



**Trabajo Final de Grado**

**Lic. en Ciencias Biológicas**

**Orientación Biología Molecular**

# **Relevamiento e identificación de reservorios animales alternativos del Virus de la Hepatitis E**

*Irene Ferreiro Fernández*

Orientador: Dr. Santiago Mirazo

Co-orientadora: MSc. Florencia Cancela

Sección Virología, Facultad de Ciencias, UdelaR.

2020

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN .....</b>                          | <b>3</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                     | <b>4</b>  |
| TAXONOMÍA, ESTRUCTURA VIRAL Y GENOMA .....    | 4         |
| SEROPREVALENCIA.....                          | 5         |
| DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS Y RESERVORIOS ..... | 6         |
| VÍAS DE TRANSMISIÓN.....                      | 7         |
| PRESENTACIÓN CLÍNICA .....                    | 9         |
| EPIDEMIOLOGÍA EN SUDAMÉRICA .....             | 10        |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                         | <b>11</b> |
| OBJETIVO GENERAL .....                        | 11        |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                   | 12        |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>             | <b>13</b> |
| MUESTREO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS .....   | 13        |
| ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA.....              | 13        |
| EXTRACCIÓN DE ARN.....                        | 14        |
| DETECCIÓN DEL GENOMA.....                     | 15        |
| SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS .....  | 17        |
| AISLAMIENTO DE HEV EN CULTIVO CELULAR .....   | 17        |
| <b>RESULTADOS .....</b>                       | <b>19</b> |
| ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA.....              | 19        |
| DETECCIÓN DEL GENOMA.....                     | 20        |
| SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS .....  | 23        |
| AISLAMIENTO DE HEV EN CULTIVO CELULAR .....   | 26        |
| <b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>          | <b>29</b> |
| <b>PERSPECTIVAS .....</b>                     | <b>34</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>                      | <b>35</b> |
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>                  | <b>41</b> |

## Resumen

La hepatitis E es una zoonosis emergente causada por el virus de la Hepatitis E (HEV), miembro de la familia *Hepeviridae*, y que comprende 8 genotipos (HEV1-8). Las cepas de HEV capaces de infectar humanos pertenecen principalmente a los genotipos HEV1-4. Los casos humanos en Uruguay se asocian principalmente al HEV3, zoonótico, que a su vez está ampliamente distribuido en cerdos domésticos y jabalíes. El estatus de otros reservorios respecto a la infección por HEV permanece desconocido en nuestro país, si bien la identificación de especies susceptibles aumenta constantemente en el mundo.

Este trabajo pretendió evaluar poblaciones de ratas (*Rattus rattus*) del puerto de Montevideo y pecaríes (*Pecari tajacu*), ciervos dama (*Dama dama*) y ciervos axis (*Axis axis*) en comunidades de recría como el Parque Lecocq, la reserva de M'Bopicuá y la reserva de Fauna Autóctona de Pan de Azúcar, como potenciales reservorios de HEV en Uruguay.

La frecuencia de anticuerpos anti HEV en pecaríes, ciervos axis y ratas fue evaluada en 119, 13 y 44 individuos respectivamente, a través de un ensayo de ELISA. Para evaluar la presencia de ARN viral se extrajo ARN de muestras de materia fecal de pecaríes, ciervos dama y ciervos axis, (25, 6 y 9 muestras respectivamente) y se implementó una RT-nPCR con posterior secuenciación de las regiones de metiltransferasa y cápside viral. Las muestras ARN positivas para HEV fueron inoculadas en células A549 (carcinoma pulmonar humano) para evaluar su capacidad de infección.

Los pecaríes de las distintas reservas estudiadas presentaron una seroprevalencia de entre 5% y 56% de anticuerpos específicos anti HEV mientras las ratas presentaron un 2%. Se detectó la presencia de ARN viral perteneciente a HEV3 en dos pools de heces de pecaríes del Parque Lecocq y se identificaron dos cepas con un alto porcentaje de identidad nucleotídica con las humanas y suinas previamente descritas en Uruguay. Además, una de

