

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E EN CERDOS  
DE EXPLOTACIONES COMERCIALES**

**“por”**

**Lorenzo VERGER ZANNIER**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD estudio de caso

**MONTEVIDEO**

**URUGUAY**

**2016**

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa

---

Dr. Gustavo Castro

Segundo Miembro (Tutor)

---

Dr. Santiago Mirazo

Tercer Miembro

---

Dr. Kevin Yaneselli

Cotutor

---

Dra. Alejandra Lozano

Fecha

Autor

---

Lorenzo Verger

## AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo, en particular al Dr. Santiago Mirazo, por la paciencia y dedicación que puso durante el desarrollo y revisión del mismo. A los docentes y pasantes de la Sección Virología de Facultad de Ciencias por la ayuda y asistencia constantes en las tareas de laboratorio.

A mis compañeros de trabajo en las cátedras de Epidemiología y Salud Pública: Dr. Edgardo Vitale, Dra. Alejandra Lozano, Elena Soca, Dr. Oscar Caponi, Dra. Cristina Ríos, Dra. Virginia Mosca y Dr. Eduardo Aguirre. Excelentes personas y docentes de los que recibí formación, consejo, apoyo y motivación constante a lo largo de la carrera.

A todos los demás veterinarios que dentro y fuera de la facultad han sido guías y maestros en diversos aspectos de esta hermosa profesión, en particular a la Dra. Ester Cidade, Dr. Gustavo de Souza, Dr. José Pedro Pacheco, Dra. Carmen Leizagoyen y Dr. Cesar Echaidés.

A mi familia, por quererme, apoyarme, aguantarme y enseñarme principios y valores que me van a acompañar siempre. A mis amigos, con los que tengo la alegría de compartir tantas cosas.

A todos, de corazón, ¡Gracias!

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS.....	7
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 El cerdo como fuente de enfermedades para hombre.....	11
2.2 Zoonosis virales emergentes del cerdo. Importancia en la Salud Pública...	12
2.3 Hepatitis virales del ser humano.....	13
2.3.1 Hepatitis E.....	14
2.3.1.1 Descubrimiento y caracterización del VHE.....	14
2.3.1.2 Taxonomía y clasificación.....	15
2.3.1.3 Estructura del VHE.....	16
2.3.1.4 Variantes genéticas.....	16
2.3.1.5 Proteínas del VHE.....	17
2.3.1.6 Replicación viral.....	18
2.3.1.7 Patología y clínica de la hepatitis E.....	19
2.3.1.8 Epidemiología y patrones de transmisión.....	20
2.3.1.9 VHE en animales y evidencia de transmisión zoonótica.....	20
2.3.1.10 Situación en América Latina y Uruguay.....	23
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Población objetivo.....	27
5.2 Tipo de muestra, metodología de muestreo y acondicionamiento de la muestra.....	27
5.3 Procesamiento de las muestras.....	27
5.3.1 Corte y lisis.....	27
5.3.2 Extracción de ARN total.....	28
5.3.3 Amplificación de genoma viral.....	28
5.3.3.1 Retrotranscripción.....	29
5.3.3.2 Amplificación mediante PCR anidada.....	29
5.3.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	30
5.3.5 Purificación del ADN y secuenciación de los amplicones.....	30
5.3.6 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	31
6. RESULTADOS.....	31
6.1 Amplificación del genoma del VHE.....	31
6.2 Análisis filogenético.....	32
7. DISCUSIÓN.....	35
8. CONCLUSIONES.....	37
9. BIBLIOGRAFÍA.....	38

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### **Tablas**

Tabla 1. Principales enfermedades zoonóticas del cerdo.....	11
Tabla 2. Características de las diferentes hepatitis virales humanas.....	13
Tabla 3. Procedencia y número de animales faenados en las instancias de muestreo....	27
Tabla 4. Cebadores utilizados.....	28
Tabla 5. Muestras procesadas.....	32

### **Figuras**

Figura 1. Estructura del genoma del VHE.....	16
Figura 2. ProORF1.....	17
Figura 3. ProORF2.....	17
Figura 4. ProORF3.....	18
Figura 5. Genotipos del VHE, distribución geográfica y reservorios.....	21
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	32
Figura 7. Reconstrucción filogenética obtenida con la región ORF1.....	33

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

aa: Aminoácidos

cm: Centímetros

cADN: ADN complementario

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

VHE: Virus de la Hepatitis E (*Orthohepevirus A*)

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

nm: Nanómetros

g: Gramos

kb: Kilobases

M: Molar

mARN: ARN mensajero

mg: Miligramos

min: Minutos

ml: Mililitros

nt: nucleótido

NTR: *Non translated region*. Región no traducida

ORF: *Open Reading Frame*. Marco abierto de lectura.

PCR: *Polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa

pb: Pares de bases

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

SDS: dodecilsulfato sódico

U: Unidades

V: Voltios

μl: Microlitro

μM: Micromolar

λ: Longitud de onda

## RESUMEN

El Virus de la Hepatitis E (VHE) produce en el ser humano una infección aguda y usualmente autolimitante, aunque en algunos grupos de riesgo como mujeres embarazadas, puede presentar una elevada letalidad. En países en vías de desarrollo presenta un patrón de transmisión fecal-oral asociado a condiciones deficientes de saneamiento y acceso al agua potable. Sin embargo, en los países que poseen una adecuada infraestructura sanitaria, la enfermedad se presenta en forma de casos esporádicos. La fuente de infección en estos casos no siempre está clara, pero existe suficiente evidencia que sugiere una infección de origen zoonótico. El VHE presenta una gran diversidad genética y se divide en 4 genotipos principales (1-4). Los genotipos 1 y 2 se presentan exclusivamente en el ser humano mientras que los genotipos 3 y 4 pueden infectar diversas especies, aunque en zonas no endémicas se considera que el reservorio principal es el cerdo. En nuestro país se han detectado casos esporádicos de Hepatitis E en humanos, logrando secuenciar algunas de las cepas involucradas. Este trabajo tuvo como objetivo evidenciar la circulación del VHE en poblaciones de cerdos de Uruguay y evaluar su posible relación con los casos detectados en humanos. Se colectaron muestras de tejido hepático de cerdos faenados en frigorífico provenientes de diversos establecimientos. Un fragmento del genoma viral se amplificó mediante retrotranscripción y PCR anidada. Los productos amplificados fueron secuenciados y se realizó un análisis filogenético, incluyendo las cepas de VHE detectadas en humanos de Uruguay y cepas representativas de los 4 genotipos de diversas partes del mundo. Se procesaron 110 muestras agrupadas en 28 pools, lográndose la amplificación viral solamente en uno (3,6%). La cepa detectada se denominó HESw2015 y presentó una identidad nucleotídica de entre 95,5 y 97,3% con las cepas secuenciadas en humanos de nuestro país. La reconstrucción filogenética de la cepa HESw2015 la agrupó con cepas clasificadas dentro del genotipo 3 y resultó estar muy estrechamente relacionada con el *cluster* de aislamientos detectados en humanos de Uruguay. La evidencia sugiere además que HESw2015 es ancestral a las cepas humanas detectadas en el país. Asimismo se observó una alta identidad de secuencia con dos cepas secuenciadas en Alemania. En este trabajo se detectó por primera vez en el país una cepa zoonótica del VHE en poblaciones de cerdos, identificando por lo tanto a la carne de cerdo insuficientemente cocida y sus derivados como una posible fuente de infección para la hepatitis E. Además se aporta evidencia que sugiere un origen zoonótico de los casos humanos.

## SUMMARY

Hepatitis E virus (HEV) produces an acute and usually self-limiting infection in humans, although in some risk groups such as pregnant women, it can have a high fatality rate. In developing countries it presents a pattern of fecal-oral transmission associated with poor sanitation conditions and limited access to drinking water. However, in countries with an adequate health infrastructure, the disease occurs in the form of sporadic cases. The source of infection in these cases is not always clear, but there is a great deal of evidence suggesting an infection of zoonotic origin. VHE presents a great genetic diversity and is divided into 4 main genotypes (1-4). Genotypes 1 and 2 occur exclusively in humans whereas genotypes 3 and 4 can infect various species, although in non-endemic areas the main reservoir is considered to be the pig. In our country, sporadic cases of Hepatitis E have been detected in humans, and some of the strains involved have been sequenced. The objective of this study was to detect the presence of HEV in Uruguayan pig populations and to evaluate its possible relationship with cases detected in humans. Hepatic tissue samples from pigs from different farms which were slaughtered in abattoirs were collected. The viral genome was amplified by retrotranscription and nested PCR. The amplified products were sequenced and a phylogenetic analysis was performed using the Neighbor Joining method, including HEV strains detected in humans of Uruguay and strains representative of the 4 genotypes from various parts of the world. A total of 110 samples were processed in 28 pools, and viral amplification was achieved in only one (3.6%). The strain detected was named HESw2015 and had a nucleotide identity of 95.5-97.3% with strains sequenced in humans from our country. In the phylogenetic analysis, the strain HESw2015 grouped with strains was classified within genotype 3 and turned out to be very closely related to the cluster of isolates detected in humans of Uruguay, also suggesting that the infection in pigs preceded in time the infection in humans. A high sequence identity was also observed with two strains sequenced in Germany. In this work, a zoonotic strain of HEV in pig populations was detected for the first time in the country, thus identifying undercooked pork and its derivatives as a possible source of hepatitis E infection. It also provides evidence that implies a zoonotic infection of the human cases.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El cerdo doméstico tiene su origen en el cerdo salvaje euroasiático y fue domesticado hace aproximadamente 9000 años (Giuffra et al., 2000). Desde entonces su consumo ha representado un gran aporte a la dieta del ser humano. De los animales terrestres, la carne porcina es la más consumida a nivel mundial y es, junto con el sector avícola, el tipo de producción ganadera de crecimiento más rápido. La producción del cerdo tiene una distribución global, con la excepción de ciertas áreas donde no se cría por motivos culturales o religiosos. (Blaha, 1997; FAO, 2016). En este contexto resulta indispensable para la protección de la salud pública implementar prácticas que garanticen una producción segura y la inocuidad de los alimentos de origen porcino. Se calcula que en los países desarrollados al menos 10% de la población sufrirá de zoonosis transmitidas por alimentos cada año. En la mayoría de estas enfermedades, el cerdo es una posible fuente de infección (Fosse et al., 2008).

