con valores de prevalencia más elevados de anticuerpos anti-VHE (De Sabato et al., 2017, Bansal et al., 2017).

Como se mencionó, el VHE está asociado a la transmisión zoonótica y es responsable de hepatitis aguda e incluso crónica en humanos, así como, de hepatitis fulminante en mujeres embarazadas (25%). Se ha detectado una mayor prevalencia de anticuerpos anti-VHE en poblaciones porcinas mexicanas asociadas a la presencia de genotipo zoonótico (Cantu-Martinez et al., 2013, Merino-Ramos et al., 2016, Garcia-Hernandez et al., 2017). Sin embargo, ningún estudio ha reportado la presencia del genotipo zoonótico 3 en humanos, excepto por él reportado en el capítulo 3 de este presente trabajo que se encuentra actualmente en revisión; y desde la primera identificación del genotipo 2 en nuestro país, pocos estudios se han llevado a cabo en poblaciones humanas (Alvarado-Esquivel et al., 2015, Alvarado-Esquivel et al., 2014, Bernal Reyes and Licona Solis, 1996, Redlinger et al., 1998, (Redlinger et al., 1998, Bernal Reyes and Licona Solis, 1996, Alvarado-Esquivel et al., 2014b, Alvarado-Esquivel et al., 2015). En este estudio,

determinamos la presencia de anticuerpos contra el VHE en una población de veterinarios con predisposición laboral al contacto con cerdos.

### 3.2 Material y métodos

#### 3.2.1 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo en el congreso nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC) durante dos años consecutivos. El primer muestreo se realizó en el Puerto de Veracruz del 19 al 21 de julio del 2016. El segundo se realizó en Querétaro del 19 al 22 de julio de 2017. Se solicitó a los participantes que completaran un cuestionario que cubría su edad, sexo, lugar de residencia, educación, trabajo, contacto directo con cerdos y enfermedad hepática previa, todos los voluntarios firmaron (n = 99) una carta de consentimiento para el uso de la información generada con fines científicos.

Los voluntarios fueron muestreados por enfermeros certificados utilizando tubos estériles sin anticoagulante (Vacutainer), los cuales fueron centrifugados a 1200 rpm por 10 min para separar el suero, el cual fue colocado en microtubos de 1.5 ml y fueron almacenados en refrigeración hasta su uso. En el cuadro 1 se enlistan las características de las 99 muestras obtenidas.

Cuadro 1. Muestras de suero de médicos veterinarios y otras personas relacionadas al trabajo con cerdos para el diagnóstico del virus de hepatitis E (VHE) obtenidas por dos años consecutivos (2016-2017) en el congreso nacional de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos.

ID	Edad	Procedencia	Profesión	Padecimientos Importantes	Contacto con cerdos
16-2016	45	CDMX	Académico	No	Si
18-2016		CDMX	Responsable de diagnóstico	No	Si
42-2016	48	Estado de México	MVZ	No	Si

48-2016	43	Jalisco	MVZ	No	Si
49-2016	35	Jalisco	MVZ	No	Si
50-2016	56	Jalisco	MVZ	No	Si
51-2016	39	ND	MVZ	No	Si
54-2016	50	CDMX	MVZ	No	Si
55-2016	ND	Costa Rica	Porcicultor	No	Si
57-2016	25	ND	MVZ	No	Si
59-2016	28	Jalisco	MVZ	No	Si
60-2016	62	Jalisco	MVZ	No	Si
61-2016	43	Jalisco	MVZ	No	Si
62-2016	45	Jalisco	MVZ	No	Si
63-2016	47	Jalisco	MVZ	No	Si
72-2016	38	CDMX	MVZ	No	No
76-2016	54	Estado de México	QFB	No	Si
81-2016	25	CDMX	MVZ	No	Si
82-2016	28	CDMX	MVZ	No	Si
83-2016	34	CDMX	MVZ	No	Si
1-2017	46	Puebla	MVZ	Hepatitis, a los 13 años de edad	Si
2-2017	26	Estado de México	MVZ	No	Si
3-2017	24	Estado de México	MVZ	No	Si
4-2017	24	Estado de México	MVZ	No	Si
5-2017	24	Estado de México	MVZ	No	Si
6-2017	25	Estado de México	MVZ	No	Si
7-2017	58	Jalisco	MVZ	No	Si
8-2017	30	Jalisco	MVZ	No	Si
9-2017	51	Michoacán	MVZ	No	Si
10-2017	46	CDMX	QFB	Si	No
11-2017	25	Estado de México	MVZ	No	Si
12-2017	37	CDMX	MVZ	No	Si
13-2017	44	Jalisco	MVZ	No	Si

14-2017	26	CDMX	MVZ	No	No
15-2017	22	Estado de México	MVZ	No	No
16-2017	24	Estado de México	MVZ	No	Si
17-2017	22	CDMX	Estudiante	No	No
18-2017	22	Veracruz	MVZ	No	No
19-2017	23	Puebla	MVZ	No	Si
20-2017	24	CDMX	MVZ	No	Si
21-2017	24	CDMX	MVZ	No	Si
22-2017	23	CDMX	MVZ	No	No
23-2017	37	CDMX	MVZ	Hepatitis	Si
24-2017	30	CDMX	MVZ	No	Si
25-2017	28	CDMX	MVZ	Hepatitis A	Si
26-2017	64	CDMX	MVZ	No	No
27-2017	32	Jalisco	MVZ	No	Si
28-2017	49	Jalisco	MVZ	Hepatitis	Si
29-2017	ND	Costa Rica	MVZ	No	Si
30-2017	25	Estado de México	MVZ	No	Si
31-2017	25	CDMX	MVZ	No	Si
32-2017	60	Campeche	MVZ	Hepatitis A	Si
33-2017	54	Guanajuato	MVZ	No	Si
34-2017	60	Estado de México	MVZ	No	Si
35-2017	46	Veracruz	MVZ	No	Si
36-2017	47	CDMX	MVZ	Hepatitis E (2016)	Si
37-2017	48	CDMX	MVZ	No	Si
38-2017	29	Jalisco	Ingeniero en Sistemas Pecuarios	No	Si
39-2017	57	CDMX	MVZ	No	Si
40-2017	38	Sonora	MVZ	Hepatitis A	Si
41-2017	69	Estado México	MVZ	No	Si
42-2017	55	Jalisco	MVZ	No	Si
43-2017	50	Aguascalientes	MVZ	Hepatitis A	Si

44-2017	56	Morelos	MVZ	Hepatitis de niño	Si
45-2017	55	CDMX	MVZ	Epstein barr a los 4 meses de edad	No
46-2017	41	Sonora	MVZ	Erlchiosis a los 10 años de edad	Si
47-2017	58	Querétaro	Licenciado	No	No
48-2017	53	CDMX	MVZ	No	Si
49-2017	30	Sonora	Ing. Agrónomo	No	Si
50-2017	23	CDMX	Ing. Metal	No	No
51-2017	24	CDMX	Diseñador	No	No
52-2017	55	Jalisco	MVZ	No	Si
53-2017	23	Querétaro	MVZ	No	Si
54-2017	28	Querétaro	MVZ	No	No
55-2017	38	Michoacán	MVZ	No	Si
56-2017	48	Guadalajara	MVZ	No	Si
57-2017	69	Guanajuato	MVZ	Hepatitis, a los 9 años de edad	Si
58-2017	49	Guanajuato	MVZ	No	SI
59-2017	50	Querétaro	MVZ	No	No
60-2017	46	Querétaro	MVZ	No	Si
61-2017	ND	CDMX	MVZ	No	No
62-2017	34	Estado de México	MVZ	No	Si
63-2017	26	CDMX	MVZ	No	Si
64-2017	43	Veracruz	MVZ	No	Si
65-2017	58	Puebla	MVZ	No	No
66-2017	57	Jalisco	MVZ	No	No
67-2017	47	Querétaro	Empresario	No	No
68-2017	48	Querétaro	Limpieza	No	No
69-2017	31	Querétaro	Paramédico	No	No
70-2017	35	Querétaro	Paramédico	No	No

71-2017	26	Querétaro	Enfermero	No	No
72-2017	29	Querétaro	Paramédico	No	No
73-2017	31	CDMX	MVZ	No	Si
74-2017	57	Sonora	MVZ	No	Si
75-2017	52	Querétaro	MVZ	Hepatitis	No
76-2017	23	CDMX	MVZ	No	No
77-2017	25	CDMX	MVZ	No	Si
78-2017	63	CDMX	MVZ	No	Si
79-2017	26	CDMX	MVZ	No	Si

---

ND: no disponible

### 3.2.2 Encuesta

Se aplicó un cuestionario estándar a todos los participantes antes de la recolección de la muestra. Se evaluaron cinco factores de riesgo asociados: edad, estado de origen, profesión, contacto con cerdos y enfermedad hepática previa.

### 3.2.3 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

La detección de anticuerpos anti-VHE se realizó utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) disponible comercialmente por Wantai Biopharmaceutical, Inc., la cual utiliza la proteína A marcada con peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad, CA, EE. UU.) como conjugado. Se utilizó una dilución 1:10 de la muestra de suero y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se realizó un lavado y se añadió el conjugado el cual se dejó incubar a 37 °C durante 30 minutos. Posterior a un segundo lavado se añadieron 100 µl de solución de sustrato (TMB) y se detuvo la reacción a los 15 min con 50 µl de solución de paro. Se midió la absorbancia a 450 nm de longitud utilizando un espectrofotómetro EX de barrido múltiple (Thermo Fisher). El valor de corte se calculó como la absorbancia media de los controles negativos +0,16 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras que obtuvieron un valor de absorbancia mayor al valor de corte se consideraron positivas.

#### 3.2.4 Análisis molecular

Para complementar el estudio se seleccionaron varias muestras al azar del primer muestreo realizado en 2016 para determinar la presencia del virus en sangre de los voluntarios.

#### 3.2.5 Extracción

La extracción de ARN se llevó a cabo por el método de trizol a partir de 500 µl de muestra de la siguiente manera: se agregaron 600 µl de trizol a la muestra, se homogenizó en un vibromezclador y se dejó incubar una noche, se le agregaron 200 µl de cloroformo a 4° C, se volvió a homogenizar y se dejó incubar 15 min a 4° C; se centrifugó a 12000 X por 15 min y se colocó el sobrenadante en un nuevo microtubo al cual se le agregó una proporción de 1:1 de isopropanol a 4° C (Rio et al., 2010). Se dejó incubar toda la noche, se centrifugó a 12000 X por 15 min, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 200 µl de etanol al 70% a 4° C. Finalmente se centrifugó a 12000 X por 15 min, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla completamente para resuspenderla en 30 µl de agua inyectable.

#### 3.2.6 Transcripción Reversa (RT)

El primer paso de la PCR para hacer cDNA a partir de ARN se llevó a cabo utilizando el kit SuperScript® III Reverse Transcriptase de Invitrogen® siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando “random hexamers” que contiene el kit. El protocolo fue el siguiente: se colocaron 5 µl de ARN de la muestra en un microtubo y se le agregaron 1 µl de “random hexamers”, 1 µl de buffer de alineación y 5 µl de agua inyectable. La mezcla se dejó incubar a 65 °C por 5 min y se colocó inmediatamente en hielo por 2 min. A cada tubo se le agregaron 10 µl de la mezcla de reacción y 2 µl de enzima. Las muestras se colocaron en el termociclador y se sometieron 10 min a 25° C, 50° C por 50 min y 85° C por 5 min. Finalmente se colocaron en hielo para enfriar y se almacenaron a -20° C.

#### 3.2.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se llevó a cabo con el kit Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen®) siguiendo las recomendaciones del fabricante utilizando 10 µl de cDNA y el protocolo recomendado por el Dr. Meng utilizando una PCR anidada con dos pares de “iniciadores” degenerados bajo las siguientes condiciones: 95° C por 9 min, 39 ciclos de 94° C por 1 min y 72° C por 2 min; con un ciclo final de 72° C por 7 min. El producto esperado fue de 348 pb (Huang et al., 2002).

### 3.2.8 Electroforesis

Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 2% por medio de electroforesis en una cámara horizontal a 90 volts durante una hora, colocando 5 µl de la muestra con 2 µl de buffer de carga (6X de Fermentas) y se utilizó un marcador de pares de bases (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder y 100 bp). El gel fue teñido con bromuro de etidio y los productos fueron visualizados en un transiluminador con luz UV.

### 3.2.9 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de regresión logística múltiple para determinar la relación entre la presencia de la infección y los factores de riesgo asociados: edad, procedencia, profesión, contacto con cerdos y enfermedad hepática previa. La variable edad fue una medida de intervalo mientras que las otras variables fueron nominales. El análisis se realizó con el programa SigmaPlot (systat software, San Jose, CA).

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 ELISA

De las 99 muestras evaluadas solo 8 fueron positivas a la detección de anticuerpos anti VHE (8.08%). El cuadro 2 muestra los resultados obtenidos en la prueba de ELISA.

Cuadro 2. Resultados positivos en la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti-VHE en sueros de médicos veterinarios y voluntarios relacionados con la producción porcina.

ID	ELISA
50-2016	Positivo
54-2016	Positivo
55-2016	Positivo
26-2017	Positivo
28-2017	Positivo
42-2017	Positivo
48-2017	Positivo
60-2017	Positivo

### 3.3.2 RT-PCR

No se encontraron muestras positivas para la detección de ácido nucleico viral del VHE por medio de la técnica de RT-PCR.

### 3.3.3 Análisis estadístico

De los factores evaluados solo la edad fue significativa ( $p=0.017$ ) con un “odds ratio” de 1.46. De las 8 muestras que resultaron positivas solamente 7 proporcionaron su edad.

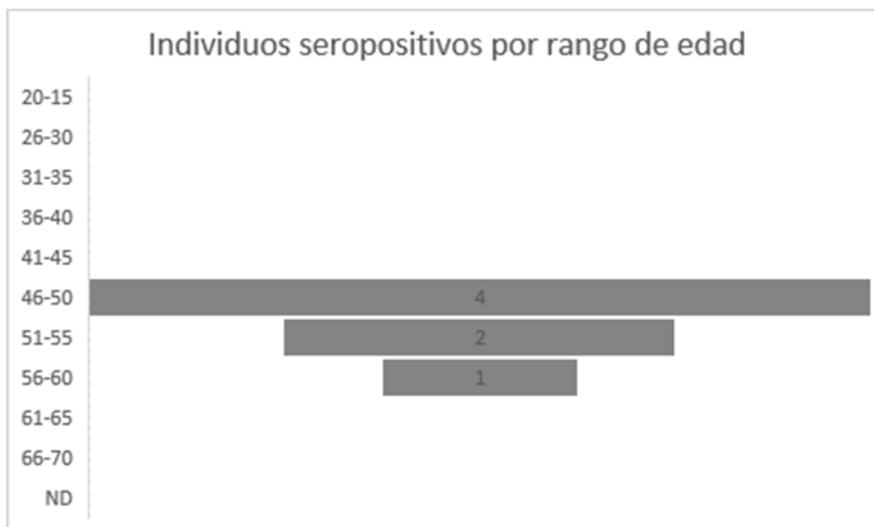


Figura 1. Gráfica de los individuos seropositivos al virus de hepatitis E (VHE) por rango de edad.