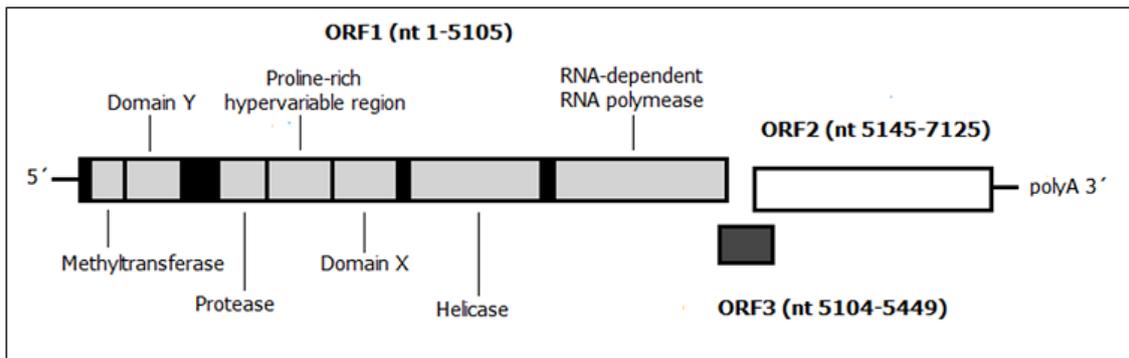
estas dos cepas logró ser aislada en cultivo celular. Las muestras de ciervos estudiadas no mostraron evidencias de infección por HEV.

Este estudio es el primer reporte a nivel mundial que demuestra que los pecaríes son reservorios activos de HEV. La similitud de las cepas encontradas, con las humanas y suinas reportadas en Uruguay sugiere que estos animales contribuyen potencialmente a la transmisión zoonótica del virus. La información derivada de esta investigación es de interés para el diseño de políticas referidas a planes de traslocación y repoblamiento.

## Introducción

### Taxonomía, estructura viral y genoma

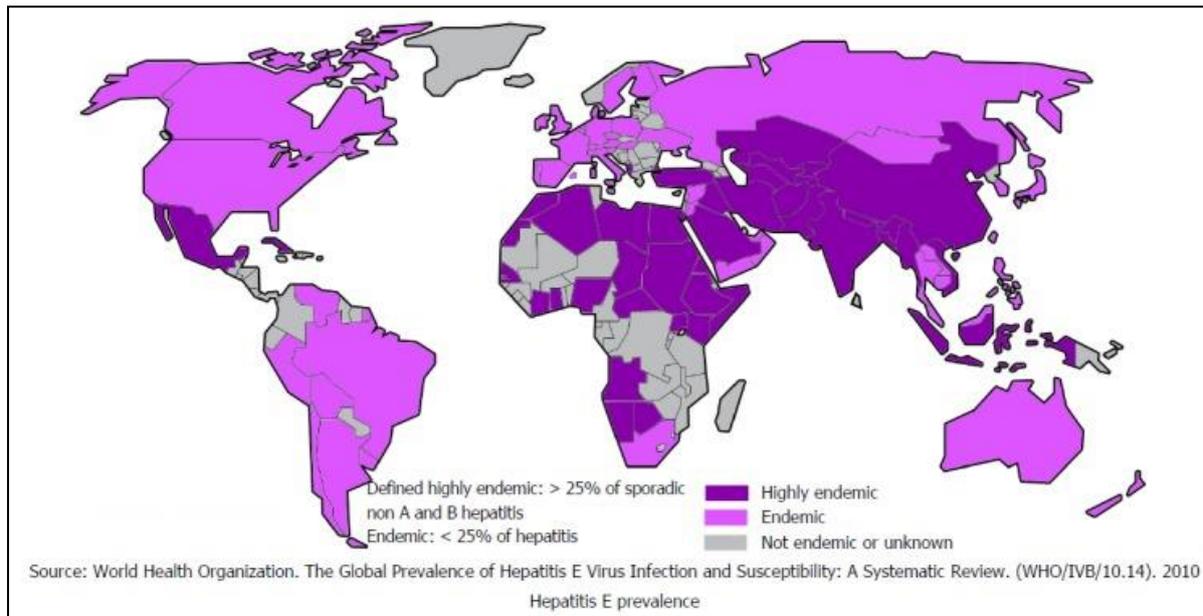
El virus de la hepatitis E (HEV), perteneciente a la familia *Hepeviridae*, del género *Orthohepevirus A*<sup>1</sup>, es el agente etiológico de la hepatitis E, una enfermedad endémica de países en desarrollo de África y Asia<sup>2</sup>. Este virus desnudo posee una cápside con estructura icosaédrica de entre 27 y 32 nm<sup>3</sup>. Es muy estable y resiste a condiciones físico-químicas adversas, pudiendo soportar altas temperaturas<sup>4</sup>. HEV contiene un genoma de ARN simple hebra de polaridad positiva, con un tamaño de 7,2 Kilobases y posee tres marcos abiertos de lectura (ORF1, ORF2 y ORF3) discontinuos y solapados parcialmente<sup>5</sup>. El ORF1 codifica para proteínas no estructurales como la metiltransferasa (altamente conservada para las diferentes cepas de HEV)<sup>6</sup>. Por otro lado, el ORF2 codifica para la proteína de la cápside viral, mientras que el ORF3, que se solapa con ORF1 y ORF2, codifica para una pequeña fosfoproteína multifuncional inmunogénica requerida para el egreso de la partícula viral<sup>7-9</sup>.