El virus de la hepatitis E (VHE) provoca una hepatitis de transmisión fecal-oral que, en los países en desarrollo, suele presentarse en forma de brotes epidémicos asociados a suministros de agua contaminada y malas condiciones sanitarias. Sin embargo, en los países industrializados, que cuentan con abastecimiento de agua potable y saneamiento, la Hepatitis E se presenta en forma de brotes esporádicos y las vías de infección aún no están del todo claras en estos casos. Hoy existe suficiente evidencia para afirmar que la Hepatitis E es una zoonosis endémica en gran parte del mundo y que muchas veces se encuentra asociada al consumo y producción del cerdo (Pavio et al. 2010). La epidemiología de esta enfermedad es compleja, involucrando distintos patrones de transmisión, diversas fuentes de infección y muchos reservorios posibles.

Este trabajo busca ampliar la información disponible sobre el VHE en Uruguay, concretamente mediante la búsqueda de cepas en suinos domésticos y su posterior comparación con cepas aisladas en humanos y cerdos de la región.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 El cerdo como fuente de enfermedades para hombre

El estrecho contacto que el hombre ha mantenido con el cerdo ha determinado que sea una importante fuente de enfermedades zoonóticas, siendo estas definidas como “enfermedades o infecciones transmitidas de forma natural entre los animales vertebrados y el ser humano” (WHO, 1959). En el caso del cerdo, existen multitud de agentes etiológicos bacterianos, virales y parasitarios capaces de producir enfermedad en el ser humano (Tabla 1). Las vías de infección son variadas, pero usualmente involucran el consumo de carne y subproductos porcinos o el contacto directo con el animal o sus secreciones.

**Tabla 1. Principales enfermedades zoonóticas del cerdo.**

	Enfermedad	Agente etiológico	Modo de transmisión al ser humano
	Brucelosis	<i>Brucella suis</i>	Contacto directo o indirecto por fetos, membranas fetales, secreciones vaginales.
	Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>	Consumo de carne y derivados, usualmente conservas
	Campilobacteriosis	<i>Campylobacter jejuni</i>	Consumo de carne y derivados infectados
	Carbunco	<i>Bacillus anthracis</i>	Contacto con cadáveres, ingestión de carne contaminada, contaminación ambiental por esporas.
	Colibacilosis	Cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i>	Consumo de carne y derivados infectados
	Erisipeloide humana	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Contacto de la piel con animales o carne infectada
Zoonosis bacterianas	Fiebre Q	<i>Coxiella burnetti</i>	Contacto con fetos o membranas fetales, heces u orina de animales infectados. Garrapatas.
	Intoxicación clostridiana alimentaria	<i>Clostridium perfringens</i>	Alimentos contaminados con esporas.
	Leptospirosis	<i>Leptospira spp.</i>	Contacto directo o indirecto (ambiental) con orina infectada.
	Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i>	Consumo de carne y derivados infectados
	Salmonelosis	<i>Salmonella enterica</i>	Consumo de carne y derivados infectados
	Tuberculosis	<i>Micobacterium bovis</i> , <i>Mycobacterium avium</i>	Inhalación de aerosoles, consumo de carne o derivados.
	Yersiniosis enterocolítica	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ingestión de productos porcinos
Zoonosis virales	Rabia	Virus de la rabia ( <i>Rhabdoviridae</i> , <i>Lyssavirus</i> )	Contacto con saliva o tejido nervioso
	Fiebre del nilo occidental	Virus del nilo occidental ( <i>Flaviviridae</i> , <i>Flavivirus</i> )	Vectores de los géneros <i>Culex</i> y <i>Aedes</i>
	Hepatitis E	<i>Orthohepevirus A</i> ( <i>Hepeviridae</i> , <i>Orthohepevirus</i> )	Ingestión de alimentos contaminados, posible contacto directo
	Influenza	<i>Influenzavirus A</i> ( <i>Orthomixoviridae</i> )	Contacto con secreciones, aerosoles
	Encefalitis por virus Nipah	Virus Nipah ( <i>Paramyxoviridae</i> , <i>Henipavirus</i> )	Contacto directo con secreciones
Zoonosis parasitarias	Toxoplasmosis	<i>Toxoplasma gondii</i>	Ingestión de carne insuficientemente cocida
	Triquinosis	<i>Trichinella spp.</i>	Ingestión de carne insuficientemente cocida
	Criptosporidiosis	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Ingestión de agua o alimentos contaminados
	Teniasis	<i>Taenia solium</i>	Ingestión de carne insuficientemente cocida

Algunas de estas enfermedades son conocidas desde la antigüedad. Por ejemplo, existen registros de infección por *Trichinella spiralis* en Egipto que datan desde hace 3220 años (Sianto et al., 2009). Otras sin embargo, fueron identificadas apenas en las últimas décadas como enfermedades emergentes. Las enfermedades emergentes son aquellas que se reconocieron o evolucionaron recientemente, o bien se han producido anteriormente, pero muestran alguna característica epidemiológica nueva, por ejemplo, en cuanto a su distribución geográfica, su rango de hospedadores o de vectores. En las últimas décadas se ha registrado un aumento sin precedentes de enfermedades emergentes y actualmente son una gran preocupación para la salud humana y animal. Se considera que existen 175 especies de patógenos asociados a enfermedades emergentes, de los cuales 132 (75%) son zoonosis (Taylor et al. 2001; Wang & Cramer, 2014).

## **2.2 Zoonosis virales emergentes del cerdo. Importancia en la Salud Pública**

El cerdo doméstico ha tenido un rol central en muchas enfermedades zoonóticas emergentes, siendo de gran importancia las de origen viral. A modo de ejemplo; entre los años 1998 y 1999 en Malasia ocurrió un brote de encefalitis febril de alta letalidad entre habitantes de pueblos que se dedicaban a la cría de cerdos. Este primer foco ocasionó la muerte de 105 personas y el sacrificio sanitario de más de un millón de cerdos. La investigación epidemiológica y posteriores estudios moleculares lograron determinar que el patógeno involucrado era un nuevo virus de la familia *Paramixoviridae* que recibió el nombre de virus Nipah. Se considera que el reservorio natural de este virus son diversas especies de murciélagos y los cerdos resultarían infectados al entrar en contacto con deyecciones, transmitiendo posteriormente la enfermedad al ser humano. (Johara et al., 2001). Asimismo, el cerdo juega un papel fundamental en la epidemiología de diversos tipos de influenza, siendo susceptible tanto a cepas aviarias como humanas. Se cree que esta característica le permite actuar como un “recipiente de mezcla” en el que se recombina el genoma viral, dando lugar a nuevos virus con potencial pandémico. Esto ocurrió en el año 2009, en el que un virus de origen suino tipo A H1N1 logró, gracias a una eficiente transmisión de persona a persona, afectar más de 30 países en apenas algunas semanas (Smith et al., 2009).

Si bien los dos ejemplos mencionados anteriormente tomaron, por diversas razones, gran notoriedad, existen multitud de patógenos virales emergentes en los que el cerdo puede

desempeñar un papel más o menos importante. Algunos de estos son el virus del oeste del Nilo, la encefalitis equina del Este, la encefalitis japonesa, el virus de la Rabia y el virus de la Hepatitis E (OPS, 2003).

### 2.3 Hepatitis virales del ser humano.

La hepatitis viral en el ser humano es causada por alguno de los 5 virus de la hepatitis conocidos, denominados A, B, C, D y E. Cada uno pertenece a una familia de virus distinta y tienen muy poco en común entre ellos, excepto que afectan un mismo órgano; el hígado, causando inflamaciones agudas o crónicas. Sin embargo, algunos de estos virus también presentan características epidemiológicas comunes; el virus de la hepatitis A (VHA) y el virus de la hepatitis E (VHE) se transmiten mayormente por la vía fecal-oral o por alimentos contaminados, mientras que los virus de las hepatitis B, C y D (VHB, VHC, VHD) se transmiten principalmente por contacto con sangre infectada, fluidos corporales o contacto sexual. Cada uno de estos virus presenta una distribución mundial. Las hepatitis virales se asocian, en su conjunto, con una gran morbilidad y mortalidad. Se estima que existen 500.000.000 de personas con infecciones crónicas por VHB y VHC. Anualmente, 1.000.000 de personas morirán por causas relacionadas con estas enfermedades, incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular (OMS, 2009).

La incidencia de las hepatitis virales es típicamente mayor en los países en vías de desarrollo que en los países desarrollados. En las últimas décadas, cambios en la ecología y comportamiento de las poblaciones humanas (higiene y acceso al saneamiento, uso de drogas, conductas sexuales, hábitos alimenticios, etc.) han traído aparejados diversos cambios en la epidemiología de estas enfermedades (Purcell, 1994). En la siguiente tabla se resumen las características principales de las hepatitis virales humanas.

**Tabla 2. Características de las diferentes hepatitis virales humanas**

	Hepatitis A	Hepatitis B	Hepatitis C	Hepatitis D	Hepatitis E
Familia	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Deltaviridae</i>	<i>Hepeviridae</i>
Género	<i>Hepatitisvirus</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	<i>Hepacivirus</i>	<i>Deltavirus</i>	<i>Orthohepevirus</i>
Genoma	ARN monocatenario	ADN bicatenario	ARN monocatenario	ARN monocatenario	ARN monocatenario
Principal vía de transmisión	Fecal-Oral	Parenteral	Parenteral	Parenteral	Fecal-Oral
Período de incubación	28-30 días	45-180 días	6-9 semanas	2-8 semanas	15-64 días
Estado de portador	No	Si	Si	Si	No*

\* Se han descrito infecciones crónicas en casos de pacientes inmunocomprometidos