### 3.4 Discusión y conclusiones

La hepatitis E es una enfermedad emergente que afecta a humanos y animales en países en desarrollo y desarrollados con brotes cada vez más frecuentes. La infección por el virus de hepatitis E frecuentemente no se diagnostica y en algunas ocasiones se diagnostica erróneamente debido a hallazgos inespecíficos que pueden confundirse con otras causas de hepatitis. La prevalencia y los factores de riesgo asociados a la infección son muy variados; sin embargo, un factor de riesgo altamente asociado es el contacto con los cerdos. En este estudio se evaluó la presencia de anticuerpos anti-VHE y la amplificación de un fragmento genético del virus en individuos con exposición conocida a cerdos.

Como se ha descrito, el virus solo se encuentra en sangre durante el periodo de viremia, que en el caso de humanos se ha reportado de hasta un mes después de la aparición de los signos clínicos en individuos considerados “sanos”, es decir, sin otra enfermedad crónica o inmunosupresora. Incluso se ha reportado que el ARN puede no ser detectado en suero cuando los pacientes reciben atención médica

(Krain et al., 2014b). En un caso particular reportado en India, se siguieron a 60 pacientes con hepatitis E aguda de un brote para identificar el ARN en suero y solo se detectó en el suero de 51 pacientes en la primera semana, disminuyendo a 4 en la quinta y sexta semanas después de la aparición de los síntomas y a ninguno después de 6 semanas (Chandra et al., 2010). En otro estudio realizado en India, se detectó ARN viral en suero hasta un mes después de la desaparición de los síntomas en 20 pacientes que presentaron cuadro clínico de hepatitis E aguda durante un brote en Lucknow y solo en uno de los pacientes se detectó ARN viral en suero a los 45 días después de la desaparición de los síntomas (Aggarwal and Krawczynski, 2000). Por esta razón no se realizó la detección del virus en la sangre por técnicas moleculares y se utilizó el método de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos.

En el presente estudio se analizaron 99 muestras, de las cuales 8 muestras presentaron anticuerpos anti-VHE (8.08%). De acuerdo a estudios reportados anteriormente en México, este valor de seroprevalencia es similar a los resultados publicados por Álvarez-Muñoz *et al.* (1999) en Hidalgo (6.3%) y más alto que el reportado por Redlinger y colaboradores (1.6%) (Redlinger et al., 1998, Alvarez-Muñoz et al., 1999). Alvarado-Esquivel *et al.* (2014) reportan una seroprevalencia del 37% en Durango; sin embargo, los autores concluyen que la seroprevalencia de ese Estado es mayor que las reportadas en otras partes de México (Alvarado-Esquivel et al., 2014b). Respecto a los valores mundiales de seroprevalencia; un estudio realizado en los Estados Unidos de 1988 a 1994 reportó una seroprevalencia del 21%; mientras que un estudio más reciente que analizó muestras de 2013-2016 reportó valores de seroprevalencia entre 4.5% y 20.7%, la variabilidad se relacionó con el año, la raza, el sexo y la edad de la persona (Cangin et al., 2019, Meng et al., 2002). En Asia, los valores de prevalencia reportados se encuentran entre el 15% y el 60% (Dalton et al., 2013). En Europa, un metaanálisis realizado hasta 2015 reportó una seroprevalencia de 0.6% a 52.5%, que aumenta según la edad, y se argumentó que la heterogeneidad en los datos de

seroprevalencia se debió al tipo de prueba utilizada, la región geográfica y la profesión del individuo, concluyendo que las personas con mayor contacto con cerdos tienen valores de prevalencia más altos (Hartl et al., 2016). Por lo tanto, de acuerdo a esta información se debe considerar que el valor de seroprevalencia que encontramos en el presente estudio es ligeramente superior al de la población general en México, ya que las muestras analizadas pertenecen a una población que es considerada en riesgo.

Se ha reportado ampliamente que las personas con mayor exposición a cerdos se consideran una población en riesgo, como son los médicos veterinarios, el personal de rastro o el personal de carnicerías; y se ha demostrado que éstos presentan valores de prevalencia más altos que la población en general (Lewis et al., 2010, Kang et al., 2017). Chaussade *et al.* (2013) informaron un 26% de seroprevalencia en la población de control en comparación con el 44% en trabajadores agrícolas con un índice de probabilidad de 2.51 ( $P < 0.0001$ ) (Chaussade et al., 2013). Diversos estudios de seroprevalencia realizados en médicos veterinarios han reportado valores variables, por ejemplo, de 12.9% en Noruega, 10.2% en Finlandia y 9.7% en Portugal; los cuales son similares a nuestros hallazgos (Kantala et al., 2017, Lange et al., 2017, Mesquita et al., 2016). Asimismo, Meng *et al.* (2002), reportaron una seroprevalencia del 26% en cerdos de EE. UU., país vecino, y reportaron una asociación positiva con la edad en personas mayores a 60 años (Meng et al., 2002).

Entre los factores de riesgo que fueron analizados en este estudio, el análisis de regresión logística mostró que el factor edad presenta una asociación positiva con la presencia de anticuerpos en los individuos muestreados. El análisis determinó que tener una edad entre 46 y 50 años tiene una razón de probabilidad de 1.4. Este resultado es contrario a lo que reporta la OMS, la cual indica que la infección es más común entre 15 a 40 años en áreas de alta endemicidad (Jia et al., 2014, WHO, 2017b). Sin embargo, otros estudios que evalúan el riesgo representado por la edad, por ejemplo, Drobeniuc *et al.* (2001) encontraron no solo la edad como un factor de riesgo con un índice de probabilidad de 1.04, sino también el número de años

dedicados a trabajar con animales con un índice de probabilidad similar (Drobeniuc et al., 2001). Zhang y colaboradores (2017) informaron un riesgo significativo en grupos de población de 45 a 59 años y mayores de 60 años, con 4.29 y 7.16 veces más probabilidades de presentar anticuerpos contra la enfermedad, respectivamente (Zhang et al., 2017). En Camboya, un estudio determinó un mayor riesgo en grupos de edad mayores de 20 años, siendo los más susceptibles 50-59 años, con 8.9 veces más probabilidades de presentar anticuerpos anti-VHE (Yamada et al., 2015). Además, Aggarwal *et al.* (2013) informaron que en áreas con una baja tasa de endemicidad, la población más afectada fueron los adultos mayores (Aggarwal, 2013, WHO, 2017b). En México, la prevalencia de la enfermedad es desconocida, sin embargo, en este estudio, la edad relacionada con un mayor riesgo es similar a la de una población con valores que indican una baja endemicidad.

Es importante mencionar que no se encontró asociación entre los anticuerpos anti-VHE y sexo, lugar de procedencia o profesión. Sin embargo, se debe considerar que este resultado representa una limitación en el estudio debido al bajo número de muestras que fue posible obtener. La información sobre hepatitis E en México es muy escasa y se desconoce el Estado del país en términos de seroprevalencia o casos clínicos. Por el contrario, se ha informado en los EE. UU., que de 2013 a 2016 las tasas de seroprevalencia se han duplicado en la población (Cangin et al., 2019). Este resultado demuestra la necesidad de aumentar la vigilancia de la enfermedad a través de la investigación y el diagnóstico para determinar su situación actual, especialmente en grupos con mayor riesgo.

### **3.5 Referencias**

AGGARWAL, R. 2013. Hepatitis E: epidemiology and natural history. *J Clin Exp Hepatol*, 3, 125-33.

- AGGARWAL, R. & KRAWCZYNSKI, K. 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J gastroenterol hepatol*, 15, 9-20.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C., SANCHEZ-ANGUIANO, L. F. & HERNANDEZ-TINOCO, J. 2014. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in general population in rural Durango, Mexico. *Hepat Mon*, 14, e16876.
- 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, 103-8.
- ALVAREZ-MUÑOZ, M. T., TORRES, J., DAMASIO, L., GÓMEZ, A., TAPIA-CONYER, R. & MUÑOZ, O. 1999. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in Mexican subjects 1 to 29 years of age. *Arch med res*, 30, 251-254.
- BANSAL, M., KAUR, S., DEKA, D., SINGH, R. & GILL, J. P. S. 2017. Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E virus infection in swine and occupationally exposed workers in Punjab, India. *Zoonoses Public Health*, 64, 662-672.
- BERNAL REYES, R. & LICONA SOLIS, J. E. 1996. Seroepidemiology of hepatitis E in the State of Hidalgo. *Rev Gastroenterol Mex*, 61, 233-8.
- CANGIN, C., FOCHT, B., HARRIS, R. & STRUNK, J. A. 2019. Hepatitis E seroprevalence in the United States: Results for immunoglobulins IgG and IgM. *J Med Virol*, 91, 124-131.
- CANTU-MARTINEZ, M. A., ROIG-SAGUES, A. X., CEDILLO-ROSALES, S., ZAMORA-AVILA, D. E. & AVALOS-RAMIREZ, R. 2013. Molecular detection of hepatitis E virus in pig livers destined for human consumption in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Salud Pública Mex*, 55, 193-5.
- 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 journal*, 7, 1.

- CHAUSSADE, H., RIGAUD, E., ALLIX, A., CARPENTIER, A., TOUZE, A., DELZESCAUX, D., CHOUTET, P., GARCIA-BONNET, N. & COURSAGET, P. 2013. Hepatitis E virus seroprevalence and risk factors for individuals in working contact with animals. *J Clin Virol*, 58, 504-8.
- DALTON, H. R., HUNTER, J. G. & BENDALL, R. P. 2013. Hepatitis E. *Curr Opin Infect Dis*, 26, 471-8.
- DE SABATO, L., DI BARTOLO, I., MONTOMOLI, E., TROMBETTA, C., RUGGERI, F. M. & OSTANELLO, F. 2017. Retrospective Study Evaluating Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Blood Donors and in Swine Veterinarians in Italy (2004). *Zoonoses Public Health*, 64, 308-312.
- DROBENIUC, J., FAVOROV, M. O., SHAPIRO, C. N., BELL, B. P., MAST, E. E., DADU, A., CULVER, D., IAROVIOI, P., ROBERTSON, B. H. & MARGOLIS, H. S. 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis*, 184, 1594-7.
- GARCIA-HERNANDEZ, M. E., CRUZ-RIVERA, M., SANCHEZ-BETANCOURT, J. I., RICO-CHAVEZ, O., VERGARA-CASTANEDA, A., TRUJILLO, M. E. & SARMIENTO-SILVA, R. E. 2017. Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC Vet Res*, 13, 289.
- HARTL, J., OTTO, B., MADDEN, R. G., WEBB, G., WOOLSON, K. L., KRISTON, L., VETTORAZZI, E., LOHSE, A. W., DALTON, H. R. & PISCHKE, S. 2016. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis. *Viruses*, 8.
- HUANG, F., HAQSHENAS, G., GUENETTE, D., HALBUR, P., SCHOMMER, S., PIERSON, F., TOTH, T. & MENG, X. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1326-1332.
- JIA, Z., YI, Y., LIU, J., CAO, J., ZHANG, Y., TIAN, R., YU, T., WANG, H., WANG, X., SU, Q., ZHOU, W., CUI, F., LIANG, X. & BI, S. 2014. Epidemiology of hepatitis E virus in China: results from the Third National Viral Hepatitis Prevalence Survey, 2005-2006. *PLoS One*, 9, e110837.

- KANG, Y. H., CONG, W., ZHANG, X. Y., WANG, C. F., SHAN, X. F. & QIAN, A. D. 2017. Hepatitis E virus seroprevalence among farmers, veterinarians and control subjects in Jilin province, Shandong province and Inner Mongolia Autonomous Region, China. *J Med Virol*, 89, 872-877.
- KANTALA, T., KINNUNEN, P. M., ORISTO, S., JOKELAINEN, P., VAPALAHTI, O. & MAUNULA, L. 2017. Hepatitis E Virus Antibodies in Finnish Veterinarians. *Zoonoses Public Health*, 64, 232-238.
- KRAIN, L. J., NELSON, K. E. & LABRIQUE, A. B. 2014. Host immune status and response to hepatitis E virus infection. *Clinical microbiology reviews*, 27, 139-165.
- LANGE, H., OVERBO, J., BORGES, K., DUDMAN, S., HODDEVIK, G., URDAHL, A. M., VOLD, L. & SJURSETH, S. K. 2017. Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiol Infect*, 145, 181-186.
- LEWIS, H. C., WICHMANN, O. & DUIZER, E. 2010. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect*, 138, 145-66.
- MENG, X., WISEMAN, B., ELVINGER, F., GUENETTE, D., TOTH, T., ENGLE, R., EMERSON, S. & PURCELL, R. 2002. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *Journal of clinical microbiology*, 40, 117-122.
- MERINO-RAMOS, T., MARTIN-ACEBES, M. A., CASAL, J., SAIZ, J. C. & LOZARUBIO, E. 2016. Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Antibodies in Mexican Pigs. *Food Environ Virol*, 8, 156-9.
- MESQUITA, J. R., MYRMEL, M., STENE-JOHANSEN, K., ØVERBØ, J. & NASCIMENTO, M. S. J. 2016. A Public Health initiative on hepatitis E virus epidemiology, safety and control in Portugal – study protocol. *BMC Infectious Diseases*, 16, 1-5.

- PANDURO, A., ESCOBEDO MELENDEZ, G., FIERRO, N. A., RUIZ MADRIGAL, B., ZEPEDA-CARRILLO, E. A. & ROMAN, S. 2011. Epidemiology of viral hepatitis in Mexico. *Salud Pública Mex*, 53 Suppl 1, S37-45.
- PAVIO, N., MENG, X. J. & RENO, C. 2010. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res*, 41, 46.
- REDLINGER, T., O'ROURKE, K., NICKEY, L. & MARTINEZ, G. 1998. Elevated hepatitis A and E seroprevalence rates in a Texas/Mexico border community. *Tex Med*, 94, 68-71.
- RIO, D. C., ARES, M., HANNON, G. J. & NILSEN, T. W. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010, pdb. prot5439.
- RODRIGUEZ LAY LDE, L., QUINTANA, A., VILLALBA, M. C., LEMOS, G., CORREDOR, M. B., MORENO, A. G., PRIETO, P. A., GUZMAN, M. G. & ANDERSON, D. 2008. Dual infection with hepatitis A and E viruses in outbreaks and in sporadic clinical cases: Cuba 1998-2003. *J Med Virol*, 80, 798-802.
- VAN DER POEL, W. H. M., DALTON, H. R., JOHNE, R., PAVIO, N., BOUWKNEGT, M., WU, T., COOK, N. & MENG, X. J. 2018. Knowledge gaps and research priorities in the prevention and control of hepatitis E virus infection. *Transbound Emerg Dis*, 65, 22-29.
- VELAZQUEZ, O., STETLER, H. C., AVILA, C. & ET AL. 1990. Epidemic transmission of enterically transmitted non-a, non-b hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA*, 263, 3281-3285.
- WHO. 2017. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>.
- YAMADA, H., TAKAHASHI, K., LIM, O., SVAY, S., CHUON, C., HOK, S., DO, S. H., FUJIMOTO, M., AKITA, T., GOTO, N., KATAYAMA, K., ARAI, M. & TANAKA, J. 2015. Hepatitis E Virus in Cambodia: Prevalence among the General Population and Complete Genome Sequence of Genotype 4. *PLoS One*, 10, e0136903.