**Figura 1.** Organización del genoma de HEV con sus tres ORF parcialmente solapados. ORF1 codifica una poliproteína no estructural en la que se encuentra la metiltransferasa, ORF 2 codifica la proteína de cápside viral y ORF3 codifica una fosfoproteína requerida para el egreso de la partícula viral. Extraído de<sup>10</sup>.

## Seroprevalencia

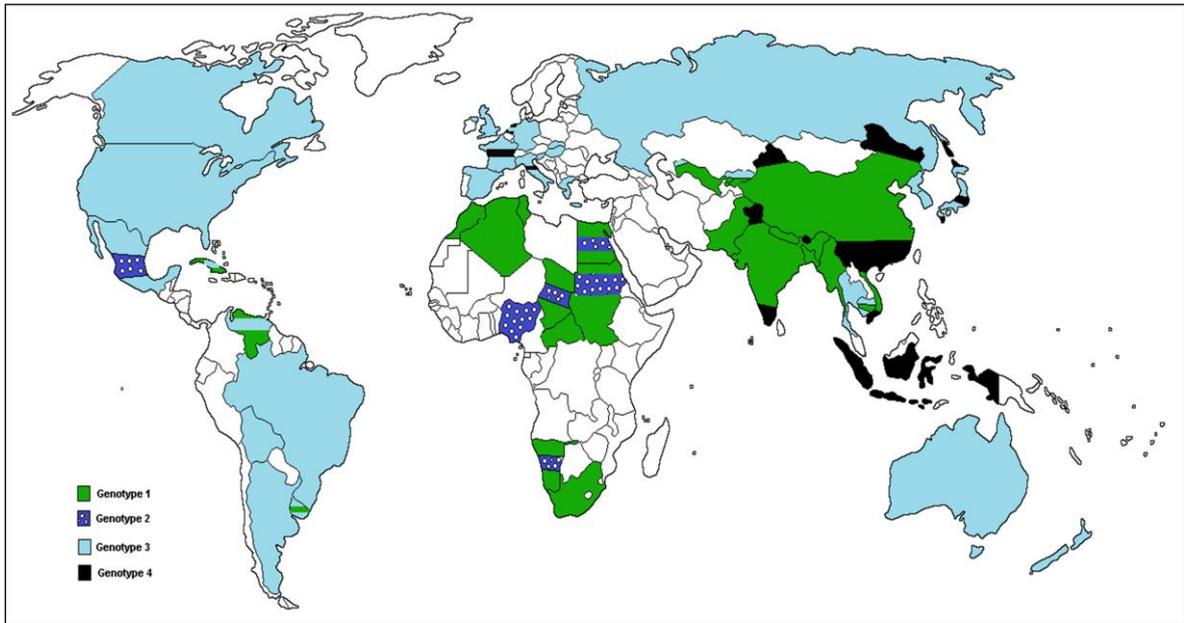
Se consideran endémicos los países en los cuales la seroprevalencia de anticuerpos anti HEV es cercana a 25% entre los casos de hepatitis agudas no-A no-B, mientras que en los países hiperendémicos la seroprevalencia es mayor a 25%<sup>11</sup>. Entre estas regiones se encuentran países pertenecientes a África y Asia. Un ejemplo de país hiperendémico es India, en el cual la seroprevalencia en donantes de sangre es de 60%<sup>12</sup>. Por otro lado, los países industrializados presentan seroprevalencias de entre 1 y 4%<sup>13</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Áreas de endémicas e hiperendémicas de HEV en el mundo. Se considera que las áreas hiperendémicas presentan una seroprevalencia de anticuerpos anti HEV mayor a 25% mientras que las endémicas poseen una seroprevalencia cercana y/o menor a 25%. Extraído de<sup>14</sup>.