## **2.3.1 Hepatitis E**

### **2.3.1.1 Descubrimiento y caracterización del VHE**

La primer epidemia bien documentada de esta enfermedad sucedió en la India en los años 1955-56 y afectó aproximadamente a 29.000 personas de la ciudad de Nueva Delhi. La investigación de este brote determinó que la fuente de infección fue el agua proveniente de una gran planta potabilizadora que había sido contaminada con aguas servidas. Inicialmente se creyó que se estaba frente a un brote de hepatitis A, pero el estudio retrospectivo de sueros de los pacientes afectados demostró que otro agente etiológico estaba involucrado ( Vishwanathan, 1957; Kumar et al. 2013). En la India la hepatitis A presentaba en ese momento una altísima prevalencia, con casi el 100% de los niños de entre 5 y 10 años seropositivos al VHA. Los investigadores consideraron poco probable que una epidemia de esa magnitud y que afectó principalmente a adultos jóvenes fuera causada por este virus. La investigación serológica determinó que prácticamente el 100% de los sueros de la epidemia contenían IgG anti-VHA (indicador de respuesta inmune tardía) pero no contenían IgM anti-VHA (indicador de infección aguda). Esto sugería una infección aguda con un agente etiológico desconocido en una población previamente expuesta al VHA. En el año 1983 se logró producir experimentalmente un cuadro típico de hepatitis en un voluntario mediante la ingestión de suspensiones de heces provenientes de casos sospechosos de hepatitis no A-no B. El voluntario presentaba inmunidad previa contra el VHA. Durante el curso de la enfermedad no se detectaron incrementos en los marcadores de infección del VHB ni en los de IgM anti-VHA. En las heces del sujeto se detectaron por microscopía electrónica partículas virales de 27-30 nm durante la fase preclínica y postclínica temprana. Posteriormente se logró la reproducción de la enfermedad en macacos mediante la inoculación intravenosa de un extracto de heces del paciente, resultando en hepatitis confirmada por histopatología, presencia de partículas virales en las heces y generación de anticuerpos específicos (Balayan, 1983). De esta manera se identificó un nuevo virus causante de hepatitis, así como su vía principal de transmisión a través del ciclo fecal-oral. La enfermedad se denominó como Hepatitis no-A no-B de transmisión entérica, en contraposición a la Hepatitis no-A no-B de transmisión parenteral, denominada Hepatitis C.

El progreso en el estudio del VHE se vio limitado por la dificultad para replicar el virus en cultivos celulares y la pequeña cantidad de virus que podían recuperarse de las infecciones experimentales en humanos y otros primates. Sin embargo, en 1990, se logró

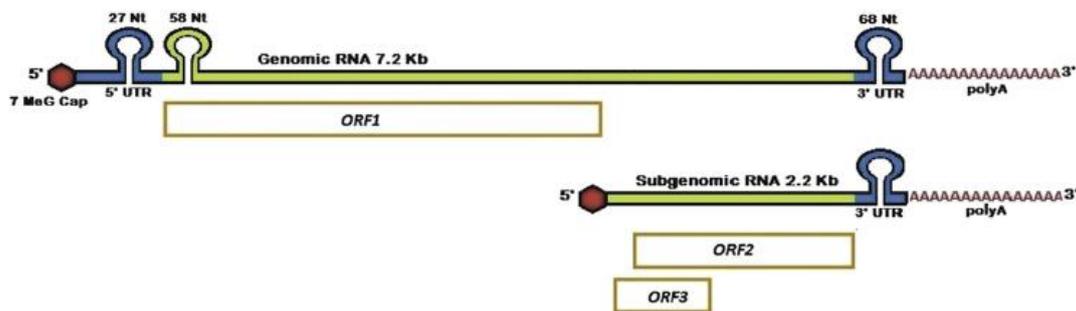
realizar la clonación parcial del virus y la expresión de antígenos codificados por su ARN mediante la tecnología de ADN recombinante (Reyes et al. 1990), y en 1993 se logró secuenciar el genoma completo del VHE y desarrollar ensayos inmunológicos sensibles y específicos que posibilitaron un rápido avance en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad (Tam et al. 1991). La nueva enfermedad fue denominada Hepatitis E, siendo la letra E por las palabras “Entérica”, “Epidémica” y “Endémica”, todas características que se aplican a la epidemiología de la enfermedad (Kumar et al., 2013).

### **2.3.1.2 Taxonomía y clasificación**

Basándose en su estructura microscópica y patrón epidemiológico, el VHE se clasificó originalmente como un miembro de la familia *Picornaviridae*, creyéndose estrechamente relacionado con el VHA (Sreenivasan et al., 1984). Al aumentar el conocimiento de la estructura genómica y morfológica del virus se conjeturó que debía estar relacionado con los *Norovirus* y se lo ubicó dentro de la familia *Caliciviridae*. No pasó mucho tiempo hasta que se descubrieron significativas diferencias en su secuencia genómica con respecto a los demás calicivirus, razón por la que se lo removió de esta familia y basado en subsecuentes análisis filogenéticos fue clasificado en el año 2014 dentro de la familia *Hepeviridae* en el género *Orthohepevirus*, que incluye todos los VHE que afectan aves y mamíferos. La nueva especie propuesta se denominó *Orthohepevirus A* e incluye los VHE conocidos que afectan al ser humano, cerdos, ciervos, conejos, etc. (ICVT, 2016). Existe además un virus que presenta un 50% de identidad de la secuencia nucleotídica con el VHE de los mamíferos que fue aislado de pollos que presentaban síndrome de hepatitis-esplenomegalia, llamado VHE aviar (Haqshenas et al., 2001). Este virus fue considerado inicialmente como el genotipo 5 del VHE pero actualmente se clasifica dentro del género *Orthohepevirus* y la especie se denomina *Orthohepevirus B*. Otros VHE estrechamente relacionados con el *Orthohepevirus A* son el *Orthohepevirus C* y el *Orthohepevirus D* que afectan a ratas y murciélagos respectivamente (ICVT, 2016).

### 2.3.1.3 Estructura del VHE

La partícula viral presenta una cápside icosaédrica, sin envoltura, de aproximadamente 32 nm. El genoma viral está formado por una sola cadena de ARN de sentido positivo de ~7,2 kb con tres regiones codificantes de proteínas o marcos de lectura abierta (ORF) parcialmente solapados: ORF1, ORF2 y ORF3, flanqueadas en 5' y 3' por dos regiones no traducidas (NTR), presentando un casquete 7-metil-guanosina en el extremo 5' y una cola de poli (A) en el extremo 3'. La región 5' NTR junto a una secuencia conservada de 58 nucleótidos de ORF1 y una secuencia homóloga a alfavirus del centro del ARN, que se pliegan en forma de estructuras «tallo y lazo» son esenciales para la replicación y la transcripción del VHE. Las proteínas codificadas por ORF2 y ORF3 se traducen desde ARN subgenómico de 2.2 kb generado durante la replicación viral (Ahmad et al. 2011; Rodríguez-Frias et al., 2012)



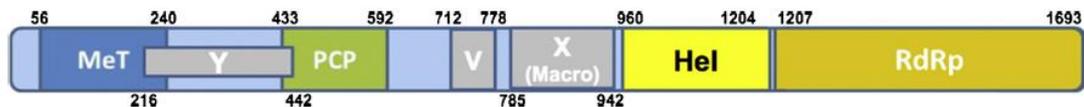
**Figura 1. Estructura del genoma del VHE.** Región codificante de ARN genómico de 7,2 kb con plegamiento en forma de “Tallo y lazo” en región 5' (verde) flanqueado por 2 regiones no traducidas (azul) y ARN subgenómico de 2,2 kb. Se muestran los tres ORFs. (Editado de Ahmad et al. 2011).

### 2.3.1.4 Variantes genéticas

El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas de los genomas completos de diversos aislamientos del VHE ha revelado una gran variación genotípica. Esto ha determinado la identificación de 4 genotipos principales (1-4) y al menos 24 subtipos (1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f u 4g) (Lu et al. 2006). Las regiones del genoma que han sido utilizadas con fines filogenéticos incluyen una secuencia de 301 nt en el extremo 5' del ORF2 y una secuencia de 306 nt en el extremo 3' del ORF1 (Ahmad et al., 2011).

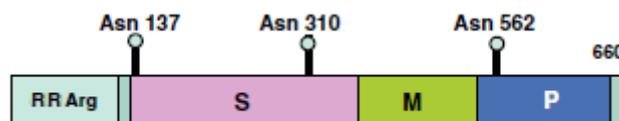
### 2.3.1.5 Proteínas del VHE

El ORF1 está ubicado en el extremo 5' y ocupa dos tercios del genoma. Codifica una poliproteína denominada proORF1 (Fig. 2) La misma posee 1693 aminoácidos y presenta múltiples motivos no estructurales necesarios para la replicación viral: metiltransferasa, cisteín-proteasa análoga a la papaína, helicasa para ARN y ARN polimerasa dependiente de ARN. Además de estos elementos, la poliproteína presenta dos dominios denominados X (actualmente conocida como “macro”) e Y que presentan homología significativa con otros virus ARN de polaridad positiva animales y vegetales como el virus del amarilleo de la remolacha (BNYVV), la Rubeola, los alfavirus y algunos coronavirus (Ahmad et al., 2011).



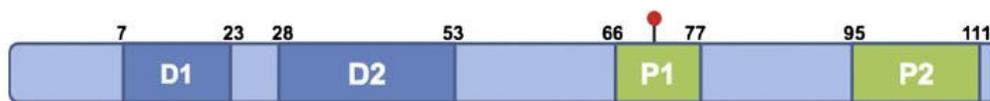
**Figura 2. ProORF1.** Se muestran los dominios funcionales metiltransferasa (MeT), cisteín-proteasa análoga a la papaína (PCP), región rica en prolina (V), Helicasa para ARN (Hel) y ARN polimerasa dependiente de ARN. Se muestran además los dominios X e Y. (Ahmad et al., 2011)

La región del ORF2 comienza en el nucleótido 5147, en posición 3'. Codifica una poliproteína de 660 aa (proORF2) glicosilada en las asparraginas 137, 310 y 562 (Fig. 3). Dímeros de proORF2 interactúan con la región N terminal del genoma viral, formando la cápside. Esta poliproteína presenta tres dominios lineales: el dominio S, que forma la cápside y los dominios M y P que se relacionan con la interacción virus—célula huésped. El dominio P queda expuesto en el exterior de la cápside, siendo un posible sitio de unión de anticuerpos neutralizantes. Los estudios inmunológicos y estructurales de proORF2 son la base del desarrollo de vacunas contra el VHE. En la actualidad existen dos vacunas recombinantes basadas en la expresión de proORF2 que han superado la etapa de pruebas clínicas en humanos (Ahmad et al., 2011; Rodríguez-Frías et al., 2012).



**Figura 3. ProORF2.** La región rica en Arginina (RRArg) interactúa con la región N terminal del genoma formando la cápside. Se muestran los dominios S, M y P y las asparraginas glicosiladas (Asn). Adaptado de Rodríguez-Frías et al. 2012.