ZHANG, L., LI, K., HUANG, S., LIU, D., REHMAN, M. U., LAN, Y., ZHANG, H., WANG, L., HAO, Y., IQBAL, M. K., MEHMOOD, K., CHAMBA, Y. & LI, J. 2017. Seroprevalence and risk factors associated with hepatitis E virus infections among people and pigs in Tibet, China. *Acta Trop*, 172, 102-106.

## **4. CAPÍTULO 4**

### **Diversidad Viral en una Muestra de Heces de Cerdo**

Gracias a la utilización de la secuenciación masiva como técnica para la obtención del genoma completo de hepatitis E, se obtuvieron algunas secuencias virales de otros géneros que afectan a cerdos, lo cual se consideró un hallazgo relevante para describirlo. Estos virus se analizaron siguiendo el mismo proceso realizado para el virus de hepatitis E con el objetivo de obtener los mayores fragmentos génicos posibles y determinar su relación filogenética con secuencias ya reportadas. Es importante mencionar que el enfoque de secuenciación fue dirigido a encontrar secuencias con PoliA, lo cual representa un sesgo en los resultados obtenidos. Así mismo, debido a la profundidad de secuenciación no se puede asumir que los virus encontrados son los únicos presentes en las muestras.

#### **4.1 Introducción**

El desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido poner al alcance de los investigadores técnicas que anteriormente eran demasiado costosas para la obtención y análisis de secuencias genómicas. Entre ellas la secuenciación masiva ha sido uno de los grandes descubrimientos con aplicaciones para casi todas las áreas de la ciencia. Esta tecnología ha permitido obtener millones de lecturas de secuencias de ADN y ARN a partir de la muestra original, permitiendo así profundizar principalmente en áreas como la genética y virología (Mardis, 2008).

Las enfermedades infecciosas desempeñan un papel importante en la producción animal debido a las grandes pérdidas económicas que generan. Ha sido ampliamente reportado que los virus comprometen las defensas del huésped, lo que ocasiona una mayor susceptibilidad a las infecciones por patógenos primarios y secundarios que pueden afectar el rendimiento productivo, así como, aumentar la morbilidad y mortalidad lo que resulta en pérdidas económicas para los productores (Niederwerder et al., 2016). A nivel mundial, las coinfecciones son comunes en

cerdos en crecimiento y contribuyen a una variedad de síndromes de enfermedades polimicrobianas (Niederwerder, 2017). Diversos agentes virales han sido identificados y asociados a estos síndromes, sin embargo, en este capítulo solo haremos mención de tres de ellos que fueron encontrados al analizar los datos obtenidos.

Entre los virus que ocasionan síndromes multisistémicos se encuentra el circovirus porcino tipo 2 (PCV2 por sus siglas en inglés “porcine circovirus”), el cual fue descubierto en 1998 y desde entonces es reconocido como uno de los patógenos más importantes en la población porcina de todo el mundo. PCV2 induce un complejo de enfermedades ahora llamadas enfermedad asociada a PCV (PCVAD, por sus siglas en inglés PCV “associated-disease”) de las cuales la de mayor relevancia es el síndrome multisistémico de adelgazamiento posdestete (PMWS por sus siglas en inglés “postweaning multisystemic wasting syndrome”) que se caracteriza por disminución en la ganancia diaria de peso, postración, disnea, palidez, diarrea e ictericia. Los circovirus son partículas pequeñas esféricas sin envoltura (16–18 nm) con un genoma de ADN monocatenario y circular (1.7 kb) (Karuppanan and Opriessnig, 2017, Tribble and Rowland, 2012, Denner and Mankertz, 2017). Se encuentra clasificado en la familia *Circoviridae*, género circovirus, la cual incluye 29 especies que afectan a diferentes huéspedes, entre ellos murciélagos, aves, humanos y tres especies que afectan a cerdos (PCV 1-3) (ICTV, 2018). Entre las especies reportadas en cerdos el PCV2 es reconocido como el más patógeno y presenta la mayor distribución a nivel mundial (Segalés et al., 2016). El estudio de genomas de PCV2 ha permitido identificar tres genotipos principales: PCV2a, PCV2b y PCV2d, y dos genotipos con baja prevalencia: PCV2c y PCV2e (Karuppanan and Opriessnig, 2017).

Otro virus que ha sido asociado a enfermedad en cerdos es el astrovirus porcino (Sunil K. Mor 2012, Kattareeya Kumthip 2018). Los astrovirus (AstV) son virus de ARN monocatenario (6.7 kb) de sentido positivo y se encuentran clasificados dentro de la familia *Astroviridae*, la cual se divide en dos géneros, Mamastrovirus y

Avastrovirus, con 19 y 3 especies, respectivamente (Padmanabhan and Hause, 2016, ICTV, 2018). Se ha demostrado que muchas especies son susceptibles, incluidos los humanos, aves, vacas, murciélagos y cerdos (Reuter et al., 2012). La infección generalmente se manifiesta como diarrea y se consideran la segunda causa más frecuente de gastroenteritis en niños, después de los rotavirus; así mismo, ha sido reportada en casos de hepatitis severa en patos y han sido asociados a casos de encefalitis en muchas especies, incluidos los humanos y los cerdos (Arruda et al., 2017, Qin et al., 2018). Los astrovirus porcinos (PAstV) se descubrieron por primera vez en 1980 y actualmente se ha demostrado una alta prevalencia y diversidad genética en todo el mundo (Xiao et al., 2013). Hasta la fecha, se han identificado un total de cinco linajes genéticos conocidos (PAstV 1-5) que están circulando en la población porcina, lo cual implica un riesgo potencial para la producción porcina (Qin et al., 2018).

El pasivirus se encuentra clasificado en la familia Picornaviridae género pasivirus, ésta es una de las familias más diversa y comprende 80 especies divididas en 35 géneros que han sido detectadas en cinco de siete clases de vertebrados. Zell reporta que hasta septiembre de 2017, la base de datos de secuencias de nucleótidos del NCBI (GenBank) registra 100,000 secuencias con el término 'Picornaviridae', y este número aumenta aproximadamente 1000 secuencias cada mes (Zell, 2018). Específicamente, el género Pasivirus comprende una sola especie (A) que afecta a cerdos y se considera la cepa de referencia JQ316470 (No de acceso del GenBank). El descubrimiento de los pasivirus se realizó en heces de cerdos saludables en Francia en 2012 y actualmente se conoce comúnmente como SPaV (por sus siglas en inglés "swine pasivirus A") (Sauvage et al., 2012). Los picornavirus son virus pequeños de ARN monocatenario de sentido positivo sin envoltura, con longitudes que van desde 6.7 kilobases (picornavirus de foca) a 10.1 kilobases (megrivirus de ganso) (Zell, 2018). En el caso particular de SPaV, el genoma tiene una longitud de 6.8 kb aproximadamente, del cual 6,412 nucleótidos del genoma codifican una poliproteína flanqueada por secuencias no codificantes

en los extremos 5' y 3' (Guo et al., 2018). Existe poca información acerca de este virus sobre genotipos e incluso sobre epidemiología o patogénesis y en la mayoría de los casos han sido encontrados como un hallazgo incidental.

La presencia de estos virus en las heces de cerdos podría estar relacionado a la presencia de enfermedades en los animales. Sin embargo, es difícil hacer una asociación entre la presencia del agente y la presencia de signos clínicos. Es necesario generar información sobre este tipo de hallazgos para promover la investigación y continuar el esfuerzo para dilucidar mecanismos de infección de agentes patógenos. En el presente estudio se reporta el hallazgo de tres virus patógenos para cerdos en muestras de heces de animales sanos.

## **4.2 Material y métodos**

El proceso de obtención de las muestras, técnicas de extracción, secuenciación masiva y análisis bioinformático se encuentran descritos ampliamente en el capítulo 1, y estos resultados son parte del mismo proceso; por lo tanto, solo se hará mención del análisis filogenético utilizado para los virus estudiados en el presente capítulo.

### **4.2.1 Análisis filogenético**

Todos los alineamientos de referencia se realizaron con el programa ClustalW. Se calculó el mejor modelo evolutivo de acuerdo a cada conjunto de datos y los árboles filogenéticos se infirieron usando el método de Máxima Verosimilitud con un bootstrap de 1000. Los valores de Bootstrap menores a 60 fueron omitidos. Los análisis se llevaron a cabo con el programa MEGA7.

Circovirus Porcino. El análisis filogenético se realizó con 21 secuencias representativas de circovirus porcino reportadas en GenBank que incluyen los 7 genotipo descritos en cerdos (a-h) (Franzo and Segales, 2018). La secuencia obtenida en este estudio se añadió posteriormente con el programa MAFFT versión

MAFFT-AD. El árbol filogenético se calculó mediante el modelo Hasegawa-Kishino-Yano.

Astrovirus Porcino. Se descargaron todas las secuencias de genoma completo reportadas en GenBank a enero 2019 para los Astrovirus porcinos (Astrovirus porcino 2-5 y Masastrovirus 3), así como algunas secuencias de astrovirus obtenidas a partir de otros hospederos que se encuentran cercanas filogenéticamente a los astrovirus porcinos (65 secuencias). Se eliminaron secuencias >98% de similitud (-c .98) mediante el programa cd-hit 4.6.8. El árbol filogenético se infirió utilizando el modelo GTR G.

Pasivirus. Se obtuvieron todas las secuencias de genoma completo reportadas en GenBank de Pasivirus a enero del 2019 (7 secuencias), así como una secuencia de un virus Parechovirus-like que se encuentra altamente relacionado con los pasivirus y un potamipivirus de anguila como “outgroup” (GenBank KC843627.1) (Zell, 2018). El árbol filogenético se infirió utilizando el modelo GTR G.

### 4.3 Resultados

Se encontraron secuencias virales pertenecientes a nueve virus diferentes de los cuales cuatro afectan a cerdos, incluyendo el virus de hepatitis E descrito en el capítulo 1. En cada muestra se obtuvieron virus diferentes y los resultados detallados se pueden observar en el cuadro 1.

Cuadro 1. Secuencias virales encontradas en el análisis de secuenciación masiva de las muestras de bilis, hígado y heces de cerdos.

<b>Muestra</b>	<b>Virus</b>	<b>No. De “Reads”</b>	<b>Mayor “Contig”</b>
B1	Mastadenovirus	9	69

B1	Hepatitis E	1968	7223
C3A	Human Mastadenovirus C	49	70
C3A	Circovirus porcino 2	42	352
C3A	Astrovirus porcino	2895	6641
C3A	Hepatitis E	30	1313
C3A	Pasivirus A	427	805
H2	Adenovirus Humano 6	94	193
H2	Hepatitis E	188	1473
H3	Pbunaliikevirus	1	55
H3	Zaliv Terpenia Virus	11730	89
C5A	Mastadenovirus	33	124

Entre los virus encontrados, se descartaron aquellos que solo presentaban una secuencia (“read”) o que varios “reads” mapean solamente una zona de un genoma de referencia. Por lo tanto, no se analizaron los mastadenovirus de las muestras B1, C3A y C5A, el adenovirus humano 6 de la muestra H2, el pbunaliikevirus y el zaliv terpenia virus de la muestra H3. El virus de hepatitis E es el reportado en el capítulo 1 y no se hará mención de él en el presente capítulo. Los virus que se analizaron y que coincidentemente son aquellos que afectan a los cerdos son el circovirus porcino tipo 2, astrovirus porcino 2 y pasivirus A.

#### 4.3.1 Circovirus porcino

El ensamble de los “reads” produjo una secuencia consenso de circovirus de 531 bases (29.8% del genoma viral) localizada de la base 1037 a la 1568 con un gap de 43 nt en la posición 1371-1414, de acuerdo con la referencia de mayor similitud (No. De GenBank MH922992.1). EL análisis filogenético demuestra que el virus encontrado se agrupa con las secuencias de cerdo de subgenotipo 2d (figura 1).

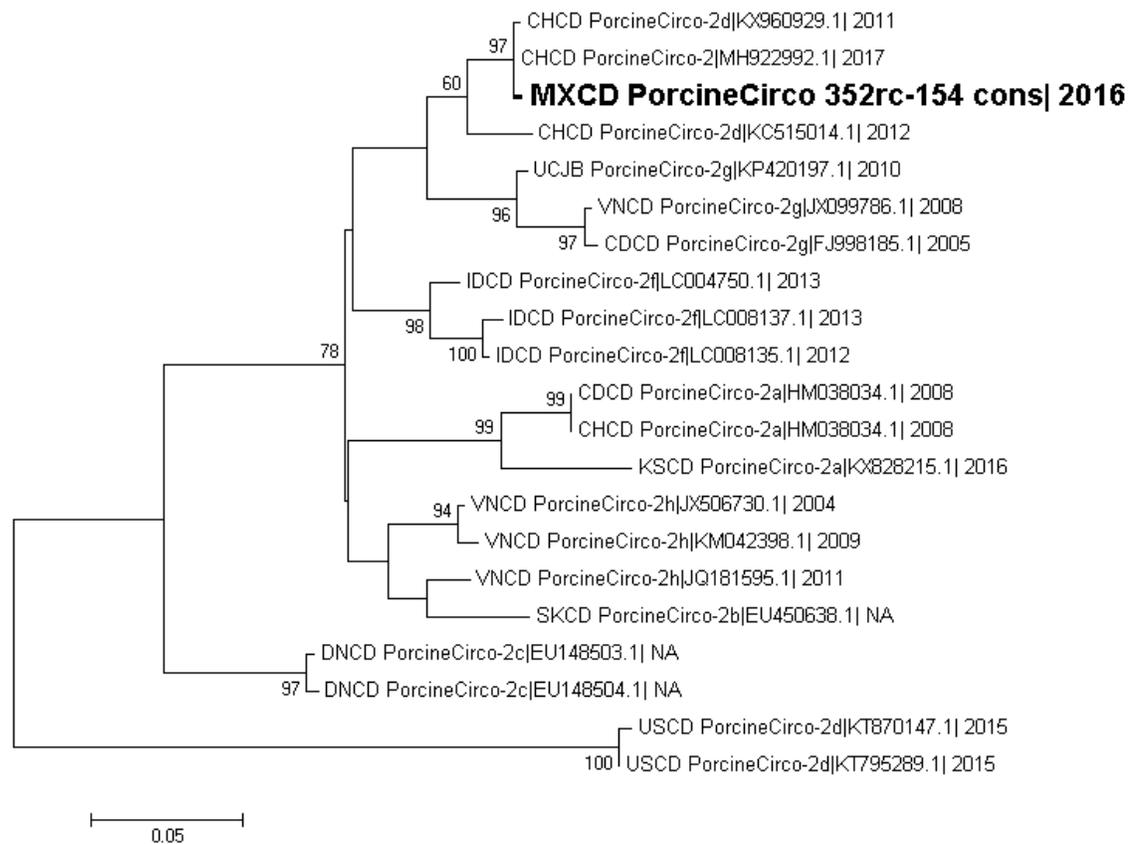


Figura 1. Árbol filogenético construido con secuencias derivadas de genomas completos de circovirus, incluyendo la secuencia parcial de 531 bases encontrada en este estudio (identificada en negritas). La inferencia evolutiva se realizó con el método de Máxima Verosimilitud, modelo de Hasegawa-Kishino-Yano y un valor de bootstrap de 1000. Los valores de bootstrap menores a 60 fueron omitidos.