## Distribución de genotipos y reservorios

Se han identificado 8 genotipos para este virus<sup>15</sup>. Las secuencias de HEV capaces de infectar humanos se clasifican dentro de cuatro genotipos principales (HEV1, HEV2, HEV3 y HEV4). El HEV1 infecta principalmente seres humanos, pero también se ha detectado ocasionalmente en cerdos<sup>5,16,17</sup>. Cepas de este genotipo son las responsables de la mayoría de los casos y brotes epidémicos en las regiones endémicas, así como de algunos casos aislados en América Latina, incluyendo a Uruguay<sup>2,18,19</sup>. El HEV2 se ha detectado solamente en humanos y es prevalente en México y África<sup>2</sup>. Por otro lado, el HEV3 es el genotipo con mayor prevalencia y está distribuido de forma amplia en el mundo, incluyendo Sudamérica<sup>5</sup>. El HEV4, se halla geográficamente restringido a Europa y Asia (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución geográfica de genotipos de HEV. HEV1 fue reportado en África, Asia y algunos países de América Latina; HEV2 se ha detectado en México y África; HEV3 se distribuye globalmente; HEV4 se reportó en el este de Asia y Europa Central. Extraído de<sup>10</sup>.

En los últimos años el número de potenciales reservorios mamíferos reportados ha aumentado drásticamente. Los principales reservorios animales son los cerdos y jabalíes<sup>20</sup> pero también se han identificado cepas de HEV provenientes de animales como venado, rata, pollo, hurón, conejo y camello<sup>4,20,21</sup>, lo que vuelve aún más compleja la epidemiología de HEV. Los genotipos HEV3 y HEV4 presentan una muy alta variabilidad intra-genotípica<sup>22</sup> y constituyen cepas zoonóticas.

## Vías de transmisión

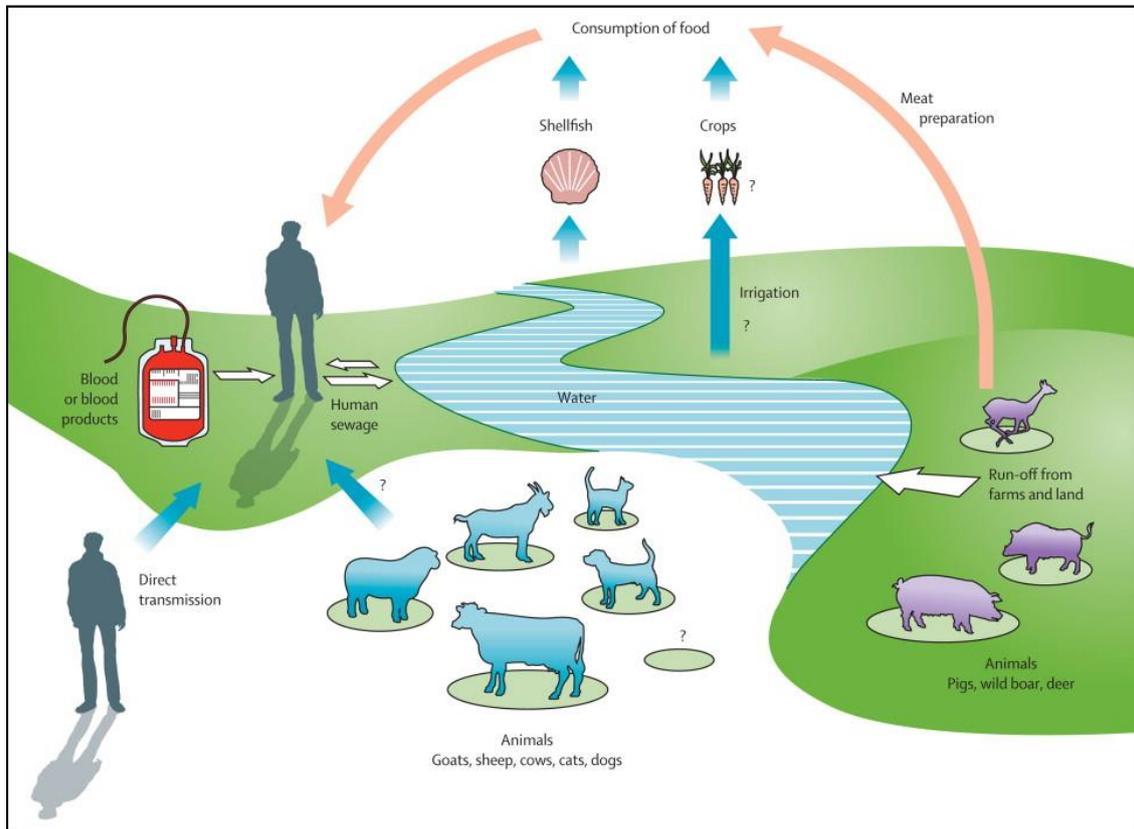
La infección por HEV3 es considerada una zoonosis, dado que ha sido reportada la transmisión a humanos desde reservorios animales, principalmente cerdos domésticos y jabalíes<sup>20</sup>. La vía zoonótica parece ser el principal modo de infección en humanos en regiones no endémicas. La mayoría de los casos causados por esta vía de infección se han relacionado