La región ORF3 codifica para una fosfoproteína de 114 aa (proORF3) traducida desde el mARN subgenómico a partir de un cambio en la pauta de lectura respecto al codón AUG de ORF2, estando casi completamente solapado con este. La fosfoproteína codificada no es imprescindible para la replicación viral pero si es necesaria para la infección. Existe evidencia de que funcionaría como proteína accesoria viral, disminuyendo la respuesta inmune del hospedador y facilitando la replicación viral (Nagashima et al., 2011; Rodríguez-Frías et al., 2012). ProORF3 presenta dos dominios hidrofóbicos, denominados D1 y D2, y dos dominios ricos en prolina, denominados P1 y P2. El dominio D1 es rico en cisteína y es necesario para la asociación de la partícula viral con el citoesqueleto de la célula hospedadora. El dominio D2 está implicado en la unión a la hemopexina, una proteína de fase aguda cuyos niveles plasmáticos se ven disminuidos en pacientes con Hepatitis E. El dominio P1 contiene un dominio fosforilado en serina 71 mientras que el dominio P2 contendría motivos implicados en el egreso viral (Rodríguez-Frías et al., 2012).



**Figura 4. ProORF3.** Dominios hidrofóbicos (D1 y D2) y ricos en prolina (P1, fosforilado en Serina 71 (punto rojo) y P2). Adaptado de Rodríguez-Frías et al. 2012.

### 2.3.1.6 Replicación viral

El ciclo replicativo del VHE aún no se ha logrado entender completamente debido a la carencia de métodos eficientes de cultivo *in vitro* y modelos animales apropiados. Varios tipos celulares han demostrado susceptibilidad a la infección viral, entre ellas líneas celulares hepáticas y de carcinomas de pulmón y colon, aunque aún no se han identificado los receptores celulares específicos. El modelo básico propuesto es el siguiente: las partículas virales se adhieren a la superficie de las células mediante proteoglicanos heparán sulfato y posteriormente se unen a un receptor no identificado. Luego las partículas virales se internalizan, perdiendo su cápside y liberando el ARN en el citosol. El ARN de sentido positivo será traducido en proORF1 con motivos no estructurales, entre ellos, la ARN polimerasa, que replica el ARN de sentido positivo en transcritos de sentido negativo. Estos transcritos funcionan como molde para la síntesis del ARN

subgenómico así como también para los transcritos completos de sentido positivo. El ARN subgenómico de sentido positivo es traducido en proORF2 y proORF3. La primera empaqueta el ARN genómico para ensamblar nuevos viriones mientras que la segunda actuaría optimizando el medio intracelular para la replicación viral y facilitando el egreso viral (Cao & Meng, 2012). Los viriones que egresan de la célula hospedadora están envueltos con una capa lipídica asociada a proORF3. Ambas estructuras se pierden luego mediante un mecanismo que aún no se conoce (Rodríguez-Frias et al., 2012)

### **2.3.1.7 Patología y clínica de la hepatitis E**

La hepatitis E en humanos tiene un período de incubación de 1 a 10 semanas. Causa principalmente una infección aguda y autolimitante, manifestada clínicamente por síntomas prodrómicos inespecíficos como fiebre, malestar, dolor abdominal, artralgia, astenia y anorexia. Estos síntomas son seguidos en la mayoría de los casos por ictericia, coluria y heces de color claro. La patología clínica incluye hiperbilirrubinemia a predominio de bilirrubina conjugada y elevación marcada de los niveles de aminotransferasas y elevación moderada de los niveles de fosfatasa alcalina sérica. La enfermedad usualmente se resuelve en 1 a 4 semanas (Aggarwal & Krawczynski, 2000). Antiguamente se consideraba que no existía el estado de portador crónico, sin embargo se han visto infecciones crónicas en individuos inmunodeprimidos como pacientes HIV+, receptores de trasplantes o recibiendo quimioterapia para el cáncer (Dalton et al. 2009). Usualmente la tasa de letalidad en la población general es baja (0.07-0,6%), sin embargo, puede darse una falla hepática fulminante con resultado mortal. Esta situación es más común en mujeres embarazadas, especialmente las que se infectan en el segundo y tercer trimestre. La tasa de letalidad en este grupo es de 15-25% (Aggarwal & Krawczynski, 2000).

Existe gran cantidad de animales susceptibles a la infección por el VHE, entre los que se destacan el cerdo, roedores sinantrópicos, primates, ciervos, equinos, caninos y bovinos (Pavio et al., 2010). A pesar de presentar lesiones histopatológicas inflamatorias características, los animales usualmente no desarrollan signos clínicos (Maneerat et al., 1996; Pavio et al., 2010)

### **2.3.1.8 Epidemiología y patrones de transmisión**

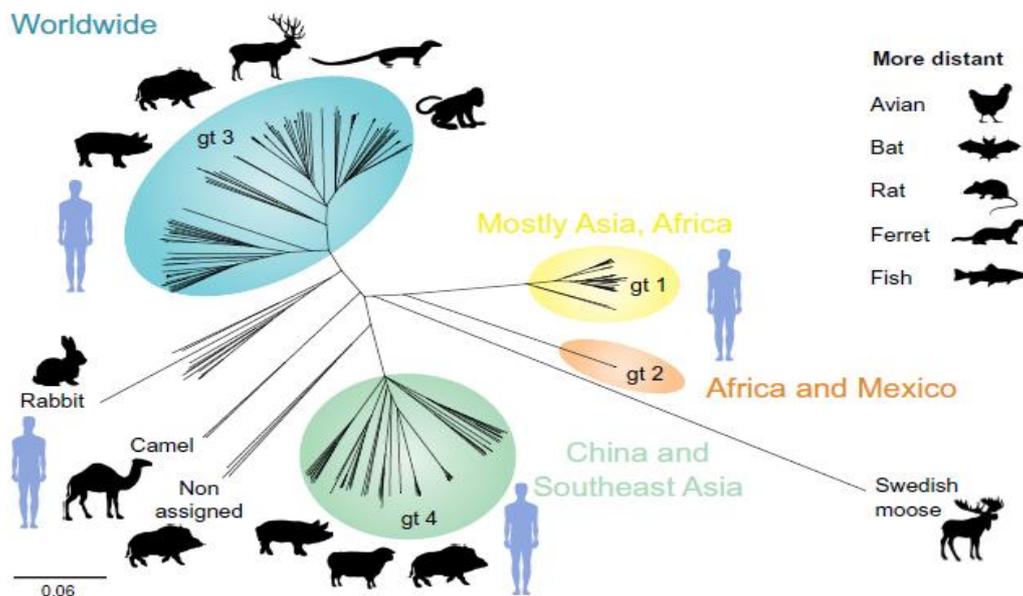
Pese a presentar gran diversidad genética, se reconoce un solo serotipo del VHE. La seroprevalencia presenta una distribución mundial, siendo mayor en los países donde la enfermedad es endémica. Se cree que la hepatitis E es la principal causa de hepatitis aguda en adultos del Sudeste Asiático, Asia central y Centroamérica, así como la segunda causa más importante en Oriente medio y el norte de África. En estas regiones endémicas, donde las condiciones de saneamiento muchas veces son deficientes, se producen brotes epidémicos que pueden llegar a cientos o miles de casos. La principal vía de transmisión es fecal-oral a través de agua contaminada con excretas humanas, siendo rara la transmisión de persona a persona, por alimentos contaminados o a través de transfusiones (Rodríguez-Frias et al., 2012; Kumar et al., 2013). Los genotipos implicados en este tipo de transmisión son 1 y 2. Estos genotipos afectan sólo al ser humano, el genotipo 1 es más prevalente en regiones tropicales y subtropicales de Asia y África, mientras que el genotipo 2 es más prevalente en México y África occidental y del Sur (Purdy & Khudyakov, 2011).

Los países desarrollados, que cuentan con adecuados sistemas de disposición de excretas y suministro de agua potable como Japón, Estados Unidos y la mayor parte de los países europeos, son considerados no endémicos para la hepatitis E. En los mismos existe un patrón epidemiológico distinto al mencionado anteriormente, caracterizado por casos esporádicos. Algunos de estos casos corresponden a individuos que viajaron a países endémicos, sin embargo, en muchos otros no se logra establecer claramente la fuente de infección (Kumar et al., 2013). Existe gran cantidad de evidencia que apunta a que en estos casos, la infección podría tener una fuente zoonótica. Los genotipos comúnmente aislados en estos casos son el 3, que presenta una distribución mundial y el 4, presente en Japón, China y otros países asiáticos. Estos genotipos también están presentes en países endémicos pero rara vez producen enfermedad en humanos (Purdy & Khudyakov, 2011; Kumar et al., 2013). Ambos genotipos pueden infectar a varias especies de mamíferos además del ser humano (Debing et al., 2016)

### 2.3.1.9 VHE en animales y evidencia de transmisión zoonótica

Como se mencionó anteriormente, la ocurrencia de casos esporádicos de hepatitis E en regiones sin transmisión epidémica planteaban, en muchos casos, la incógnita de la fuente de infección. La seroprevalencia en humanos en los países desarrollados varía entre 0,4 - 5% incluso en personas sanas y sin antecedentes de viajes a zonas endémicas. Esta seroprevalencia presenta un pico en adultos jóvenes y es relativamente baja en niños, patrón inconsistente con una infección transmitida por la vía fecal-oral (Kabrane-Lazizi et al., 1999).

Las primeras evidencias de que los animales podrían ser una fuente de infección para el hombre provienen de estudios serológicos, dado que se encontraron anticuerpos anti-VHE en cerdos, roedores, ovejas y primates infectados natural y experimentalmente (Kabrane-Lazizi et al., 1999). En el año 1997 se detectó en cerdos de Estados Unidos por primera vez una cepa de VHE que circulaba en animales, a la que llamaron VHE suino (Meng et al., 1997). Desde entonces, se han encontrado y caracterizado genéticamente cepas de VHE en muchos animales con mayor o menor homología con cepas detectadas en humanos (Fig. 5).