#### 4.3.2 Astrovirus Porcino

Por medio del ensamble de los “reads” se pudo obtener una secuencia consenso de 6,641 nucleótidos (99% del genoma viral) que se alinea de la posición 73 a 6,714 con la secuencia más similar reportada, reportada en Kenya en 2012 a partir de heces de cerdo (No. de Acceso GenBank KY933398.1). Se puede observar que la secuencia obtenida se agrupa a aquellas reportadas en cerdos domésticos y salvajes, pertenecientes al Astrovirus Porcino 4 (figura 2).

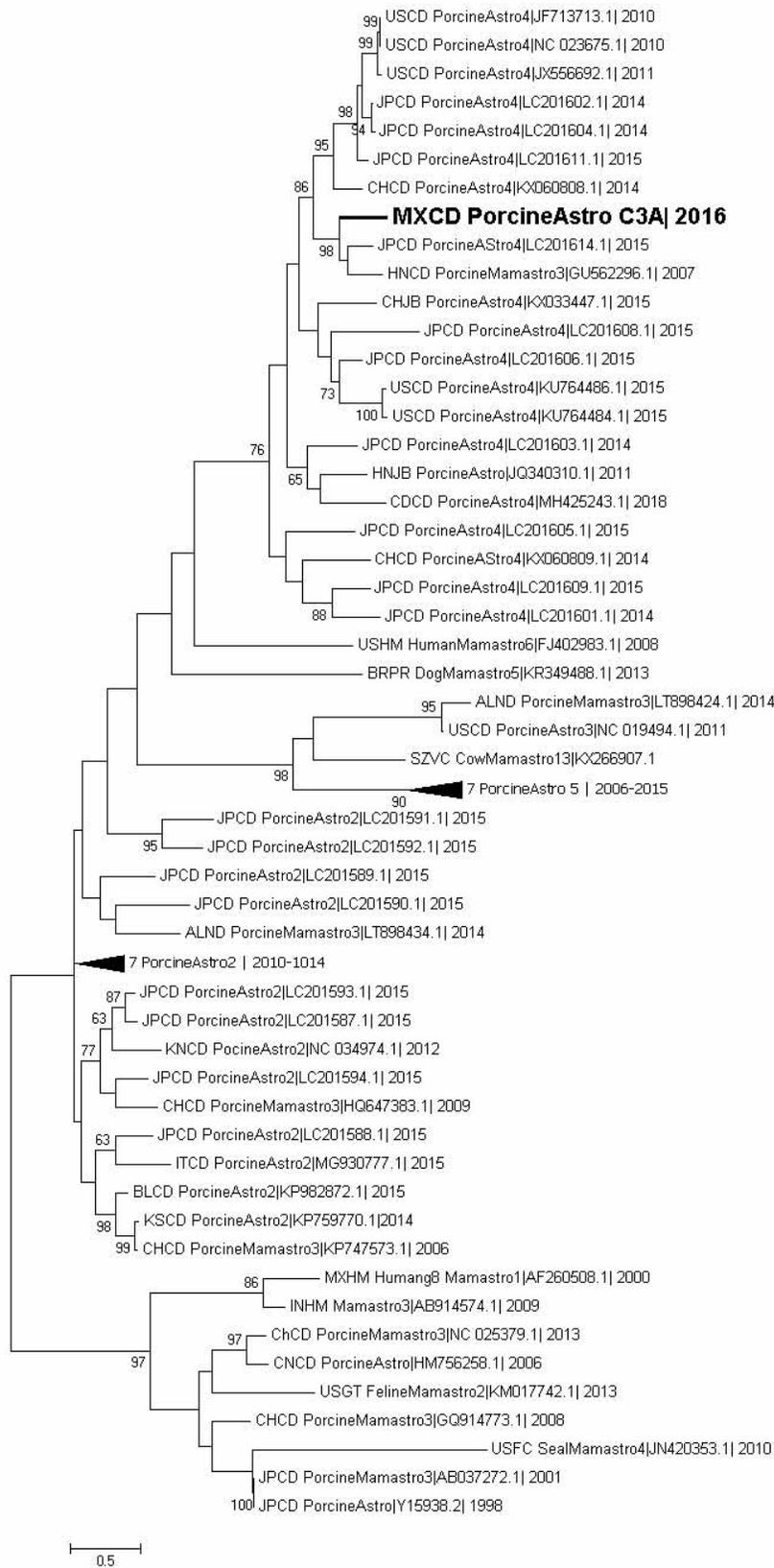


Figura 2. Árbol filogenético de secuencias de genoma completo de astrovirus porcino que incluye 65 secuencias reportadas en cerdos y otras especies alrededor del mundo al 2018 y la secuencia de 6,641 bases (99% del genoma) encontrada en el presente estudio (identificada en negritas). El árbol filogenético se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR con un modelo de distribución Gamma, con un Bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores de bootstrap menores a 60 fueron omitidos.

#### 4.3.3 Pasivirus

El ensamble de los “reads” produjo una secuencia consenso de pasivirus de 1,174 bases (17% del genoma viral) localizadas de la base 5657 a la 6831 de acuerdo con la referencia de mayor similitud, el Parechovirus-like virus reportado en Cina en el año 2010 (No. de acceso GenBank JX491648.1). EL análisis filogenético demostró que el virus encontrado se agrupó con las secuencias reportadas previamente de Pasivirus Porcino (figura 3).



Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias de genoma completo reportadas de pasivirus. Se incluyeron 10 secuencias para el análisis; incluyendo la secuencia parcial de 1,174 bases encontrada en este estudio (identificada en negritas), y una secuencia de Potamipivirus como “outgroup”. La inferencia evolutiva se realizó con el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo GTR con una distribución gamma discreta y con un valor de bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores de bootstrap menores a 60 fueron omitidos.

Se realizó un análisis mediante el programa Blast (NCBI) par la determinación de similitud. Los resultados para cada secuencia consenso obtenida se pueden observar en el cuadro 2.

Cuadro 2. Porcentaje de similitud de nucleótidos de las secuencias consenso de circovirus, astrovirus y pasivirus obtenidas en este estudio. Solamente se reportan las cinco secuencias más similares para cada uno de los virus.

Virus	Identificación	Similitud (%)
Circovirus Porcino	CHCD_PorcineCirco-2d KX960929.1 _20	100%
	TLCD_PorcineCirco-2d MF314285.1 _20	99%
	CHCD_PorcineCirco-2d KC515014.1 _20	97%
	UCJB_PorcineCirco-2g KP420197.1 _20	96%
	VNCD_PorcineCirco-2g JX099786.1 _20	95%
Astrovirus Porcino	JPCD_PorcineAstro4 LC201604.1 _2014	88%
	USCD_PorcineAstro4 JX556692.1 _2011	85%
	CDCD_PorcineAstro4 MH425243.1 _2018	87%
	JPCD_PorcineAstro4 LC201605.1 _2015	85%
	JPCD_PorcineAstro4 LC201602.1 _2014	84%
Pasivirus Porcino	CHCD_ParechovirusLike JX491648.1 _20	88%
	USCD_SwinePasivirus MG674090.1 _20	86%
	ALCD_SwinePasivirus LT898442.1 _2014	84%
	ALCD_SwinePasivirus LT898422.1 _2015	84%
	ALCD_SwinePasivirus LT898429.1 _2014	84%

#### **4. 4 Discusión y conclusiones**

Los cerdos son una fuente importante para el suministro de alimentos de origen proteico en todo el mundo. Es importante promover la salud y el bienestar de los cerdos para satisfacer la creciente demanda de alimentos para una población humana en rápido crecimiento en el mundo. Así mismo, los cerdos han sido reconocidos como un reservorio para una serie de enfermedades zoonóticas humanas. Por lo tanto, es necesario monitorear la prevalencia de virus en estos animales para evaluar el riesgo y el impacto en la salud humana y animal. La investigación de las enfermedades virales con el uso de las nuevas tecnologías para secuenciación de ácidos nucleicos provee de herramientas para el desarrollo de estas estrategias con fundamentos científicos actuales y enfocados en zonas geográficas particulares.

En este estudio se reporta el hallazgo de tres virus de importancia en la producción porcina: Circovirus Porcino 2, Astrovirus Porcino y Pasivirus. Estos virus fueron encontrados en una muestra de heces positiva a VHE de un cerdo aparentemente sano, que, sin embargo, presentaba un atraso en el crecimiento en comparación con la camada a la que pertenecía. Estos tres virus han sido ampliamente reportados en heces de cerdos y han sido asociados a enfermedades entéricas y otras presentaciones clínicas que incluyen síndromes multisistémicos ocasionados por coinfecciones (Eddicks et al., 2018, Zaulet et al., 2017, Vilcek et al., 2018). En México se ha descrito la presencia de PCV2 en cerdos, el astrovirus solo ha sido reportado en humanos y conejos y el pasivirus no había sido reportado previamente, sin embargo, mediante un estudio metagenómico de hisopos rectales de cerdos, realizado en el sureste de Estados Unidos, se reportó la presencia de pasivirus (Bedolla Lopez et al., 2018, Ramirez-Mendoza et al., 2009, Hause et al., 2016, Almazán, 2017).

En cuanto a PCV2, se encontró un contig de 531 bases que cubre el 30% del genoma del virus ya que los PCV son los virus más pequeños que se replican en células de mamíferos. EL análisis filogenético demostró que el contig se agrupaba

con secuencias de referencia de cerdo identificadas como subgenotipo 2d previamente reportadas en Estados Unidos, China y Vietnam. Siendo un virus distribuido mundialmente, la relación filogenética con esos virus puede deberse al comercio de animales y sub-productos entre países. Es relevante mencionar que el PCV2 es un virus inmunosupresor, que tiene como blanco los tejidos linfoides, lo cual reduce la capacidad del huésped para responder a patógenos primarios y secundarios (Niederwerder et al., 2016, Denner and Mankertz, 2017). Esta característica del virus promueve su implicación en diversos síndromes que afectan a los cerdos. Entre las enfermedades asociadas (PCVDA) se encuentran el PMWS, el complejo respiratorio porcino, la dermatitis porcina y síndrome de nefropatía (PDNS), la infección subclínica de PCV2 (PCV2-SI) y la enfermedad reproductiva de PCV2 (PCV2-RD) (Denner and Mankertz, 2017, Chae, 2005). Una cuestión interesante es que la presencia del virus es necesaria, pero no suficiente para la inducción de PCVDA, y algunos de los virus con los cuales suele encontrarse produciendo estas enfermedades son el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés) y el parvovirus porcino (Mak et al., 2018, Chae, 2005). Sin embargo, otros factores involucrados pueden ser el estado de nutrición, el hacinamiento o la vacunación y suele mantenerse en el entorno de los cerdos por largos periodos de tiempo (Denner and Mankertz, 2017). Otra cualidad del virus que complica su control y erradicación es su alta tasa evolutiva estimada en  $1.2 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año, la más alta entre los virus de ADN comparables (Karuppannan and Opriessnig, 2017). Por todas estas razones, es importante generar información del virus que sirva para descifrar su evolución molecular y epidemiología.

Con relación a la secuencia de astrovirus analizada, se obtuvo una secuencia de 6,641 nucleótidos lo que representa el 99% de cobertura del genoma de referencia (6.7 kb). En el árbol filogenético se puede observar que el genoma obtenido se agrupa con las secuencias reportadas previamente en cerdos domésticos y salvaje de Astrovirus Porcino 4. Estas secuencias han sido reportadas en países como

China y Japón, sin embargo, también se agrupa con secuencias reportadas recientemente en Estados Unidos (2011 y 2015). Los astrovirus se asocian comúnmente con diarrea y síntomas gastrointestinales, adicionalmente, también han sido asociados a otras presentaciones clínicas como enfermedades respiratorias y encefalitis (Mendez et al., 2014, Vu et al., 2016). La relevancia de los astrovirus radica en la gran variedad de huéspedes que infecta; así como los estudios que demuestran que se han producido eventos de recombinación entre astrovirus que afectan diferentes especies animales (Donato and Vijaykrishna, 2017, Wohlgemuth et al., 2019). Estos hallazgos podrían implicar que los astrovirus pueden tener un potencial zoonótico con importancia para la salud pública (Qin et al., 2018). La amplia distribución y su rápida propagación también están relacionadas a las pérdidas económicas que ocasiona, y los problemas de salud pública que genera (Qin et al., 2018). Es importante mencionar que el astrovirus identificado en el presente estudio solo es 86% similar a la secuencia más cercana reportada en GenBank. Es necesario impulsar el interés en estos virus para profundizar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos, la transmisión, la eliminación de virus y la dinámica de infección.

Finalmente se obtuvo una secuencia de 1,174 bases del pasivirus A la cual correspondió a una cobertura del 17%. La secuencia se encuentra más asociada al Parechovirus-like virus reportado en China en el año 2010 a partir de heces de cerdo. Los autores que reportan este virus describen que, simultáneo a su publicación, se reportó la aparición del Pasivirus Porcino 1 (SPaV-1); y que estos virus comparten un 82% de identidad de nucleótidos y un 89% de identidad de aminoácidos, y probablemente pertenecen al mismo género nuevo de Picornavirus (Yu et al., 2013). De manera general, los picornavirus causan una amplia gama de enfermedades, tienen una gran variedad de hospedadores y algunos de ellos son zoonóticos (enfermedad vesicular porcina, fiebre aftosa, encefalomiocarditis). Clínicamente la infección por pasivirus es asintomática en lechones, sin embargo, se han realizado pocos estudios con respecto a este virus y no hay información

sobre la mecánica de su patogenicidad (Zaulet et al., 2017). A la fecha se han reportado secuencias de SPaV en China, Hungría, Alemania, Rumania y recientemente en Estados Unidos en muestras del 2001, lo cual indica que es posible que haya estado circulando antes de lo que se podría pensar (Guo et al., 2018). El descubrimiento de estos virus es reciente y debido a esta situación la información es escasa. La publicación de secuencias de estos virus puede favorecer la investigación en el tema para determinar su importancia en los procesos de infección en cerdos.