con la ingesta de alimentos crudos o poco cocidos provenientes de los reservorios animales<sup>21,23,24</sup> pero también se ha descrito transmisión de HEV a través de contacto directo con los animales reservorio infectados<sup>25,26</sup>, por lo que las personas en contacto con estos animales se encuentran más expuestas a la infección por esta vía. Además, en regiones con granjas porcinas, el estiércol o las aguas residuales podrían contaminar zonas costeras o el agua de riego, pudiendo contaminar alimentos. Ejemplos de esto son la detección de HEV3 porcino en mejillones y frutillas<sup>27</sup>.

HEV1 y HEV2 se transmiten mayoritariamente por vía fecal-oral debido al consumo de agua contaminada, manifestándose en forma de brotes epidémicos de diferentes grados de magnitud en regiones endémicas. Se han registrado brotes en países en guerra o con crisis humanitarias como Uganda, Nigeria, Sudán del Sur y Etiopía debido a las condiciones sanitarias pobres y la falta de agua potable<sup>27</sup>. Por otro lado, en zonas geográficas no endémicas, los casos de hepatitis aguda asociados a HEV se manifiestan esporádicamente y son de carácter autóctono<sup>18</sup>. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra en riesgo de contagio<sup>28</sup>.

Asimismo, otro modo de transmisión es la transmisión parenteral. Se han reportado casos de HEV transmitido por transfusión en países no endémicos como Japón, Australia, Alemania y Canadá<sup>27</sup>, por lo que esta vía de transmisión es un riesgo en países industrializados o en vías de desarrollo. También se han reportado casos de HEV1 transmitidos verticalmente de madre a hijo<sup>29</sup>, siendo la carga viral en la madre un predictor significativo<sup>30</sup>.

Se ha reportado la transmisión de HEV vía persona-persona. Esta vía no tiene un papel predominante en el surgimiento de brotes epidémicos, pero se considera que la falta de higiene puede favorecer la transmisión del virus<sup>31</sup>. Las vías de transmisión de HEV se muestran esquematizadas en la Figura 4.



**Figura 4.** Fuentes y vías de transmisión de HEV1-4. HEV1 y HEV2 son transmitidos solamente por el consumo de agua contaminada, el contacto humano-humano y la transmisión vertical. Extraído de<sup>32</sup>.

## Presentación clínica

La infección por HEV afecta principalmente el hígado<sup>28</sup> y suele presentarse como asintomática<sup>33</sup>, o generar síntomas leves como dolores articulares y musculares, hepatomegalia, orina oscura y heces de color claro<sup>17</sup>. HEV en pacientes inmunocompetentes es causa de hepatitis aguda con baja tasa de mortalidad (entre 0,5% y 4%)<sup>10,34,35</sup>. Por otro lado, este virus puede generar hepatitis crónica en individuos con inmunodeficiencia (trasplantados en tratamiento inmunosupresor, portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y pacientes hematooncológicos)<sup>36-41</sup>. En poblaciones de riesgo como embarazadas e individuos con enfermedad hepática crónica infectados con HEV1-HEV2 se puede generar falla hepática aguda con una tasa de mortalidad que alcanza hasta un 30%<sup>28,34,37,39,42</sup>.