**Figura 5. Genotipos del VHE (*Orthohepevirus A*), distribución geográfica y reservorios.** Los genotipos 1 y 2 (gt 1 y 2) sólo se han detectado en el ser humano y son prevalentes en zonas endémicas, mientras que los genotipos 3 y 4 (gt 3 y 4) infectan además múltiples especies de mamíferos como cerdos, ciervos, mangostas y primates. El genotipo 3 presenta una distribución mundial mientras que el genotipo 4 está restringido a China y el Sudeste Asiático. Existen además cepas no asignadas a estos genotipos que afectan especies como conejos, camellos y eventualmente al ser humano. Otras especies del VHE pueden afectar a aves (*Orthohepevirus B*), Ratas (*Orthohepevirus C*) y murciélagos (*Orthohepevirus D*). (Imagen extraída de Debing et al. 2016).

De estas cepas, las detectadas en suinos son las que guardan mayor relación con las detectadas en casos esporádicos en humanos y se cree que estos animales serían un reservorio natural del VHE (Pavio et al., 2010). La máxima prevalencia de VHE en heces de cerdos se encuentra entre las 13 y 16 semanas de edad, por lo que los lechones adquirirían la infección en las primeras 3-6 semanas de vida por el contacto con la madre, posiblemente a través de las heces (Fernández-Barredo et al., 2006). Estudios filogenéticos en países europeos determinaron que las cepas de casos autóctonos de Hepatitis E en humanos presentaban una identidad del 99-100% con cepas presentes en cerdos de la misma región y pertenecían al genotipo 3 (Norder et al., 2009). La transmisión por alimentos está bien establecida. En Japón se asociaron casos de hepatitis E al consumo de hígado o carne cruda o insuficientemente cocida de ciervo, jabalí y cerdo. En estos casos se logró recuperar ARN viral de los pacientes y de la carne sobrante. El estudio del genoma del VHE presente en los pacientes y en restos de los alimentos sospechosos presentó identidades de entre 98.5-100%. Los genotipos aislados fueron 3 y 4 (Yazaki et al., 2003; Pavio et al., 2010). Además de casos aislados, existen también brotes de hepatitis E asociados al consumo de cerdo: en Francia se detectaron simultáneamente dos casos en una pareja que había consumido carne de cerdo insuficientemente cocida cuatro semanas antes del inicio de los síntomas (Deest et al. 2007) y en Japón ocurrió un brote en una familia de 8 personas que compartió una cena con carne de cerdo insuficientemente cocida (Matsubayashi et al. 2008). El hallazgo de ARN del VHE en hígado y otros productos porcinos en puntos de venta al público parece ser relativamente común. En un estudio en Estados Unidos se detectó ARN viral en 11% de 127 hígados muestreados (Feagins et al., 2007) mientras que otro estudio en Francia detectó prevalencias de 4% en hígados y de entre 25 y 30% en diversos embutidos preparados con hígado sin cocinar (Pavio et al., 2014). También se implicó el consumo de moluscos bivalvos criados en aguas contaminadas como fuente de infección. Evidencia de esto fue un estudio epidemiológico de casos y controles realizado en un brote de hepatitis E en un crucero que involucró a 33 personas, encontrándose el consumo de mariscos como el mayor factor de riesgo (Said et al., 2009). Los parámetros fijados para la inactivación térmica del virus en alimentos fueron 20 min. a 71 °C en el centro del producto, esto corresponde a la carne bien cocida, resultando peligrosas las carnes crudas, insuficientemente cocidas e incluso las de cocción intermedia (Barnaud et al., 2012)

Además de la infección a través de alimentos, otra vía propuesta es el contacto directo, ya que las poblaciones en contacto frecuente con cerdos presentan una seroprevalencia mayor que los no expuestos. Un estudio en Estados Unidos que abarcó 295 veterinarios de 8 estados que trabajaban frecuentemente con cerdos, encontró una prevalencia mayor en estos que en la población general (27% contra 16%). Dicho estudio no encontró como factores de riesgo el tiempo semanal que dedicaban al trabajo con porcinos ni el hecho de haber tenido accidentes con jeringas u objetos cortantes durante el mismo (Meng et al., 2002). Otros estudios realizados en China, Tailandia, Suecia y Holanda también encontraron mayores seroprevalencias en criadores de cerdos o personal que trabajaba frecuentemente con cerdos (Pavio et al., 2010). Tal vez una de las evidencias más claras que apoyan la teoría de la transmisión directa de esta zoonosis es el caso de un hombre de 41 años, diagnosticado con hepatitis E en Estados Unidos a las 8 semanas de haber adquirido un cerdo como mascota. Tanto en el paciente como en el animal se logró detectar, mediante RT-PCR, ARN viral en muestras de suero. El genotipo involucrado fue el 3. El grado de homología a nivel de nucleótidos entre la cepa del paciente y la del cerdo fue de 92%. Según los autores, esta diferencia (en los casos de transmisión por alimentos la homología ronda el 100%) se explica por las mutaciones acumuladas durante un período de viremia inusualmente largo. La fuente de infección propuesta fue el contacto con la materia fecal del cerdo (Renou et al., 2007).

### **2.3.1.10 Situación en América Latina y Uruguay**

El primer indicio de circulación viral en Latinoamérica proviene de estudios serológicos en Venezuela detectando seroprevalencias de entre 1,6 y 5,4% en diversos grupos poblacionales (Pujol et al. 1994). Desde entonces se han realizado muestreos serológicos en gran parte de los países de la región, sobre todo en donantes de sangre, obteniendo diversas seroprevalencias; Argentina (1,8%), Brasil (2%), Bolivia (16,2%), Chile (8%), Cuba (1,4%), México (6,3%), Nicaragua (4,6-8%), Uruguay (1,2%). Muchos estudios muestran una evidente variación en la seroprevalencia en distintos grupos poblacionales estudiados (ej: Donantes de sangre, Amerindios, población rural, voluntarios sanos, etc). Hasta el momento sólo se detectaron brotes epidémicos en México, Cuba y Venezuela, estando involucrados los genotipos 3 y 1. El genotipo 2a también fue detectado en México pero sólo en una ocasión por lo que su presencia resulta controversial (Echevarría et al., 2013). Por lo mencionado anteriormente se considera a México y el Caribe como regiones

endémicas donde los genotipos 1 y 3 circulan entre humanos. Otros países de Sudamérica como Perú, Chile, Brasil, Argentina y Uruguay han diagnosticado casos esporádicos de Hepatitis E en humanos. En los últimos tres países se lograron tipificar algunas de las cepas circulantes: en Argentina se detectaron casos autóctonos pertenecientes a los genotipos 3i, 3a y un caso de un viajero que presentó el genotipo 1a (Munné et al., 2006a) mientras que en Brasil se detectó el genotipo 3b (Lopes dos Santos et al. 2010). La situación de Uruguay se discutirá más adelante.

Además de las cepas de casos de hepatitis en el ser humano, se han logrado tipificar en la región cepas provenientes de cerdos. La primer cepa suina detectada en Sudamérica provenía de Argentina, pertenecía al genotipo 3 y presentaba una prevalencia del 4 al 98% en diversos establecimientos de cinco provincias diferentes. Las cepas identificadas guardaban una relación cercana con cepas humanas diagnosticadas en la región (Munné et al. 2006b). En Brasil se logró detectar ARN de VHE en 15.3% de muestras de materia fecal de cerdos, también en hígado y bilis de lechones. En todos los casos el genotipo aislado fue el 3 (Gardinali et al., 2012).

Los primeros estudios serológicos sobre la hepatitis E en nuestro país son del año 1997 y arrojan una seroprevalencia de 1,2% en 252 donantes de sangre estudiados y 2,8% en 214 pacientes ambulatorios (Cruells et al. 1997). Se reportaron, entre los años 2009 y 2010, 9 casos de hepatitis E en humanos sin factores de riesgo (viajes al exterior, consumo de cerdo, etc.) ni relación entre ellos. En los 9 casos se logró detectar ARN viral mediante RT-PCR en muestras de suero, secuenciándose posteriormente las cepas involucradas. Las mismas pertenecían al genotipo 3 y se agrupaban juntas en el análisis filogenético, estando a su vez relacionadas estrechamente con una cepa tipificada en Alemania (Mirazo et al., 2011). En el año 2014 se publicó el primer caso de falla hepática aguda por VHE en una adolescente de una zona urbana sin factores de riesgo, lográndose detectar ARN viral en sangre y heces. El genotipo involucrado fue nuevamente el 3 (Mainardi et al., 2014). En el año 2014 se detectó un caso autóctono de hepatitis E en un soldado de 26 años sin factores de riesgo, logrando identificarse mediante PCR anidada y posterior secuenciación, el genotipo 1. Del análisis filogenético se desprende una gran identidad nucleotídica (99-100%) con cepas de la India, Cuba y Venezuela (Mirazo et al., 2014). Este caso resulta especialmente interesante ya que sugiere una posible transmisión fecal-oral entre personas en nuestro país.

Al momento de realizar este trabajo, la situación del VHE con respecto a los reservorios animales, particularmente el cerdo, es desconocida.

### **3. HIPÓTESIS**

El principal motivo para la búsqueda de cepas virales en cerdos y otros animales radica en su importancia para la salud pública ya que, como se mencionó anteriormente, esta enfermedad es una zoonosis transmitida por alimentos y, muy probablemente, de transmisión directa. En nuestro país se consumen un promedio de 15,5 kg de carne porcina/habitante/año, siendo la tercer carne más consumida, por detrás de la carne bovina y la carne de ave (INAC, 2015). Estos volúmenes incluyen productos porcinos como embutidos, jamones, paté, etc. algunos de los cuales se consumen sin pasar por procesos térmicos que garanticen la inactivación del virus (Pavio et al., 2014). Esto, sumado al hecho de que existan múltiples casos autóctonos de Hepatitis E diagnosticados en nuestro país, hace necesario estudiar si existe circulación viral en las poblaciones porcinas de Uruguay y aumentar el conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad. En este trabajo se hipotetiza que el VHE circula en cerdos domésticos de Uruguay y que el consumo de su carne es una potencial fuente de infección para el humano.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General.**

- Evaluar desde una perspectiva de la salud pública la circulación de VHE en explotaciones comerciales de suinos del Uruguay y estimar el impacto zoonótico de la infección, al realizar un estudio comparativo con las cepas virales detectadas en casos clínicos reportados en humanos.