Es importante mencionar que el presente estudio no debe tomarse en cuenta como un análisis metagenómico de la muestra de heces de cerdo. Si bien fue posible encontrar secuencias virales distintas a la del VHE, la metodología utilizada presenta limitaciones como una relativa baja profundidad, el bajo porcentaje de secuencias virales obtenidas (debido a la mala calidad) y a la falta de enriquecimiento de la biblioteca para encontrar secuencias virales (solamente para PoliA). Sin embargo, consideramos que el reporte de este hallazgo es relevante como parte del presente estudio.

En conclusión, los virus son una causa importante de problemas de salud en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo. El estudio de los virus presentes en las poblaciones tanto humanas como animales, así como el descubrimiento de nuevos virus es importante para desarrollar estrategias de prevención y control. Desde el siglo pasado, las técnicas diagnósticas para el estudio de virus se han desarrollado, basados en el aislamiento viral a través de cultivos celulares y PCR independiente de un iniciador específico para la identificación de diferentes virus en una muestra. Recientemente el uso de secuenciación masiva ha cambiado el campo del descubrimiento y estudio de virus al permitir el estudio de poblaciones heterogéneas y con una alta sensibilidad, todo esto en parte debido al avance bioinformático para el almacenamiento y procesamiento de conjuntos masivos de datos (Datta et al., 2015). Gracias a estas nuevas tecnologías ha sido posible comprender muchas enfermedades virales y

profundizar en estudios epidemiológicos poblacionales. Esto ha permitido incrementar el análisis de enfermedades virales en cerdos, donde la medicina se realiza de manera poblacional. Es importante considerar que las prácticas de producción de cerdos han cambiado en las últimas dos décadas en donde ha aumentado la densidad de población en todo el mundo debido a la alta demanda. Estas condiciones propician la aparición de enfermedades que deben idealmente ser monitoreadas. Así mismo, los cerdos han sido reconocidos como un reservorio para una serie de enfermedades zoonóticas. Por lo tanto, es necesario conocer la presencia y prevalencia de virus en los cerdos para evaluar el riesgo y el impacto en la salud animal y humana.

#### **4.5 Referencias**

- ALMAZÁN, G. L. A. 2017. Diagnóstico molecular de Norovirus y Astrovirus en conejos de la zona sur oriente del Estado de México. Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Autónoma del Estado de México.
- ARRUDA, B., ARRUDA, P., HENSCH, M., CHEN, Q., ZHENG, Y., YANG, C., GATTO, I. R. H., FERREYRA, F. M., GAUGER, P., SCHWARTZ, K., BRADNER, L., HARMON, K., HAUSE, B. & LI, G. 2017. Porcine Astrovirus Type 3 in Central Nervous System of Swine with Polioencephalomyelitis. *Emerg Infect Dis*, 23, 2097-2100.
- BEDOLLA LOPEZ, F., TRUJILLO ORTEGA, M. E., MENDOZA ELVIRA, S., QUINTERO RAMIREZ, V., ALONSO MORALES, R., RAMIREZ-MENDOZA, H. & SANCHEZ-BETANCOURT, J. I. 2018. Identification and genotyping of porcine circovirus type II (PCV2) in Mexico. 29, 385-389.
- CHAE, C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J*, 169, 326-36.

- DATTA, S., BUDHAULIYA, R., DAS, B., CHATTERJEE, S., VANLALHMUAKA & VEER, V. 2015. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses. *World journal of virology*, 4, 265-276.
- DENNER, J. & MANKERTZ, A. 2017. Porcine Circoviruses and Xenotransplantation. *Viruses*, 9.
- DONATO, C. & VIJAYKRISHNA, D. 2017. The Broad Host Range and Genetic Diversity of Mammalian and Avian Astroviruses. *Viruses*, 9.
- EDDICKS, M., BEUTER, B., STUHL DREIER, R., NOLTE, T., REESE, S., SUTTER, G., RITZMANN, M. & FUX, R. 2018. Cross-sectional study on viraemia and shedding of porcine circovirus type 2 in a subclinically infected multiplier sow herd. *Vet Rec*.
- FRANZO, G. & SEGALES, J. 2018. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. 13, e0208585.
- GUERRERO, C. A., BOUYSSOUNADE, D., ZÁRATE, S., IŠA, P., LÓPEZ, T., ESPINOSA, R., ROMERO, P., MÉNDEZ, E., LÓPEZ, S. & ARIAS, C. F. 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *Journal of virology*, 76, 4096-4102.
- GUO, B., KIM, H., ZHENG, Y., SHEN, H., POGRANICHNIY, R. M., SCHWARTZ, K. J., LI, G. & YOON, K. J. 2018. Genomic Sequence of a Swine Pasivirus Type 1 Strain Identified in U.S. Swine. *Genome Announc*, 6.
- HAUSE, B. M., DUFF, J. W. & SCHEIDT, A. 2016. Virus detection using metagenomic sequencing of swine nasal and rectal swabs. *Journal of Swine Health and Production*, 24, 304-308.
- ICTV. 2018. Available: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- KARUPPANNAN, A. K. & OPRIESSNIG, T. 2017. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. *Viruses*, 9.
- MAK, C. K., YANG, C., JENG, C. R., PANG, V. F. & YEH, K. S. 2018. Reproductive failure associated with coinfection of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can Vet J*, 59, 525-530.

- MARDIS, E. R. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24, 133-141.
- MENDEZ, E., MUNOZ-YANEZ, C., SANCHEZ-SAN MARTIN, C., AGUIRRE-CRESPO, G., BANOS-LARA MDEL, R., GUTIERREZ, M., ESPINOSA, R., ACEVEDO, Y., ARIAS, C. F. & LOPEZ, S. 2014. Characterization of human astrovirus cell entry. *J Virol*, 88, 2452-60.
- NIEDERWERDER, M. C. 2017. Role of the microbiome in swine respiratory disease. *Vet Microbiol*, 209, 97-106.
- NIEDERWERDER, M. C., JAING, C. J., THISSEN, J. B., CINO-OZUNA, A. G., MCLOUGHLIN, K. S. & ROWLAND, R. R. 2016. Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical outcomes following co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol*, 188, 1-11.
- PADMANABHAN, A. & HAUSE, B. M. 2016. Detection and characterization of a novel genotype of porcine astrovirus 4 from nasal swabs from pigs with acute respiratory disease. *Arch Virol*, 161, 2575-9.
- QIN, Y., FANG, Q., LIU, H., JI, C., CHEN, Y., OUYANG, K. & WEI, Z. 2018. Construction of a reverse genetic system for porcine astrovirus. 163, 1511-1518.
- RAMIREZ-MENDOZA, H., CASTILLO-JUAREZ, H., HERNANDEZ, J., CORREA, P. & SEGALES, J. 2009. Retrospective serological survey of Porcine circovirus-2 infection in Mexico. *Can J Vet Res*, 73, 21-4.
- REUTER, G., NEMES, C., BOROS, A., KAPUSINSZKY, B., DELWART, E. & PANKOVICS, P. 2012. Astrovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Hungary. *Arch Virol*, 157, 1143-7.
- SALEHI, M., KALBASI, N., SALEHI, H., KASSAIAN, N., SALEHI, M., KHORVASH, F. & SALEHI, M. M. 2014. Hepatitis G virus exposure in dialysis patients and blood donors in Isfahan-Iran. *International Journal of Preventive Medicine*, 5, S219-S222.

- SAUVAGE, V., AR GOUILH, M., CHEVAL, J., MUTH, E., PARIENTE, K., BURGUIERE, A., CARO, V., MANUGUERRA, J. C. & ELOIT, M. 2012. A member of a new Picornaviridae genus is shed in pig feces. *J Virol*, 86, 10036-46.
- SEGALÉS, J., BARCELLOS, D., ALFIERI, A., BURROUGH, E. & MARTHALER, D. 2016. Senecavirus A: An Emerging Pathogen Causing Vesicular Disease and Mortality in Pigs? *Veterinary Pathology*, 54, 11-21.
- TAM, A. W., SMITH, M. M., GUERRA, M. E., HUANG, C.-C., BRADLEY, D. W., FRY, K. E. & REYES, G. R. 1991. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 185, 120-131.
- TRIBLE, B. R. & ROWLAND, R. R. 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res*, 164, 68-77.
- VILCEK, S., SALAMUNOVA, S. & JACKOVA, A. 2018. Genetic identification of astroviruses in wild boars. *J Vet Sci*.
- VU, D. L., CORDEY, S., BRITO, F. & KAISER, L. 2016. Novel human astroviruses: Novel human diseases? *J Clin Virol*, 82, 56-63.
- WHO. 2017. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>.
- WOHLGEMUTH, N., HONCE, R. & SCHULTZ-CHERRY, S. 2019. Astrovirus evolution and emergence. *Infect Genet Evol*.
- XIAO, C. T., GIMENEZ-LIROLA, L. G., GERBER, P. F., JIANG, Y. H., HALBUR, P. G. & OPRIESSNIG, T. 2013. Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. *J Gen Virol*, 94, 570-82.
- YU, J. M., LI, X. Y., AO, Y. Y., LI, L. L., LIU, N., LI, J. S. & DUAN, Z. J. 2013. Identification of a novel picornavirus in healthy piglets and seroepidemiological evidence of its presence in humans. *PLoS One*, 8, e70137.
- ZAULET, M., PETROVAN, V., BIRLADEANU, A. M., STOIAN, A. M. M., KEVORKIAN, S. E. M., NICHITA, C., ELOIT, M. & BUBURUZAN, L. 2017.

Identification and prevalence of swine pasivirus 1 in eastern Romanian pig farms. *J Vet Diagn Invest*, 29, 305-311.

ZELL, R. 2018. Picornaviridae-the ever-growing virus family. *Arch Virol*, 163, 299-317.

## **5. ANEXOS**

5.1 Anexo 1. Artículo científico. Disponible públicamente en:  
<https://doi.org/10.3390/v10080391>.

Article

# Phylogenetic Analysis and Characterization of the Complete Hepatitis E Virus Genome (Zoonotic Genotype 3) in Swine Samples from Mexico

Alicia Sotomayor-González <sup>1</sup> , María E. Trujillo-Ortega <sup>2,3</sup>, Blanca I. Taboada-Ramírez <sup>4</sup> , Carlos Sandoval-Jaime <sup>4</sup>  and Rosa E. Sarmiento-Silva <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Laboratory of Virology, Microbiology and Immunology Department, Veterinary Medicine and Husbandry Faculty, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico; mvzaliciasotomayor@gmail.com

<sup>2</sup> Academic Council of the Biological, Chemical and Medical Sciences, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico; elenam@unam.mx

<sup>3</sup> Swine Medicine and Husbandry Department, Veterinary Medicine and Husbandry Faculty, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico

<sup>4</sup> Biotechnology Institute (IBT), National Autonomous University of Mexico (UNAM), Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; btaboada@ibt.unam.mx (B.I.T.-R.); carlossj@ibt.unam.mx (C.S.-J.)

\* Correspondence: rosass@unam.mx; Tel.: +55-56225900

Received: 15 June 2018; Accepted: 23 July 2018; Published: 26 July 2018



**Abstract:** Hepatitis E virus (HEV) is an emerging public health problem with an estimated 20 million infections each year. In Mexico, *Orthohepevirus A*, genotype 2, has been reported in humans, but genotype 3 has only been reported in swine (zoonotic). No diagnostic tests are publicly available in Mexico, and only partial sequences have been reported from swine samples. Hence, research is necessary to determine circulating strains, understand the features and dynamics of infection on pig farms, determine how to implement surveillance programs, and to assess public health risks. In this study, a next-generation sequencing (NGS) approach was applied to obtain a complete genome of swine HEV. Liver, feces, and bile samples were taken at slaughterhouses and a farm in Mexico. RT-PCR was used to determine positive samples and confirmed by Sanger sequencing. Of the 64 slaughterhouse samples, one bile sample was positive (B1r) (1.56%). Of 21 sample pools from farm animals, 14 were positive (66.66%), representing all stages of production. A complete sequence strain MXCDg3\_B1c|\_2016 was obtained from the bile of a domestic swine in the fattening stage. In addition, two partial sequences—MXCDg3\_H2cons|\_2016 (1473 nt) and MXCDg3\_C3Acons|\_2016 (4777 nt)—were obtained from sampled farm animals. Comparison with all reported genome HEV sequences showed similarity to genotype 3 subgenotype a (G3a), which has been previously reported in acute cases of human hepatitis in the US, Colombia, China, and Japan.

**Keywords:** hepatitis E; hepatitis; swine; zoonosis; bile; characterization

## 1. Introduction

Viral hepatitis is considered as one of the main causes of hepatic disease in humans worldwide. Five known viruses have been associated with hepatitis: hepatitis A virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, hepatitis D virus, and hepatitis E virus. However, of these, only hepatitis E has been reported as a zoonotic disease. Hepatitis E is an emerging public health problem, and in many countries the disease is known to cause epidemics [1,2]. The World Health Organization (WHO) website reports that there are an estimated 20 million hepatitis E infections each year of which 3 million have an acute presentation resulting in up to 56,600 deaths [3].

Hepatitis E virus (HEV) capsid is 27–34 nm in diameter with icosahedral symmetry and a single-stranded, positive-sense RNA genome of 7.2 kb. The viral genome contains short non-coding regions (IRES) of 27–35 nucleotides (nt) at the 5' end and 65–75 nt in the 3' region, with a poly A tail. It contains three discontinuous, partially superimposed open reading frames (ORF1–3) [4,5]. The large ORF1 encodes the non-structural proteins, which contain conserved peptide domains essential for viral replication and consist mainly of methyltransferase, protease, macrodomain, helicase, and an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). It also encodes for the X, Y, and V (variable) domains of unknown functions [6]. ORF2 and ORF3 overlap and are translated from a single bicistronic subgenomic RNA that is 2.2 kb in length [7]. ORF2 encodes the structural capsid for which three different forms have been reported—infectious/intracellular (ORF2i), glycosylated (ORF2g), and cleaved (ORF2c) [8–10]. The protein has three defined domains: S (shell), M (middle), and P (protruding) composed of amino acid residues 118–313, 314–453, and 454–606, respectively. ORF3 encodes a 113 or 114 aa phosphoprotein that is involved in assembling and releasing viruses [1,11].

HEV is classified in the genus *Orthohepevirus*, which is divided into four species as follows: *Orthohepevirus B* viruses affect birds, *Orthohepevirus C* viruses affect small mammals and rodents, *Orthohepevirus D* virus has only been found in bats, and *Orthohepevirus A* viruses have been found in various mammals, including deer, camels, rabbits, wild boars, swine, and humans. Swine are the principle reservoirs of the disease, and zoonotic transmission has been reported extensively. Specifically, transmission has been reported through consumption of uncooked pork products, with cases of grilled meat from a wild boar in Japan [12], raw pig liver sausages in France [13], and pork meat in Spain [14] directly being associated with the disease by genotyping of the patient sample and the food sample. Likewise, higher seroprevalence values have been found in people who work in close association with swine, such as farmworkers and slaughterhouse personnel [15–18]. In Bangladesh, 28% of pig handlers reported jaundice in a two-year period, whereas only 17% of people with no contact with swine reported jaundice [15]; swine veterinarians in the US were 1.51 times more likely to present HEV antibodies against swine HEV antigen [16], while swine farmers in Taiwan reported approximately 3.5-fold increased risk [17]. The presence of the virus in farms might also implicate a risk for environmental transmission, with contaminated water being associated with outbreaks [19–21].