## Epidemiología en Sudamérica

Sudamérica no tiene zonas endémicas para HEV y presenta seroprevalencias bajas en general<sup>21</sup>, sin embargo, han ocurrido algunos brotes epidémicos<sup>18</sup>. Las primeras cepas humanas del virus fueron detectadas en Argentina a final de los 90`S y más tarde se reportaron casos en Brasil, Uruguay, Venezuela y Bolivia<sup>43</sup>. Luego, se caracterizaron las primeras cepas porcinas en Argentina, las cuales resultaron tener un alto grado de similitud con respecto a las humanas previamente identificadas<sup>44</sup>.

La Hepatitis E es entonces una infección emergente en Latinoamérica, incluyendo Uruguay. En nuestro país, los primeros casos esporádicos de HEV se reportaron en el 2011 en Montevideo<sup>45</sup>, y fueron posteriormente caracterizados como pertenecientes al HEV3 (considerado zoonótico). Estas cepas resultaron estar filogenéticamente relacionadas con aislados porcinos detectados en Francia y Alemania<sup>46</sup>. Posteriormente, en 2014 se identificaron cepas de HEV1 epidémicas asociadas a fuentes de agua contaminadas<sup>19</sup>. A partir de entonces, el número de casos de hepatitis aguda asociados a HEV sin una fuente de contaminación determinada aumenta de forma constante conforme se avanza en la comprensión de la epidemiología del virus. Recientemente, la Sección Virología de la Facultad de Ciencias ha estudiado la situación sanitaria de cerdos domésticos y jabalíes respecto a la infección por HEV y los resultados preliminares sugieren que el virus circula en ambos reservorios con una alta seroprevalencia. Más aún, las cepas aisladas presentaron una alta identidad de secuencia con cepas detectadas en humanos<sup>47</sup>, volviéndolas evidentes fuentes de contagio. Sin embargo, en nuestro país al igual que en toda Latinoamérica, la situación epidemiológica y serológica de reservorios alternativos (que excluye cerdos y jabalíes) permanece inexplorada y no hay estudios publicados al respecto.

Por tanto, el creciente número de casos de HEV en Uruguay en humanos y su impacto en salud pública, sumado a la identificación de nuevos potenciales reservorios animales a nivel mundial, pone de manifiesto la necesidad de relevar la circulación del virus en poblaciones animales que eventualmente

pueden oficiar de reservorios naturales para la transmisión de HEV en nuestro país.

Este trabajo pretendió realizar un relevamiento serológico y molecular en posibles reservorios alternativos de HEV y analizar su capacidad infectiva y posible impacto zoonótico en salud humana. Para esto se evaluó la circulación de HEV entre las poblaciones ratas (*Rattus rattus*) y de cría de ciervos (*Axis axis* y *Dama dama*) y pecaríes (*Pecari Tajacu*) de Uruguay. Esto es dado que, como fue mencionado anteriormente, hay casos reportados de HEV en ratas y ciervos en otros países y los pecaríes están relacionados filogenéticamente con cerdos y jabalíes (reservorios reportados en Uruguay)<sup>48</sup>. También se procuró comparar tasas de seroprevalencia de estos posibles reservorios con las de cerdos domésticos y jabalíes. Asimismo, este trabajo tomó en cuenta las cepas virales detectadas en estos reservorios alternativos como una posible fuente de variabilidad adicional de cepas virales zoonóticas.

En el presente trabajo se hipotetiza que HEV circula entre las poblaciones de cría de ciervos (*axis* y *dama*), pecaríes y ratas de Uruguay, aunque las tasas de seroprevalencia no serían tan elevadas como en cerdos domésticos y jabalíes<sup>47</sup>. Además, se hipotetiza que las cepas de HEV circulantes en estos reservorios alternativos podrían ser cepas zoonóticas.