### **4.2 Objetivos Específicos.**

- Demostrar, mediante la detección de ARN viral, la presencia del VHE en la muestra de suinos seleccionada.
- Identificar los genotipos virales circulantes en suinos en el Uruguay.
- Comparar filogenéticamente las cepas detectadas en suinos con las aisladas en humanos en nuestro país en los años 2009 y 2010.
- Comparar filogenéticamente las cepas obtenidas con aislados de suinos y humanos de la región y el mundo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Población objetivo

La población a ser muestreada se seleccionó a partir de cerdos enviados a faena en un frigorífico que recibe animales de 5 explotaciones comerciales. Todos los individuos faenados eran animales adultos sanos.

**Tabla 3. Procedencia y número de animales faenados en las instancias de muestreo**

	Procedencia de los animales	Nº de animales faenados	Nº de muestras colectadas	(%)
Productor 1	Colonia y San José	238	63	26,5
Productor 2	Canelones	20	10	50,0
Productor 3	Canelones	30	21	70,0
Productor 4	Florida	152	42	27,6
Productor 5	No especificado	71	48	67,6

### 5.2 Tipo de muestra, metodología de muestreo y acondicionamiento de la muestra.

El tipo de muestra analizado correspondió a un trozo de parénquima hepático de aproximadamente 2x2 cm. El hígado es el principal órgano diana del VHE y ha demostrado ser apto para la detección de ARN viral en cerdos (Yazaki et al., 2003; Feagins et al., 2007; Gardinali et al., 2012;), presentando además la ventaja de ser fácil de recolectar de la bandeja de vísceras en la línea de faena. El muestreo realizado fue de conveniencia, tomando las muestras de cada lote según lo permitía la rutina de faena. Se colectaron muestras de 184 hígados, las mismas fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio de la sección Virología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, permaneciendo congeladas a -20 °C hasta su procesamiento.

### 5.3 Procesamiento de las muestras

#### 5.3.1 Corte y lisis

Cada muestra se descongeló y cortó hasta obtener una masa homogénea, realizándose luego pools de 2 a 5 muestras cada uno, provenientes del mismo establecimiento y lote de faena.

La digestión de los pools se realizó utilizando un buffer de lisis compuesto de Proteinasa K 20 mg/ml (Life Technologies, Estados Unidos), buffer Tris pH 8,3 (0.01 M), SDS (0,5%) y agua. Se adicionó a cada muestra 1 ml de buffer de lisis, incubándose luego a

56 °C a baño maría hasta su completa digestión (2-3 horas). Posteriormente se centrifugó (5 min, 15.000 rpm) y se extrajo el sobrenadante.

### 5.3.2 Extracción de ARN total

La extracción de ARN se realizó con TRIzol® según las especificaciones del fabricante.

Los pasos realizados fueron los siguientes:

Se adicionó a cada muestra (volumen aprox. 400 µl) 600 µl de TRIzol® (Life Technologies, Estados Unidos) homogeneizándose luego mediante pipeteo y vórtex y se dejó en reposo la muestra por 5 min. Luego, para lograr la separación de fases, se agregaron 200 µl de cloroformo por ml de TRIzol®, mezclándose mediante vórtex. Luego de 3 min se realizó una centrifugación (13.400 rpm) durante 15 min. La fase acuosa superior resultante fue extraída hacia otro tubo Eppendorf y se agregaron 0,5 ml de isopropanol por ml de TRIzol® para lograr la precipitación del ARN, manteniendo luego la muestra a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se realizó una centrifugación durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y al pellet resultante se agregó 1 ml de etanol 75%. Luego de centrifugar durante 2 min a 3.800 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 30 minutos en estufa a 37 °C. Finalmente se resuspendió el pellet en 100 µl de agua libre de ARNasas, homogeneizando mediante pipeteo y vórtex e incubando durante 10 min a 60 °C. El ARN se mantuvo en congelación a -70 °C hasta la posterior amplificación mediante retrotranscripción y PCR anidada.

### 5.3.3 Amplificación de genoma viral

Para la detección del VHE mediante RT-PCR se utilizaron dos juegos de cebadores dirigidos a amplificar distintas regiones del genoma viral. En la Tabla 4 se resumen las características de los mismos.

**Tabla 4. Cebadores utilizados**

Designación	Secuencia (5' → 3')	Producto esperado	Región objetivo	Referencia
3156 (directo)	AAYTATGCMCAGTACCGGGTTG	330 pb.	ORF 2 (nt 5687–5708)*	Meng et al., 1997
3157 (reverso)	CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC		ORF 2 (nt 6395–6417)	
3158 (directo)	GTYATGYTYTGATACATGGCT		ORF 2 (nt 5972-5993)	
3159 (reverso)	AGCCGACGAAATYAATTCTGTC		ORF 2 (nt 6298–6319)	
HES1 (directo)	CTGGCATYACTACTGKYATTGAGC	287 pb.	ORF 1 (nt 54-77)	Wang et al., 1999
HEA1 (reverso)	CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC		ORF 1 (nt 419-397)	
HES2 (directo)	CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG		ORF 1 (nt 50-70)	
HEA2 (reverso)	GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC		ORF 1 (nt 336-313)	

\* Cepa Hyderabad, India (AF076239)

### **5.3.3.1 Retrotranscripción**

Para la obtención de cADN se llevó a cabo la retrotranscripción de la siguiente manera: A cada muestra de ARN con un volumen de 2,5 µl se agregó 0,5 µl (a una concentración de 10 µM) del cebador reverso (3157 o HEA1) y 2,5 µl de agua. La muestra fue incubada a 70 °C durante 5 min para lograr una transcripción eficiente de las regiones del ARN que presentan estructura secundaria. Luego se mantuvo en hielo por 5 min, y se adicionaron 2 µl de buffer de reacción 5X, 1 µl de dNTP, 0.5 µl de enzima RevertAid™ (Life Technologies, Estados Unidos) y 3,5 µl de agua totalizando un volumen de 10 µl. A continuación se incubó una hora a 42°C para realizar la retrotranscripción y se finalizó la reacción incubando la muestra a 70 °C durante 15 min para inactivar la transcriptasa inversa.

### **5.3.3.2 Amplificación mediante PCR anidada**

Las reacciones de PCR para amplificar el cADN obtenido mediante retrotranscripción tuvieron como objetivo dos regiones distintas del genoma viral. En algunas muestras se utilizaron los cebadores desarrollados por Wang et al. (1999) que amplifican un segmento de 287 pb del ORF 1, mientras que en otras se utilizaron los cebadores desarrollados por Meng et al. (1997) que amplifican un segmento de 330 pb dentro del ORF2. Para obtener una mayor sensibilidad de la prueba diagnóstica se realizó la técnica de PCR anidada que consta de dos rondas de PCR consecutivas, utilizando cebadores externos en la primera e internos en la segunda.

La reacción se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

Para la primer ronda de amplificación del ORF1, se adicionaron a cada muestra de 5 µl de cADN, 5 µl de buffer (10X), 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de dNTP, 1,5 µl de cada uno de los cebadores externos (HES1 y HEA1) a una concentración de 50 µM, 31,7 µl de agua y finalmente 0,3 µl (2 U) de la enzima Taq DNA Polymerase Invitrogen™ (Life Technologies, Estados Unidos), totalizando un volumen de 50 µl. El perfil térmico utilizado fue el siguiente: 94 °C durante 5 min seguido de 35 ciclos de 5 min a 94 °C, 45 segundos a 50 °C (a esta temperatura se logra la hibridación de los cebadores) y 1 min. a 72 °C. Finalmente, para la elongación final se incubó la muestra a 72 °C durante 10 min. Del producto de esta primera reacción se utilizaron 5 µl para la segunda ronda de PCR.

La misma se llevó a cabo en las mismas condiciones pero utilizando los cebadores internos (HES2 y HEA2).

Para la amplificación del ORF2, las reacciones de PCR se llevaron a cabo en las mismas condiciones con la diferencia de la temperatura de hibridación de los cebadores, que en este caso fue de 44 °C. Los cebadores de la primer ronda de PCR (externos) fueron 3156 y 3157 y los de la segunda ronda (internos) 3158 y 3159. En todos los casos se incluyó un control positivo y al menos un control negativo.

#### **5.3.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Para la separación de los productos amplificados se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se realizó de la siguiente manera: se adicionaron 0,5 g de agarosa (Tiangen™, China) en 50 ml de buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, calentando la mezcla hasta lograr su completa disolución. Luego se dejó entibiar y se adicionaron 3 µl de SYBR® Safe (Life Technologies, EEUU) volcando posteriormente la solución en una cuba electroforética y dejándola gelificar. Como buffer de electroforesis se utilizó TAE 1X.

Posteriormente, se mezclaron 10 µl de ADN producto de las reacciones de PCR con el buffer 6X Loading Buffer (Life Technologies, Estados Unidos) resuspendiendo la muestra mediante pipeteo y cargándola luego en el pocillo del gel. Se cargó además, en cada corrida de electroforesis un marcador de 100 pb GeneRuler™ (Life Technologies, Estados Unidos) para la identificación del tamaño de los productos. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 40 min.

La visualización del ADN se llevó a cabo utilizando un transiluminador con luz UV ( $\lambda \approx 300$  nm).

#### **5.3.5 Purificación del ADN y secuenciación de los amplicones**

Con el objetivo de eliminar subproductos, cebadores y dNTPs contaminantes que impidan la secuenciación, se llevó a cabo la purificación de los fragmentos de ADN del tamaño esperado utilizando un kit comercial (Tiangen Universal Purification Kit, China).

El ADN purificado fue secuenciado en ambos sentidos por el servicio de secuenciación de MacroGen Inc. (Corea del Sur).

### **5.3.6 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético**

Para la edición y alineamiento de los productos secuenciados se utilizó el software BioEdit v7.2.5. Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente para corregir las inconsistencias presentes en el cromatograma. Asimismo, se eliminaron las primeras 45 bases (zona de hibridación de cebadores) y la región final (últimas 20 bases) por presentar una baja intensidad de señal. La secuencia resultante fue alineada con las cepas secuenciadas en humanos de Uruguay así como secuencias representativas de los 4 genotipos del VHE de todo el mundo extraídas de la base de datos GenBank (National Institutes of Health, Estados Unidos). Se incluyó además como *outgroup* una secuencia del VHE aviar (AY043166).

Para estimar la distancia genética entre las cepas alineadas se utilizó el método de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros. La construcción del árbol filogenético se realizó por el método de Neighbor Joining utilizando el software Mega v6.0.

La significancia estadística de los agrupamientos filogenéticos se evaluó por el método de *bootstrapping* con 1000 réplicas. Únicamente los valores mayores a 70% fueron considerados significativos.