Eight different genotypes have been identified for *Orthohepevirus A*. In Mexico, genotype 2 has been reported in humans and is commonly referred to as the “Mexican strain” [22,23]. Genotype 3—a zoonotic strain—has been reported in Mexico but exclusively in swine. Several studies of HEV have been conducted in pigs but recent work have only succeeded in detecting antibodies against the virus using serological tests [24,25]. Furthermore, genotype 3 infections have been emerging recently in America, likely due to contaminated blood transfusions and consumption of contaminated food [8].

Regarding pig populations in Mexico, information on the presence of the virus is still scarce. Little importance has been given to the disease because of the lack of clinical signs affecting swine and the deficiency of the diagnostic tests available for pigs and humans. However, Panduro et al. reported a 12% rate of clinical viral hepatitis in humans where no etiological agent is diagnosed [26]. No publicly available diagnostic tests are performed for HEV in Mexico, so it could be involved in a high proportion of these cases. Thus, better knowledge of circulating strains, especially zoonotic ones, and their relation to strains around the world and from different hosts might provide a broader picture of the disease in Mexico and help develop control measures for at-risk populations.

This study determined the full-length genome sequence of HEV strain MXCDg3\_B1c|\_2016 and of two partial sequences that comprise a large part of the genomes—MXCDg3\_H2cons|\_2016 (2464–7241 nt) and MXCDg3\_C3Acons|\_2016 (5766–7239 nt)—isolated from samples of domestic swine (*Sus scrofa*) taken at different production stages. Comparison of the sequences obtained with those available in GenBank databases showed that they are similar to the genotype 3 subgenotype a (G3a). The presence of the zoonotic genotype in feces on farms indicates the need for stricter biosecurity measures to prevent transmission of the disease to workers and possible dissemination to

the environment. The incidence of this disease in Mexico is likely underestimated due to the lack of available diagnostic techniques in the country and the lack of apparent damage in pigs that would affect the productive parameters by itself.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Collection

To determine the presence or absence of the virus, the Cannon and Roe formula (1982) was applied at a confidence level of 95% and an error of 5% using a previously reported prevalence of 19%; this resulted in a minimum of 16 samples [27,28]. Two sampling strategies were followed. First, samples were collected at 4 slaughterhouses: 1 in the State of Mexico and 3 in Veracruz. Samples of liver, bile, and feces were gathered from 16 individuals at each site. Second, sampling was conducted at a farrowing-to-finishing farm, where 30 fecal swabs from different production stages (weaning, postweaning, finishing, replacement sows, and boars) were taken, and necropsies were performed on 8 animals in the fattening stage.

### 2.2. Molecular Detection of HEV

RNA extraction was carried out following the phenol technique [29]. Reverse transcriptase was performed using SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) was used for PCR following the instructions for the kit and primers and conditions from de Deus and/or Huang [30,31]. RT-PCR positive control was an amplification product of 216 bp, kindly donated by Dr Marga Martin at the Autonomous University of Barcelona [21]. PCR amplicons were visualized in 2% agarose gel. Positive samples were purified with E-Gel size select II Agarose Gels at 2% (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and sent to the Biomedical Research Institute (IIB) for Sanger sequencing to confirm the presence of hepatitis E virus.

### 2.3. HEV Sequencing

RNA concentrations were measured (Genova Nano micro-volume spectrophotometer 737,501, Jenway, Staffordshire, UK) in the 15 positive samples after phenol extraction, and the samples with the highest concentrations were selected for a directed metagenomic analysis. Five samples were taken to the Sequencing Facility at the Biotechnology Institute (IBT, Cuernavaca, Morelos, Mexico). Pretreatment with PoliT pearls (pearls with oligo poly dT, TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit by Illumina, San Diego, CA, USA) was performed on all samples to direct target sequencing to poliA tail sequences. RNA was sent to the Biotechnology Institute (IBT) where next-generation sequencing was performed with NEXTSeq 500, ILLUMINA, equipment.

### 2.4. Computer Sequence Analysis

For each sample, a preprocess analysis was performed with cutadapt (1.11) to remove adaptors and smaller reads. After that, duplicated reads were eliminated with Cd-Hit\_dup with a 100% value ( $1 \times 10^{-3}$ ) [32], and unique reads were mapped at 90% identity with BBDuk v36.99 against an HEV reference genome (GenBank AF060669.1), eliminating regions with quality below 15 [33]. The parameters used for BBDuk were trimq = 15, minid = 0.9, sam = 1.3. Next, hit-reads were used to obtain a consensus sequence using Samtools 1.3.1 and bcftools (1.3.1) with manual verification to correct possible errors [34,35]. Depth coverage and map quality were assessed using Qualimap 2.2.1 [36].

NCBI BLAST (2.8.5.0) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used to verify our genome with a standard nucleotide blast to ensure that the sequence obtained matched only HEV virus sequences [37]. Finally, protein annotation was performed with the Expasy translation tool ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) for frame detection of the three open reading frames.

## 2.5. Phylogenetic Analysis

All 154 complete genome sequences of HEV available in GenBank as of January 2018 for genotype 3 were downloaded as well as at least one reference sequence for genotypes 1, 2, and 4–7. CD-Hit 4.6.8 was used to eliminate sequences with >98% similarity (–c.98), leaving a total of 100 reference sequences. Following this, alignment of the consensus and reference sequences was performed with Clustal W (default parameters) and verified manually using Mega7 [38].

Phylogenetic analysis of the complete genome and also to capsid protein analysis were inferred by the maximum likelihood method based on the GTR model with a discrete Gamma distribution, which was selected as the best fit model, and 1000 bootstrap value. This analysis involved 101 nucleotide complete sequences, 6299 nucleotides long, and 102 nucleotide capsid sequences, 1861 nucleotides long. These sequences are identified by country (first two letters), host (HM = human, CD = swine, DE = deer), genotype (g1–7), subgenotype if reported (a–k), GenBank accession number, and year of collection.

## 3. Results

### 3.1. Molecular Detection of Hepatitis E

Of the 64 individuals sampled at the four slaughterhouses, only one bile sample proved to be positive (B1) (1.56%). By contrast, of the 21 sample pools processed from the farm, 14 were positive (66.66%) and represented all different stages of production (Table 1).

**Table 1.** Hepatitis E virus (HEV) PCR results of swine samples from different production stages.

ID	# of Samples	Type of Sample	Origin	Production Stage	RT-PCR Result
1	16	Liver, bile, feces	Slaughterhouse	Finishers	N
2	16	Liver, bile, feces	Slaughterhouse	Finishers	N
3	16	Liver, bile, feces	Slaughterhouse	Finishers	P*
4	16	Liver, bile, feces	Slaughterhouse	Finishers	N
G1	10	Feces	Farm	Gestation	P
G2	10	Feces	Farm	Gestation	N
G3	10	Feces	Farm	Gestation	P
D1	10	Feces	Farm	Weaning	P
D2	10	Feces	Farm	Weaning	P
D3	10	Feces	Farm	Weaning	P
E1	10	Feces	Farm	Finishers	N
E2	10	Feces	Farm	Finishers	P
E12	10	Feces	Farm	Finishers	P
M1	10	Feces	Farm	Nursing	N
M2	10	Feces	Farm	Nursing	P
M3	10	Feces	Farm	Nursing	N
R	10	Feces	Farm	Breeding	N
S	10	Feces	Farm	Boars	N
H1	3	Liver	Farm	Finishers	P
H2	4	Liver	Farm	Finishers	P
H3	1	Liver	Farm	Finishers	P
B1	4	Bile	Farm	Finishers	P
B2	4	Bile	Farm	Finishers	P
C1	4	Feces	Farm	Finishers	P
C2	4	Feces	Farm	Finishers	N

\* only 1 bile positive

P, positive; N, negative; \* only 1 bile sample proved to be positive.

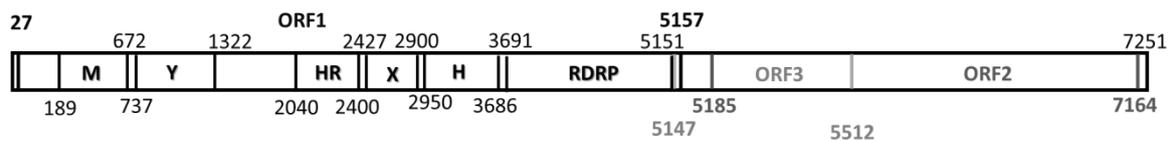
### 3.2. HEV Sequencing

From the five samples selected for next-generation sequencing, we obtained 522,055 reads for sample B1, 623,888 for sample C3A, 301,739 for sample C5A, 694,653 for sample H2, and 1,290,744 for sample H3. The reads obtained had an average length of 75 base pairs (bp). After preprocessing and CD-Hit analysis, 315,714 sequences remained for B1, 401,402 for C3A, 96,649 for C5A, 443,479 for H2, and 180,728 for H3.

Hepatitis E virus reads were obtained from only three samples, as follows:

- (i) Bile sample B1. We were able to assemble one complete hepatitis E virus genome, denoted MXCDg3a\_B1c|\_2016 with a coverage of 354.62. This genome is 7241 nucleotides (nt) long, excluding the poli-A tail (12 nt) at the 3' termini. The genome consisted of 5' UTR of 27 nt (1–27); three open reading frames—ORF1 of 5120 nt (27–5147), ORF2 of 1979 nt (5185–7164), ORF3 of 365 nt (5147–5512)—and a 3' UTR of 77 nt (7164–7241), followed by the poli-A tail (Figure 1). This sequence had been deposited at GenBank under accession no. MG833836.
- (ii) Liver sample H2 was denoted MXCDg3a\_H2cons|\_2016; a partial sequence was obtained of 1473 nt covering the 3' end (5766–7239) with a coverage of 6.30. The GenBank accession number is MH003296.
- (iii) Feces sample C3A was identified as MXCDg3a\_C3Acons|\_2016; a partial sequence of 4777 nt was obtained covering the 3' end (2464–7241) with a coverage of 18.35; GenBank no. MG980615.

No HEV sequences were obtained from samples H3 and C5A.



**Figure 1.** Graphic representation of the complete sequence MXCDg3\_B1c|\_2016 and capsid analysis. Complete sequence of 7241 nucleotides consisting of 5' UTR of 27 nt (1–27), ORF1 of 5120 nt (27–5147), ORF2 of 1979 nt (5185–7164), ORF3 of 365 nt (5147–5512), and a 3' UTR of 77 nt (7164–7251).

### 3.3. Complete Genome Characterization

The complete genome MXCDg3\_B1c|\_2016 was analyzed using BLASTN to identify sequence homology with reported hepatitis E virus sequences. To characterize the genome, a BLASTN between the references obtained was performed. The complete genome sequence MXCDg3\_B1c|\_2016 shared a high nucleotide identity with reference sequences of genotype 3 (Table 2). The highest nucleotide identity of 91% was shown with sequences isolated from humans and pigs in the US, Canada, Japan, and the United Kingdom. The ORF1, ORF2, and ORF3 identities were 91%, 92%, and 98% for nucleotides, and 98%, 99%, and 98% at amino acid level, respectively. The nucleotide identities of MXCDg3a\_B1c|\_2016 with genotype 1, genotype 2 (Mexican strain), and genotype 4 were 77%, 77%, and 78%, respectively.

**Table 2.** Nucleotide and amino acid identity (%) of swine HEV isolate MXCDg3\_B1c|\_2016 with complete genome sequences of various genotypes retrieved from GenBank with over 75% homology.

Sequence Identification	Genome		ORF1		ORF2		ORF3	
	ID	Full-Length% (nt)	% (nt)	% (aa)	% (nt)	% (aa)	% (nt)	% (aa)
USHM AF060669.1 g3a _1998		91	90	97	92	98	98	98
JPHM AB089824.1 g3 _1993		91	90	98	92	98	96	98
USHM JQ679014.1 g3 _2010		91	90	97	92	98	96	98
USCD AY575857.1 g3 _1997		91	90	98	92	98	96	98
USMN JN837481.1 g3 _2008		91	90	97	92	99	97	97
JPHM AB074920.3 g3 _2002		91	90	98	92	99	98	98
JPHM AB074918.2 g3 _2002		91	90	98	93	99	98	98
CNCD KJ507955.1 g3 _2003		90	90	98	92	98	97	99
KRCD FJ426403.1 g3 _2007		90	90	96	93	97	96	98
KRCD FJ426404.1 g3 _2007		90	89	96	92	98	97	98
SGHM KT447526.1 g3 _2010		90	89	97	91	98	96	96
USHM JQ679013.1 g3 _2010		90	90	93	92	98	94	97
CHCD KX981911.1 g3 _2015		89	89	96	91	98	97	98
CNCD AY115488.1 g3 _2002		87	86	95	90	98	96	98
JPHM AB091394.1 g3 _2002		87	86	97	89	99	97	97
JPCD AB740232.1 g3 _2013		87	86	96	89	98	96	98
JPHM LC131066.1 g3 _2016		87	86	96	90	99	96	96
JPHM AB437317.1 g3 _2003		87	86	97	89	99	97	96
JPHM LC176492.1 g3k _2015		87	86	96	90	98	96	96
JPHM AB369689.1 g3 _2004		87	86	96	90	99	97	97
JPHM AB291963.1 g3 _2005		87	86	96	90	98	95	93
JPJB AB222184.1 g3 _2004		87	86	96	88	98	96	96
JPMN AB236320.1 g3 _2002		87	86	97	89	98	97	97
JPJB AB222182.1 g3 _2004		87	86	96	89	98	96	96
CNCD KJ507956.1 g3 _2003		87	86	97	89	98	96	93
JPJB AB222183.1 g3 _2004		87	86	97	89	98	96	93
JPCD AB073912.1 g3 _2001		87	86	96	89	98	96	96
JPJB AB189070.1 g3 _2004		87	85	96	89	98	96	96
JPHM AB437319.1 g3 _2003		87	91	97	89	99	96	95
JPHM AB291960.1 g3 _2006		86	86	97	89	98	96	95
JPHM AB291952.1 g3 _2005		86	86	97	88	99	97	96
JPHM AB369691.1 g3 _2005		86	86	97	89	99	98	96
JPHM AP003430.1 g3 _2001		86	86	96	88	98	97	98
JPHM AB291962.1 g3 _2004		86	85	96	89	98	96	97
CHCD FJ527832.2 g3 _2008		86	86	96	88	98	97	98
JPND AB246676.1 g3 _2006		86	85	97	89	98	99	93
ALJB FJ998008.1 g3 _2007		85	84	96	87	99	95	94
CHCD FJ610232.1 G4 _2008		78	79	85	81	93	87	85
TWHM HQ634346.1 G4 _2010		78	78	86	81	94	90	88
CHCD KC692453.1 G4 _2011		78	78	85	80	94	88	86
EACM KJ496143.1 G7 _2013		78	78	87	80	92	87	80
CHCD GU119960.2 G4a _2009		78	77	85	81	94	89	88
JPJB AB573435.2 G5 _2009		78	77	84	80	91	86	80
CDCH GU206559.1 G4 _2008		78	79	85	81	92	86	85
INHM JF443724.1 G1 _2005		77	77	82	80	92	85	82
CHHM NC_001434.1 G1 _1987		77	77	82	80	92	85	82
CHHM JQ655734.1 G1 _2012		77	77	82	79	91	86	82
MXHM M74506.1 g2 _1992		76	77	81	79	91	85	80
JPWB AB602441.1 g6 _2006		76	NS	83	79	91	84	73

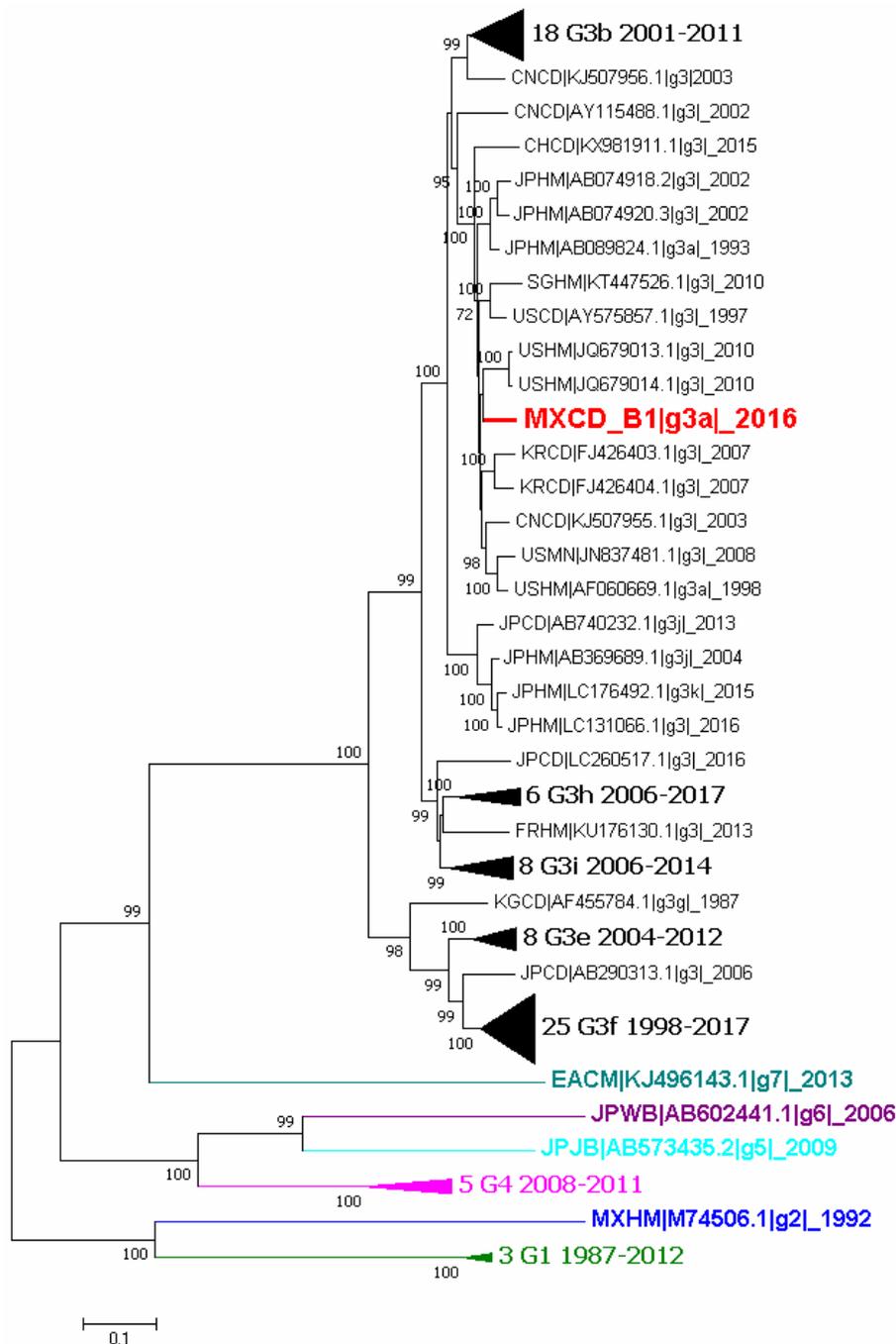
\* NS. No similarity found

### 3.4. Phylogenetic Analysis

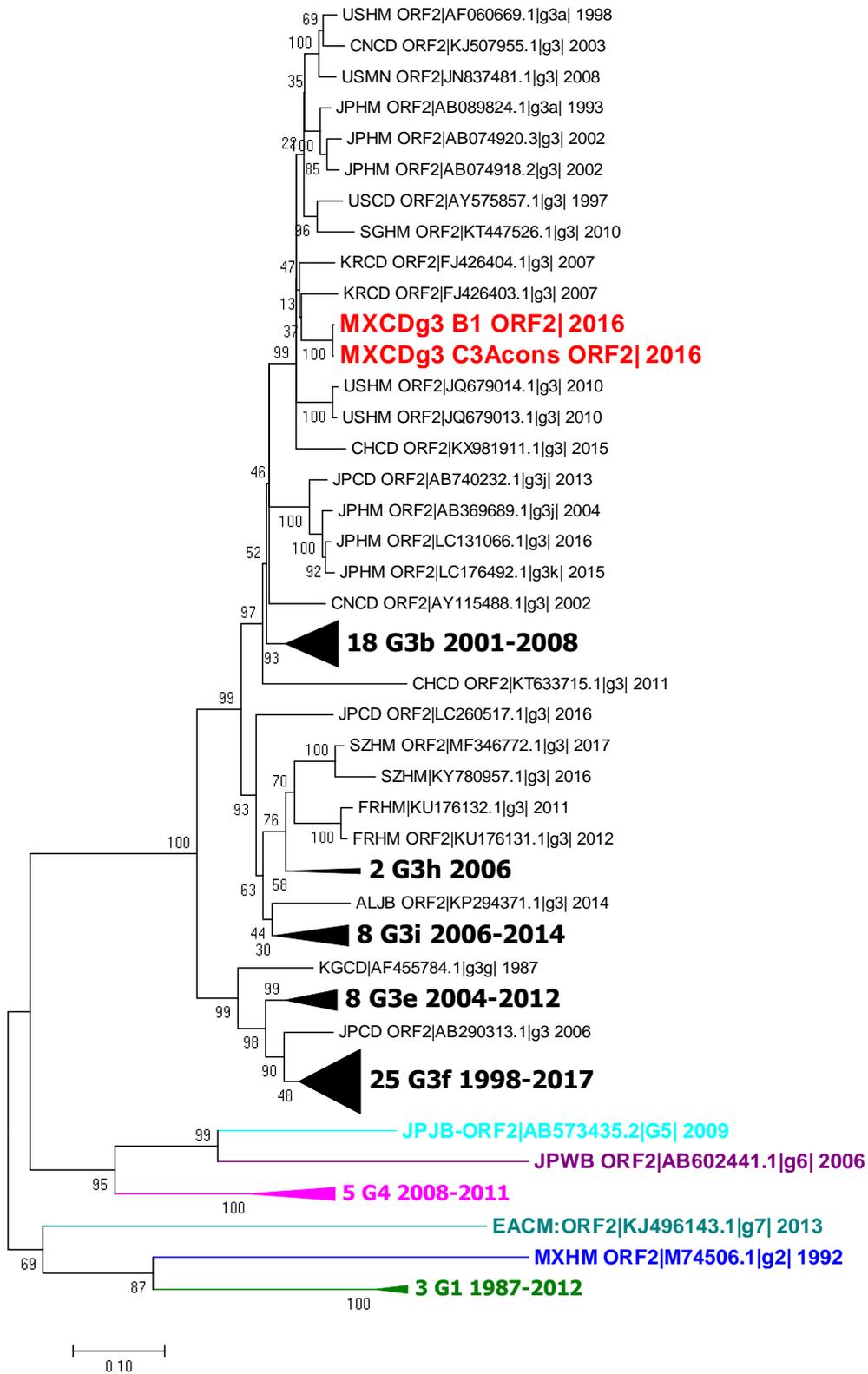
Phylogenetic analyses were performed using complete genome sequences and the capsid ones. The first analysis was constructed with sequences of genotype 3 reported in GenBank and also strains of other genotypes. The complete B1 sequence was included (MXCDg3\_B1c|\_2016) in the analysis and, as shows Figure 2, it clusters with genotype 3 subgenotype a (G3a).

The second phylogenetic tree was constructed using capsid sequences from the complete genomes, capsid sequence B1 MXCDg3\_B1c|\_2016 and the partial sequence obtained from the feces samples (MXCDg3\_C3Acons|\_2016). All sequences cluster with the genotype 3a sequences, as expected (Figure 3).

Afterwards, each ORF was evaluated separately at the nucleotide level with its own phylogenetic analysis. Comparisons showed the same result as for the complete sequence, i.e., clustering with subgenotype 3a [39].



**Figure 2.** Phylogenetic tree of all available complete genome sequences of hepatitis E virus (HEV). Analysis included 101 nucleotide sequences (CD-HIT 98%). Relationship was inferred by the maximum likelihood method based on the GTR model with gamma distribution and 1000 bootstrap. Branches were clustered to construct the graph. The first number indicates the number of sequences, genotype and subgenotype, and year of detection. Black triangles symbolize clustering of similar sequences identified by number of sequences, genotype and years of report. Colors represent different genotypes, blue for genotype 2, green for genotype 3, magenta for genotype 4, cyan for genotype 5, purple for genotype 6 and light blue for genotype 7.



**Figure 3.** Phylogenetic tree of the ORF2 sequences of HEV. Analysis included 102 nucleotide sequences (CD-HIT 98%). Relationship was inferred by the maximum likelihood method based on the GTR model with gamma distribution and 1000 bootstrap. Branches were clustered to construct the graph. The first number indicates number of sequences, genotype and subgenotype, and year of detection. Black triangles symbolize clustering of similar sequences identified by number of sequences, genotype and years of report. Colors represent different genotypes, blue for genotype 2, green for genotype 3, magenta for genotype 4, cyan for genotype 5, purple for genotype 6 and light blue for genotype 7.

#### 4. Discussion

HEV causes apparent asymptomatic infection in swine. However, it is a public health concern as it causes acute hepatitis in humans of varying severity that could lead to chronic affection. Most severe human infections occur in pregnant women and can impact the outcome of the pregnancy (25% mortality rates). HEV is ubiquitous and difficult to detect, and higher seroconversion levels have been documented in people with occupational exposure to swine. This is the first report of a complete genome characterization of hepatitis E virus genotype 3 in Mexico (strain MXCDg3\_B1c|\_2016). Generating information of the virus is important as it helps establish a reference strain of the virus that circulates in pigs in slaughterhouses and different production stages in the country.

The results of the sampling carried out at four slaughterhouses (64 total samples of liver, bile, and feces) yielded only one positive sample of bile (1.56%). An earlier study conducted in Nuevo Leon, Mexico, had reported HEV sequences in butcher shops with 22.5% positive results; however, we found no positive liver samples at the slaughterhouses [28]. Also, a study conducted in Brazil that analyzed 118 clinically-asymptomatic pigs had found two liver samples (1.7%) and one bile sample (0.84%) that were positive [40]. This result is close to our results, perhaps due to the study design and sampling procedure employed. Sampling represents a limitation due to the lack of a more standardized sampling method; this is especially the case for liver samples where only a small fraction (2 g) of tissue was used for RNA extraction. More information is needed regarding the presence of the virus in the food supply chain, and risk factors should be considered when devising strategies to prevent contamination in the pork food chain.

According to reports by Casas et al., feces sampling (rectal swabs) was carried out on a full-cycle pig farm to assess the zoonotic risk for people who work, or have contact, with pigs—a risk factor that has been reported in several studies [41–44]. Of the 21 sample pools analyzed, two from the fattening stage were highly positive. These findings coincide with previous reports that identified the elimination peak of the virus in the twelfth week of age [41]. However, some samples from pigs in the gestation, farrowing, and nursing stages were also found to be positive, indicating that the virus circulates in all production stages. These high levels of viral elimination might be related to high anti-HEV antibody prevalence reported previously in farm workers. Among farm samples, 66.66% proved to be positive. This is the first RT-PCR analysis conducted on a farm in Mexico; therefore, no comparison values can be discussed. However, seroprevalence values have been reported. A study conducted on swine farms in different areas of Mexico revealed a HEV IgG seroprevalence of 42.7% in the central area of the country [24]. Another study conducted by Merino Ramos et al. that covered nine central states in Mexico found a 30.75% seroprevalence [25]. Although evidence of the disease exists, the matter has received little interest from authorities.

All necropsy samples were positive, except for one stool sample. It is important to note that all pigs were selected for sacrifice for teaching purposes and were especially selected due to reduced weight gain compared to other pigs in the same stage. HEV has not been directly associated with any clinical manifestations in swine hosts that could affect economic parameters. However, a few specific cases have been reported that showed high morbidity and mortality when HEV was found along with other known pathogenic swine viruses, such as Porcine Circovirus 2 (PCV-2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), both of which are common in Mexican swine farms [45,46]. Further analysis should include evaluation of production parameters during HEV infection to assess the possible effects of the disease in swine populations.

Phylogenetic analysis showed that the virus clusters with genotype 3, subgenotype a (G3a) reported sequences that have been associated with acute hepatitis cases in humans in the US (GenBank AF060669.1) and Japan (GenBank AB089824) as well as in swine from China (GenBank KT727028). The sequences reported in the US (HEV-US1, HEV-US2) were the first identified as genotype 3 due to their low homology with the Burma and Mexico strains (73.5–74.5%). They were isolated from two human patients with acute hepatitis [47]. Genotype 3a was also reported recently in Colombia [48]. It is possible that this is the strain currently circulating in America.