## **6. RESULTADOS**

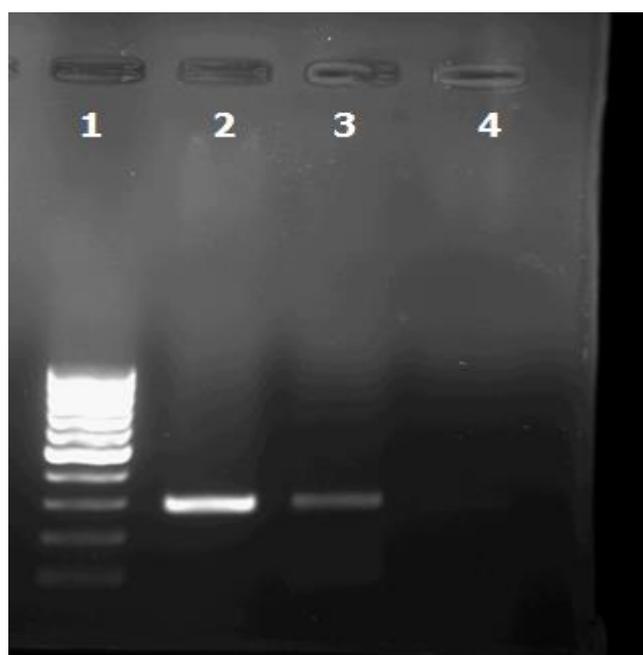
### **6.1 Amplificación del genoma del VHE**

Se lograron procesar 110 muestras (59,8% de las muestras obtenidas) agrupadas en 28 pools con las dos metodologías moleculares descritas anteriormente, obteniendo una reacción positiva a RT-PCR solamente en un caso. La tasa de infección fue de 3,6% y la muestra positiva perteneció al establecimiento del productor 4, ubicado en el departamento de Florida.

**Tabla 5. Muestras procesadas**

Primers utilizados	n° pools	n° muestras	RT-PCR
			pos
Meng y col. 1997	4	17	0
Wang y col. 1999	24	93	1

Luego de la electroforesis se logró observar una correcta amplificación sin productos inespecíficos (Fig. 6)



**Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.**  
Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2:  
Muestra 7.1-4 Carril 3: Control positivo Carril 4:  
Control negativo.

## 6.2 Análisis filogenético

La cepa detectada fue denominada HESw2015. La secuenciación de la banda obtenida mediante RT-PCR fue alineada con las cepas aisladas en Uruguay, encontrándose un porcentaje de identidad nucleotídica con cepas humanas de entre 95,5 y 97,3%. El árbol filogenético fue construido incluyendo las 16 cepas secuenciadas en humanos de Uruguay y 46 secuencias representativas de los 4 genotipos del VHE a nivel mundial (Fig. 7)



**Figura 7. Reconstrucción filogenética obtenida con la región ORF1.** El árbol filogenético fue obtenido por el método Neighbor-Joining utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura dos parámetros. Se muestran las agrupaciones con un valor de *bootstrap* mayor a 70%.

- Cepas secuenciadas en humanos de Uruguay (Mirazo et al., 2013) ▲ Cepa secuenciada en este trabajo.

La cepa HESw2015 agrupó con cepas clasificadas dentro del genotipo 3 y resultó estar muy estrechamente relacionada con el cluster de aislamientos detectados en Uruguay. Asimismo se observó una alta identidad de secuencia con dos cepas secuenciadas en Alemania.

## 7. DISCUSIÓN

La hepatitis E fue caracterizada como una nueva enfermedad de transmisión entérica apenas hace algunas décadas, siendo la evidencia de transmisión zoonótica mucho más reciente. Por este motivo es considerada una zoonosis emergente y queda aún mucho por saber sobre su epidemiología. La amplia mayoría de los animales reservorios infectados por el VHE no desarrollan signos clínicos y la Hepatitis E tiene escasa o nula importancia como enfermedad en la producción porcina (Fernández-Barredo et al., 2006; Kasorndorkbua et al., 2003). Aun así, el estudio del VHE en cerdos resulta de gran importancia para minimizar la transmisión zoonótica y proteger al consumidor de la infección. En este trabajo se realizó un amplio relevamiento de varias piaras de suinos remitidos a un establecimiento de faena, lográndose detectar una cepa porcina del VHE a la que se denominó HESw2015. Si bien la tasa de infección detectada es baja, es comparable con las detectadas en otras regiones no endémicas como Brasil (Gardinali et al., 2012), Francia (Pavio et al., 2014) y Estados Unidos (Feagins et al., 2007). Es posible que la tasa de detección sea mayor si se utiliza un método más sensible como PCR en tiempo real (*qPCR*) lo que permitiría además cuantificar la carga viral de las muestras. Sin embargo, es considerado que la técnica de PCR anidada utilizada en este estudio tendría una capacidad de detección similar a la *qPCR* (Mirazo et al., 2013). Como forma de estudiar más en profundidad la circulación del VHE en cerdos y otros reservorios del Uruguay es necesario implementar amplios estudios de seroprevalencia. El genotipo detectado fue el 3, uno de los dos genotipos con potencial zoonótico establecido y el único que circula en la región (Echevarría et al., 2013). Esto coincide con estudios regionales ya que cepas del genotipo 3 fueron aisladas en explotaciones de cerdos de Argentina, Brasil y Bolivia (Munné et al., 2006; Dell'Amico et al., 2011; Gardinali et al., 2012). A este genotipo pertenecen además la mayoría de las cepas detectadas en humanos de Uruguay (Mirazo et al. 2013). La cepa HESw2015 presentó una identidad nucleotídica muy alta con las cepas detectadas en humanos, formando con ellas un grupo monofilético con elevado soporte estadístico. Sin embargo, esta identidad es algo menor a la encontrada en otros trabajos donde la similitud entre cepas suinas y humanas ronda el 100% (Norder et al., 2009; Yazaki et al., 2003). Esta falta de identidad no puede explicarse por la variabilidad entre los aislamientos ya que la región amplificada del ORF1 es altamente conservada (Ahmad et al., 2011). Por este motivo, se sugiere que esta cepa no sería la causante de ninguno de los casos reportados de Hepatitis E en nuestro país. Asimismo, el

análisis filogenético mostró que la cepa porcina es ancestral a las cepas humanas de Uruguay divergiendo del ancestro común de manera más temprana, lo que sugiere que la infección humana en Uruguay fue precedida por la infección en cerdos y aporta evidencia sobre el posible origen zoonótico de los casos de Hepatitis E. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis es necesario implementar estudios de inferencia Bayesiana y coalescencia. Por otro lado, el hecho de que la cepa HESw2015 se agrupara con secuencias obtenidas de jabalíes de Alemania (FJ748530) es consistente con lo reportado en cepas humanas de Uruguay mediante el análisis de otras regiones genéticas (Mirazo et al., 2013). El origen europeo de estos agrupamientos filogenéticos ha sido sugerido claramente en un reciente análisis filogeográfico de cepas genotipo 3 del VHE y en el que se postula la introducción puntual del patógeno en nuestro país desde Europa a principios del siglo XX. Esta hipótesis está apoyada además en el hecho histórico de la introducción del jabalí al Uruguay a partir de la década de 1920 desde Europa (Mirazo et al., 2016).

## **8. CONCLUSIONES**

En este trabajo se realizó un amplio muestreo de cerdos destinados a entrar en circuitos comerciales de carne porcina. El hallazgo de una cepa del VHE en esta muestra sugiere que, al igual que en otras regiones, el virus circula en algunas poblaciones de cerdos del Uruguay. El genotipo al que pertenece la cepa detectada tiene un potencial zoonótico bien establecido por lo que este trabajo logró identificar los productos porcinos de animales autóctonos como una posible fuente de infección para la hepatitis E. Los análisis filogenéticos demostraron que el aislado HESw2015 no es idéntico a nivel nucleotídico con las cepas detectadas en casos humanos, aunque evidenciaron una estrecha relación evolutiva. Además, este trabajo sugiere que la infección en cerdos precedió en el tiempo a la infección en seres humanos, lo que aporta evidencia adicional a la hipótesis del origen zoonótico de la hepatitis E en Uruguay. Por estos motivos, en nuestro país se debe considerar la hepatitis E como un riesgo más de consumir carne de cerdo insuficientemente cocida o productos porcinos que no hayan pasado por procesos que garanticen su inocuidad. Las medidas de prevención deben extremarse en poblaciones donde la letalidad de esta enfermedad es alta como mujeres embarazadas, receptores de trasplantes o personas inmunodeprimidas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aggarwal, R., Krawczynski, K. (2000). Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(1), 9–20. <http://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02006.x>
2. Ahmad, I., Holla, R. P., Ahmad, Z., Jameel, S. (2011). Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Research*, 161, 47–58.
3. Balayan, MS. Andjaparidze, AG. Savinskaya, SS. Ketiladze, ES. Braginsky, DM. Savinov, AP. Poleschuk VF (1983) Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*;20:23–31.
4. Barnaud, E., Rogée, S., Garry, P., Rose, N., Pavio, N. (2012). Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5153–5159. <http://doi.org/10.1128/AEM.00436-12>
5. Blaha, T. (1997). Public health and pork: Pre-harvest food safety and slaughter perspectives. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International Des Epizooties*, 16(2), 489–495.
6. Cao, D., Meng, X.-J. (2012). Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerging Microbes and Infections*, 1(e17; doi:10.1038/emi.2012.7.). <http://doi.org/10.1007/s12038-008-0064-1>
7. Cruells, MR. Mescia, G. Gaibisso, R. Ramírez, M. Gutiérrez, M. Kohen, S. González, M. Russi, J. Chiparelli, H. Ucar, L. Pérez, M. (1997). Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay. *Gastroenterología y Hepatología* 20(6):295–298.
8. 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. *The New England Journal of Medicine*, 361(10): 1025–1027. <http://doi.org/10.1056/NEJMc0903778>
9. Debing, Y., Moradpour, D., Neyts, J., Gouttenoire, J. (2016). Update on hepatitis e virology: Implications for clinical practice. *Journal of Hepatology*, 65(1): 200–212. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.045>
10. Deest G, Zehner L, Nicand E, Gaudy-Graffin C, Goudeau A, Bacq Y. (2007).

Autochthonous hepatitis E in France and consumption of raw pig meat. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*; 31: 1095–1097.

11. Dell'Amico, M. C., Cavallo, A., Gonzales, J. L., Bonelli, S. I., Valda, Y., Pieri, A., Segund H., Ibañez R., Mantella A., Bartalesi F., Tolari F., Bartoloni, A. (2011). Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Bolivia. *Emerging Infectious Diseases*, 17(8): 1488–1490. <http://doi.org/10.3201/eid1708.100769>
12. Echevarría, J. M., González, J. E., Lewis-Ximenez, L. L., Lopes dos Santos, D. ., Munné, M. ., Pinto, M., Pujol, F., Rodríguez-Lay, L. A. (2013). Hepatitis E Virus Infection in Latin America: A Review. *Journal of Medical Virology*, (85): 1037–1045. <http://doi.org/10.1002/jmv>
13. FAO, 2016. Pigs and animal production. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/pigs/home.html>. Fecha de consulta: 19/9/2016
14. Feagins, A. R., Opriessnig, T., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Meng, X. J. (2007). Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery in the USA. *Journal of General Virology*, 88(3): 912–917. <http://doi.org/10.1099/vir.0.82613-0>
15. Fernández-Barredo, S., Galiana, C., García, A., Vega, S., Gómez, M. T., Pérez-Gracia, M. T. (2006). Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(5): 462–465.
16. Fosse, J., Seegers, H., Magras, C. (2008). Foodborne zoonoses due to meat: A quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. *Veterinary Research*, 39(1): 1–16. <http://doi.org/10.1051/vetres:2007039>
17. Gardinali, N. R., Barry, A. F., Otonel, R. A. A., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A. (2012). Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(7): 935–939. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762012000700016>
18. Giuffra, E., Kijas, J. M. H., Amarger, V., Carlborg, Ö., Jeon, J. T., Andersson, L. (2000). The origin of the domestic pig: Independent domestication and subsequent

- introgression. *Genetics*, 154(4): 1785–1791.
19. Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H., Meng, X. J. (2001). Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *The Journal of General Virology*, 82 (Pt 10): 2449–2462. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2449>
  20. ICVT (International Committee on Taxonomy of Viruses) (2016). Hepatitis E virus.. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/>. Fecha de consulta: 3/10/2016.
  21. INAC. (2015). Principales Indicadores del consumo de carnes en Uruguay Evolución de las Principales Indicadores del Consumo : Volúmenes Consumidos Consumo de Carnes en el Mercado Interno, 0–9. Disponible en: <http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/11573/1/cierre-2014-consumo.pdf>. Fecha de consulta: 20/11/2016
  22. Johara, M. Y., Field, H., Rashdi, A. M., Morrissy, C., Heide, B. Van Der, Rota, P., ... Ksiazek, T. (2001). Nipah Virus Infection in Bats ( Order Chiroptera ) in Peninsular Malaysia. *Emerging infectious diseases*. 7(4) 439–441.
  23. Kabrane-Lazizi, Y., Fine, J. B., Elm, J., Glass, G. E., Higa, H., Diwan, a, ... Purcell, R. H. (1999). Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(2): 331–335.
  24. Kasorndorkbua, C., Thacker, B. J., Halbur, P. G., Guenette, D. K., Buitenwerf, R. M., Royer, R. L., Meng, X. (2003). Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 67(4): 303–6.
  25. Kumar, S., Subhadra, S., Singh, B., Panda, B. K. (2013). Hepatitis E virus: The current scenario. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(4): 1–6.
  26. Lopes dos Santos DR, Lewis-Ximenez L, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. (2010). First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *Journal of Clinical Virology* 47:276–279.

27. Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H. (2006). Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in Medical Virology*, 16: 5–36.
28. Mainardi, V., Ardao, G., Mirazo, S., D'Albora, C., Valverde, M., Gaibizzo, R., Gerona, S. (2014). First case of Hepatitis E Virus- induced acute liver failure in Uruguay. *Archivos de Medicina Interna*, 36(3): 111–114.
29. Maneerat, Y., Clayson, E. T., Myint, K. S., Young, G. D., Innis, B. L. (1996). Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J Med Virol*, 48(2): 121–128.
30. Matsubayashi, K., Kang, J.H., Sakata, H., Takahashi, K., Shindo, M., Kato, M., Sato, S., Kato, T., Nishimori, H., Tsuji, K., Maguchi, H., Yoshida, J., Maekubo, H., Mishiro, S., Ikeda, H. (2008). A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*; 48: 1368–1375.
31. Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B.J., Emerson, S. U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 94(18): 9860–9865.
32. Meng, X. J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Engle, R. E., Emerson, S. U., Purcell, R.H., Toth, T. E. (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(1): 117–122. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.1.117>
33. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C., Gagliano, G., Arbiza, J. (2011). Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human hepatitis E virus infection in Uruguay. *Archives of Virology*, 156(8): 1451–1454. <http://doi.org/10.1007/s00705-011-0991-2>
34. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C., Arbiza, J. (2013). Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Research*, 173(2): 364–370. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.005>
35. Mirazo, S., Mainardi, V., Ramos, N., Gerona, S., Rocca, A., Arbiza, J. (2014).

Indigenous Hepatitis E Virus Genotype 1. *Emerging Infectious Diseases*, 20(1): 171–173. <http://doi.org/10.3201>

36. Mirazo, S., Mir, D., Bello, G., Ramos, N., Musto, H., Arbiza, J. (2016). New insights into the hepatitis E virus genotype 3 phylodynamics and evolutionary history. *Infection, Genetics and Evolution*, 43: 267–273. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.003>
37. Munné, M. S., Vladimirsky, S., Otegui, L., Brajterman, L., Castro, R., Soto, S., Guarnera E, Molina V, Monfellano M, Schlauder GG, González, J. E. (2006a). Molecular characterization of hepatitis E virus in three acute liver failure cases in children in Argentina. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 36(3), 125–130.
38. Munné MS, Vladimirsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, Guarnera E, Molina V, Monfellano M, Schlauder G, González JE. (2006b). Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *Journal of Medical Virology* 78:1579–1583.
39. Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, Tanaka, T., Yamada, K., Nishizawa, T., Okamoto, H. (2011). A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells. *Journal of General Virology*, 92(2): 269–278. <http://doi.org/10.1099/vir.0.025791-0>
40. Norder, H., Sundqvist, L., Magnusson, L., Østergaard Breum, S., Löfdahl, M., Larsen, L. E., Hjulsgaard, C.K., Magnius, L., Böttiger, B. E., Widén, F. (2009). Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Euro Surveillace : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 14(19): 1–9.
41. OMS, 2009. Hepatitis virales. Informe de la Secretaría. EB126/15, 12 de noviembre de 2009. Disponible en: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB126/B126\\_15-sp.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB126/B126_15-sp.pdf). Fecha de consulta: 13/9/2016
42. OPS, 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales: Clamidiosis, Rickettsiosis y Virosis. 3ª edición. Publicación Científica y Técnica No. 580. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/710/9275319928.pdf?sequence=2>

43. Pavio, N., Meng, X. J., Renou, C. (2010). Zoonotic hepatitis E: Animal reservoirs and emerging risks. *Veterinary Research*, 41(6). <http://doi.org/10.1051/vetres/2010018>
44. Pavio, N., Merbah, T., Study, T., France, I. (2014). Frequent Hepatitis E Virus Contamination in Food Containing Raw Pork Liver, France. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11): 10–12.
45. Pujol FH, Favorov MO, Marcano T, Esté JA, Magris M, Liprandi F, Khudyakov YE, Khudyakova NS, Fields HA. (1994). Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. *J Med Virol* 42:234–236.
46. Purcell, R. H. (1994). Hepatitis viruses: Changing patterns of human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 2401–2406.
47. Purdy, M. A., Khudyakov, Y. E. (2011). The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Research*, 161(1): 31–39. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.030>
48. Renou, C., Cadranel, J.-F., Bourlière, M., Halfon, P., Ouzan, D., Rifflet, H., Carencó, P., Harafa, A., Bertrand, J., Boutrouille, A., Muller, P., Igual, JP., Decopett, A., Eloít, M., Pavio, N. (2007). Possible Zoonotic Transmission of Hepatitis E from Pet Pig to Its Owner. *Emerging Infectious Diseases*, 13(7): 1094–1096.
49. Reyes, G. R., Purdy, M. A., Kim, J. P., Liu, K.-C., Young, L. M., Fry, K. E. Bradley, D. W. (1990) Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247: 1335-1339.
50. Rodríguez-Frias, F., Jardí, R., Buti, M. (2012). Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(10): 624–634. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.014>
51. Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H. L., Walsh, A., Ramsay, M., Morrigan, D. (2009). Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerging Infectious Diseases*, 15(11): 1738–1744. <http://doi.org/10.3201/eid1511.091094>
52. Sianto, L., Chame, M., Silva, C. S. P., Gonçalves, M. L. C., Reinhard, K., Fugassa, M., Araújo, A. (2009). Animal helminths in human archaeological remains: A review of zoonoses in the past. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(3): 119–130. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652009000300001>

53. Smith, G. J. D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., ... Rambaut, A. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 459(7250): 1122–1125.
54. Sreenivasan, M. A., Arankalle, V. A., Sehgal, A., Pavri, K. M. (1984). Non-A, non-B epidemic hepatitis: Visualization of virus-like particles in the stool by immune electron microscopy. *Journal of General Virology*, 65(5): 1005–1007. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-65-5-1005>
55. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. (1991) Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*; 185: 120-131
56. Taylor, L. H., Latham, S. M., Woolhouse, M. E. J. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 356(1411): 983–989. <http://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>
57. Vishwanathan, R. (1957) Infectious hepatitis in Delhi (1955-56), a critical study. *Epidemiology. Indian J Med Res.*;45:49–58.
58. Wang, Y., Ling, R., Erker, J. C., Zhang, H., Li, H., Desai, S., ... Harrison, T. J. (1999). A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *The Journal of General Virology*, 80 ( Pt 1): 169–177.
59. Wang, L. Cramer, G. (2014). Emerging zoonotic viral diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 33(2), 569–581.
60. WHO. (1959). Joint WHO/FAO expert committee on Zoonoses. *Technical Report Series*. 1959;58(169):1-84.
61. Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., Okamoto, H. (2003). Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *Journal of General Virology*, 84(9): 2351–2357. <http://doi.org/10.1099/vir.0.19242-0>