Although HEV has been confirmed as a zoonotic disease, it has received little attention in Mexico, where clinical cases might be underestimated. This is also the situation for other countries in America that are currently defining the importance of this disease [48–51]. One Health is focused on diseases that generate associations between humans, animals, and the environment; plenty of studies have demonstrated the risk of HEV for humans in association with animals, as a food-borne pathogen, and the risk of environmental transmission. Surveillance of porcine HEV could be helpful in evaluating the potential risk of HEV zoonotic infection in humans [52]. Our findings of HEV in pigs at farm level that shed virus in different stages suggest an occupational risk for swine production workers; therefore, it is necessary to implement biosecurity measures. Some authors have suggested that the difference in age of infection onset or shedding may result from the quantity and/or quality of colostrum that piglets receive with maternal antibodies. In addition, the duration of shedding on farms could be influenced by other pathogens; for instance, one trial showed that PRRSV/HEV coinfection dramatically extended the shedding period by a factor of five [53]. Standard biosecurity measures, including regular cleaning and disinfection, should be implemented to limit fecal contamination of swine facilities. There is scarce information about the pathogenesis of HEV, possible routes of transmission, and vaccine efficacy in swine. Further research should be conducted to address the epidemiology of the disease in farms and develop prevention methods to avoid infection in swine.

The information generated on HEV genotype 3 present in Mexico provides some insight into the disease situation there. Sequences are publicly available and will help develop more specific diagnoses that will provide a broader view of the disease.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.S.-J. and R.E.S.-S.; Data curation, B.I.T.-R.; Formal analysis, A.S.-G. and B.I.T.-R.; Funding acquisition, R.E.S.-S.; Investigation, A.S.-G.; Methodology, A.S.-G.; Project administration, M.E.T.-O. and R.E.S.-S.; Resources, M.E.T.-O.; Software, B.I.T.-R.; Supervision, C.S.-J. and R.E.S.-S.; Validation, B.I.T.-R.; Writing—original draft, A.S.-G.; Writing—review & editing, M.E.T.-O., B.I.T.-R., C.S.-J. and R.E.S.-S.

**Funding:** This research was funded by Mexico's Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Project Number: CB-221186, entitled "Diseño, implementación y optimización de una plataforma para la detección y caracterización molecular del genoma completo del virus de hepatitis E".

**Acknowledgments:** The authors thank Marga Martín at the Autonomous University of Barcelona, Spain, for kindly donating the PCR positive control and the Instituto de Biotecnología-UNAM for its computer cluster; specifically, Jerome Verleyen for the computer support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Ethics Approval:** The study was designed in accordance with the protocols and procedures established by the Ethics Committee (CICUAE, Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación) at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## References and Note

1. Bouquet, J.; Cherel, P.; Pavio, N. 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. Evolut.* **2012**, *12*, 1842–1853. [CrossRef] [PubMed]
2. Behrendt, P.; Steinmann, E.; Manns, M.P.; Wedemeyer, H. The impact of hepatitis e in the liver transplant setting. *J. Hepatol.* **2014**, *61*, 1418–1429. [CrossRef] [PubMed]
3. WHO. Available online: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e> (accessed on 3 July 2017).
4. Anang, S.; Subramani, C.; Nair, V.P.; Kaul, S.; Kaushik, N.; Sharma, C.; Tiwari, A.; Ranjith-Kumar, C.T.; Surjit, M. Identification of critical residues in hepatitis e virus macro domain involved in its interaction with viral methyltransferase and orf3 proteins. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25133. [CrossRef] [PubMed]
5. Yamashita, T.; Mori, Y.; Miyazaki, N.; Cheng, R.H.; Yoshimura, M.; Unno, H.; Shima, R.; Moriishi, K.; Tsukihara, T.; Li, T.C.; et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis e virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12986–12991. [CrossRef] [PubMed]

6. Guu, T.S.; Liu, Z.; Ye, Q.; Mata, D.A.; Li, K.; Yin, C.; Zhang, J.; Tao, Y.J. Structure of the hepatitis e virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12992–12997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Okamoto, H. Culture systems for hepatitis e virus. *J. Gastroenterol.* **2013**, *48*, 147–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Montpellier, C.; Wychowski, C.; Sayed, I.M.; Meunier, J.C.; Saliou, J.M.; Ankavay, M.; Bull, A.; Pillez, A.; Abravanel, F.; Helle, F.; et al. Hepatitis e virus lifecycle and identification of 3 forms of the orf2 capsid protein. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 211–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Yin, X.; Ying, D.; Lhomme, S.; Tang, Z.; Walker, C.M.; Xia, N. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of orf2 in hepatitis e virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 4773–4778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Xu, M.; Behloul, N.; Wen, J.; Zhang, J.; Meng, J. Role of asparagine at position 562 in dimerization and immunogenicity of the hepatitis e virus capsid protein. *Infect. Genet. Evolut.* **2016**, *37*, 99–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Ding, Q.; Heller, B.; Capuccino, J.M.; Song, B.; Nimgaonkar, I.; Hrebikova, G.; Contreras, J.E.; Ploss, A. Hepatitis e virus orf3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 1147–1152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Li, T.-C.; Chijiwa, K.; Sera, N.; Ishibashi, T.; Etoh, Y.; Shinohara, Y.; Kurata, Y.; Ishida, M.; Sakamoto, S.; Takeda, N.; et al. Hepatitis e virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1958–1960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Renou, C.; Afonso, A.-M.R.; Pavio, N. Foodborne transmission of hepatitis e virus from raw pork liver sausage, france. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1945–1947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Riveiro-Barciela, M.; Minguez, B.; Girones, R.; Rodriguez-Frias, F.; Quer, J.; Buti, M. Phylogenetic demonstration of hepatitis e infection transmitted by pork meat ingestion. *J. Clin. Gastroenterol.* **2015**, *49*, 165–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Haider, N.; Khan, M.S.U.; Hossain, M.B.; Sazzad, H.M.S.; Rahman, M.Z.; Ahmed, F.; Zeidner, N.S. Serological evidence of hepatitis e virus infection in pigs and jaundice among pig handlers in bangladesh. *Zoonoses Public Health* **2017**, *64*, 572–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Meng, X.; Wiseman, B.; Elvinger, F.; Guenette, D.; Toth, T.; Engle, R.; Emerson, S.; Purcell, R. Prevalence of antibodies to hepatitis e virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the united states and other countries. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 117–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lee, J.T.; Shao, P.L.; Chang, L.Y.; Xia, N.S.; Chen, P.J.; Lu, C.Y.; Huang, L.M. Seroprevalence of hepatitis e virus infection among swine farmers and the general population in rural taiwan. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Meng, X.J. Hepatitis e virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 256–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ahmed, J.A.; Moturi, E.; Spiegel, P.; Schilperoord, M.; Burton, W.; Kassim, N.H.; Mohamed, A.; Ochieng, M.; Nderitu, L.; Navarro-Colorado, C.; et al. Hepatitis e outbreak, dadaab refugee camp, Kenya, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1010–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Pisano, M.B.; Lugo, B.C.; Poma, R.; Cristobal, H.A.; Raskovsky, V.; Martinez Wassaf, M.G.; Rajal, V.B.; Re, V.E. Environmental hepatitis e virus detection supported by serological evidence in the northwest of argentina. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *112*, 181–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Chen, Y.J.; Cao, N.X.; Xie, R.H.; Ding, C.X.; Chen, E.F.; Zhu, H.P.; Sun, J.M.; Shang, X.P.; Wang, X.X.; Miao, Z.P. Epidemiological investigation of a tap water-mediated hepatitis e virus genotype 4 outbreak in Zhejiang province, China. *Epidemiol. Infect.* **2016**, *144*, 3387–3399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Echevarria, J.M.; Gonzalez, J.E.; Lewis-Ximenez, L.L.; Dos Santos, D.R.; Munne, M.S.; Pinto, M.A.; Pujol, F.H.; Rodriguez-Lay, L.A. Hepatitis e virus infection in latin America: A review. *J. Med. Virol.* **2013**, *85*, 1037–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Woo, P.C.; Lau, S.K.; Teng, J.L.; Cao, K.Y.; Wernery, U.; Schountz, T.; Chiu, T.H.; Tsang, A.K.; Wong, P.C.; Wong, E.Y.; et al. New hepatitis e virus genotype in bactrian camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 2219–2221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Garcia-Hernandez, M.E.; Cruz-Rivera, M.; Sanchez-Betancourt, J.I.; Rico-Chavez, O.; Vergara-Castaneda, A.; Trujillo, M.E.; Sarmiento-Silva, R.E. Seroprevalence of anti-hepatitis e virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Merino-Ramos, T.; Martin-Acebes, M.A.; Casal, J.; Saiz, J.C.; Loza-Rubio, E. Prevalence of hepatitis e virus (hev) antibodies in mexican pigs. *Food Environ. Virol.* **2016**, *8*, 156–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Panduro, A.; Escobedo Melendez, G.; Fierro, N.A.; Ruiz Madrigal, B.; Zepeda-Carrillo, E.A.; Roman, S. [epidemiology of viral hepatitis in Mexico]. *Salud Publica de Mexico* **2011**, *53* (Suppl. 1), S37–S45. [[PubMed](#)]
27. Cannon, R.; Roe, R.T. *Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians*; Australian Government Publishing Service: Canberra, Australia, 1982.
28. Cantu-Martinez, M.A.; Roig-Sagues, A.X.; Cedillo-Rosales, S.; Zamora-Avila, D.E.; Avalos-Ramirez, R. [molecular detection of hepatitis e virus in pig livers destined for human consumption in the state of nuevo leon, Mexico]. *Salud Publica de Mexico* **2013**, *55*, 193–195. [[PubMed](#)]
29. Rio, D.C.; Ares, M.; Hannon, G.J.; Nilsen, T.W. Purification of rna using trizol (tri reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, *2010*, pdb.prot5439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. De Deus, N.; Seminati, C.; Pina, S.; Mateu, E.; Martin, M.; Segales, J. 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.* **2007**, *119*, 105–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Huang, F.; Haqshenas, G.; Guenette, D.; Halbur, P.; Schommer, S.; Pierson, F.; Toth, T.; Meng, X. 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.* **2002**, *40*, 1326–1332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fu, L.; Niu, B.; Zhu, Z.; Wu, S.; Li, W. Cd-hit: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics (Oxf. Engl.)* **2012**, *28*, 3150–3152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bushnell, B. Bbmap Short Read Aligner. University of California, Berkeley, California. Available online: <http://sourceforge.net/projects/bbmap> (accessed on 1 February 2018).
34. Narasimhan, V.; Danecek, P.; Scally, A.; Xue, Y.; Tyler-Smith, C.; Durbin, R. Bcftools/roh: A hidden markov model approach for detecting autozygosity from next-generation sequencing data. *Bioinformatics (Oxf. Engl.)* **2016**, *32*, 1749–1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The sequence alignment/map format and samtools. *Bioinformatics (Oxf. Engl.)* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Okonechnikov, K.; Conesa, A.; Garcia-Alcalde, F. Qualimap 2: Advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxf. Engl.)* **2016**, *32*, 292–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **2000**, *7*, 203–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. Mega7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evolut.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sotomayor-González, A.; Trujillo-Ortega, M.E.; Taboada-Ramírez, B.I.; Sandoval-Jaime, C.; Sarmiento-Silva, R.E. National Autonomous University of Mexico, Mexico. Phylogenetic analysis of hev orfs 1-3 aminoacid sequences. Cd-hit 4.6.8 was used to eliminate sequences with >98% similarity (–c.98), leaving a total of 100 reference sequences. Following this, alignment of the consensus and reference sequences was performed with clustal w (default parameters) and verified manually using mega7, 2018.
40. Gardinali, N.R.; Barry, A.F.; Otonel, R.A.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. Hepatitis e virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 935–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Casas, M.; Cortés, R.; Pina, S.; Peralta, B.; Allepuz, A.; Cortey, M.; Casal, J.; Martín, M. Longitudinal study of hepatitis e virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet. Microbiol.* **2011**, *148*, 27–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bansal, M.; Kaur, S.; Deka, D.; Singh, R.; Gill, J.P.S. Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis e virus infection in swine and occupationally exposed workers in Punjab, India. *Zoonoses Public Health* **2017**, *64*, 662–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Perez-Gracia, M.T.; Mateos, M.L.; Galiana, C.; Fernandez-Barredo, S.; Garcia, A.; Gomez, M.T.; Moreira, V. Autochthonous hepatitis e infection in a slaughterhouse worker. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 893–896. [[PubMed](#)]
44. Prpic, J.; Cerni, S.; Skoric, D.; Keros, T.; Brnic, D.; Cvetnic, Z.; Jemersic, L. Distribution and molecular characterization of hepatitis e virus in domestic animals and wildlife in Croatia. *Food Environ. Virol.* **2015**, *7*, 195–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Yang, Y.; Shi, R.; She, R.; Mao, J.; Zhao, Y.; Du, F.; Liu, C.; Liu, J.; Cheng, M.; Zhu, R.; et al. Fatal disease associated with swine hepatitis e virus and porcine circovirus 2 co-infection in four weaned pigs in China. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mao, J.; Zhao, Y.; She, R.; Xiao, P.; Tian, J.; Chen, J. One case of swine hepatitis e virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection in weaned pigs. *Virol. J.* **2013**, *10*, 341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Erker, J.C.; Desai, S.M.; Schlauder, G.G.; Dawson, G.J.; Mushahwar, I.K. A hepatitis e virus variant from the united states: Molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J. General Virol.* **1999**, *80 Pt 3*, 681–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Forero, J.E.; Gutierrez-Vergara, C.; Parra Suescun, J.; Correa, G.; Rodriguez, B.; Gutierrez, L.A.; Diaz, F.J.; Lopez-Herrera, A. Phylogenetic analysis of hepatitis e virus strains isolated from slaughter-age pigs in colombia. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *49*, 138–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Munne, M.S.; Altarbert, N.R.; Otegui, M.L.; Vladimirsky, S.N.; Moreiro, R.; Espul, M.P.; Espul, C.; Manzur, A.; Soto, S.S.; Brajterman, L.S.; et al. Updating the knowledge of hepatitis e: New variants and higher prevalence of anti-hev in Argentina. *Ann. Hepatol.* **2014**, *13*, 496–502. [[PubMed](#)]
50. Mirazo, S.; Gardinali, N.R.; Cecilia, D.; Verger, L.; Ottonelli, F.; Ramos, N.; Castro, G.; Pinto, M.A.; Re, V.; Pisano, B.; et al. Serological and virological survey of hepatitis e virus (hev) in animal reservoirs from uruguay reveals elevated prevalences and a very close phylogenetic relationship between swine and human strains. *Vet. Microbiol.* **2018**, *213*, 21–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nantel-Fortier, N.; Letellier, A.; Lachapelle, V.; Fravallo, P.; L'Homme, Y.; Brassard, J. Detection and phylogenetic analysis of the hepatitis e virus in a Canadian swine production network. *Food Environ. Virol.* **2016**, *8*, 296–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Di Profio, F.; Melegari, I.; Sarchese, V.; Robetto, S.; Marruchella, G.; Bona, M.C.; Orusa, R.; Martella, V.; Marsilio, F.; Di Martino, B. Detection and genetic characterization of hepatitis e virus (hev) genotype 3 subtype c in wild boars in Italy. *Arch. Virol.* **2016**, *161*, 2829–2834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Salines, M.; Andraud, M.; Rose, N. From the epidemiology of hepatitis e virus (hev) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: A comprehensive review. *Vet. Res.* **2017**, *48*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).