## Objetivos

### Objetivo General

Diseñar e implementar un relevamiento molecular y serológico del virus de la Hepatitis E en poblaciones de animales reservorios alternativos de esta virosis emergente en Uruguay y analizar la capacidad infectiva de las muestras obtenidas. Se pretende analizar la presencia de HEV en pecaríes, ciervos *axis* y ciervos *dama* en comunidades de cría del Parque Lecocq, la reserva de Fauna Autóctona de Pan de Azúcar y la reserva de M' Bopicuá (Río Negro) que serán liberados al medio natural como parte de un plan de traslocación y repoblamiento. La información del estado sanitario obtenida a partir de esta

investigación será de suma importancia para tomar las decisiones correctas referidas a este plan. Además, se analizarán muestras de ratas colectadas en el puerto de Montevideo.

A su vez, este trabajo busca estimar el eventual impacto zoonótico de transmisión de HEV que pueden tener estos animales y describir la variabilidad genética de las cepas detectadas para poder evaluar su impacto en el acervo genético viral en las poblaciones de cerdo y jabalí (principales animales reservorios).

## Objetivos específicos

1. Obtención de muestras de animales potenciales reservorios de HEV, para implementar un relevamiento serológico y molecular.
2. Diseñar, optimizar e implementar técnicas moleculares y utilizar técnicas serológicas apropiadas para la identificación de HEV.
3. Estimar la seroprevalencia y frecuencia de infección de HEV en los animales estudiados.
4. Caracterizar molecularmente las cepas identificadas y evaluar el potencial zoonótico a través de detallados estudios filogenéticos.
5. Aislar HEV *in vitro* en la línea celular continua A549.

# Materiales y Métodos

## Muestreo y almacenamiento de muestras

Se recolectaron 25 muestras de materia fecal de pecaríes, de las cuales 4 se colectaron en la reserva del Cerro Pan de Azúcar (Intendencia Municipal de Maldonado) y 21 fueron colectadas a partir de dos poblaciones diferentes pertenecientes al parque Lecocq (Intendencia Municipal de Montevideo). Además, en el parque Lecocq se recolectaron 9 muestras de materia fecal de ciervos axis y 6 muestras de ciervo dama. Para cada población animal se colectaron en bolsa estéril entre 10 y 30 gramos de materia fecal fresca, que fueron almacenadas y transportadas en frío al laboratorio hasta su procesamiento. Se seleccionó materia fecal dado que es la muestra biológica no invasiva de elección para detectar HEV.

Paralelamente, se incluyeron 18 sueros de banco de archivo obtenidos a partir de poblaciones de pecaríes durante los años 2014 y 2015 de la reserva de M'Bopicuá (Río Negro), cedidos por el Dr. Gustavo Castro de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. Además, se dispuso de 81 sueros de poblaciones de pecarí del Parque Lecocq brindadas por la Dra. Carmen Leizagoyen (Intendencia Municipal de Montevideo), 20 sueros de pecaríes de la Reserva de Fauna Autóctona de Pan de Azúcar brindadas por los Doctores Matías Loureiro y Hugo Arellano y 44 sueros de rata provenientes del puerto de Montevideo cedidas por el DMV. Lorenzo Verger. A su vez se utilizaron 13 sueros de ciervo axis procedentes del departamento de Artigas cedidas por la Asociación de Controladores de Jabalí de Artigas.

## Estudios de seroprevalencia

Las muestras de suero se utilizaron para llevar a cabo la detección de anticuerpos (IgM, IgG e IgA) anti HEV con un ensayo de ELISA. Este se realizó con el kit ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDVet, Francia), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

## Extracción de ARN

Todas las muestras de materia fecal fueron resuspendidas en 10% PBS. El ARN total de las muestras provenientes del parque Lecocq se extrajo mediante el reactivo TRIZol (LifeTechnologies, USA) según las especificaciones del fabricante. Cabe destacar que, dada la alta cantidad de muestras de materia fecal del parque Lecocq, estas fueron combinadas para formar pools (Tabla 1).

**Tabla 1.** Agrupaciones de muestras de materia fecal en pools para cada población animal del Parque Lecocq. La nomenclatura utilizada en el correr de este trabajo para los distintos pools de cada población indica primero el número de pool y luego la población. A modo de ejemplo, 1P2 corresponde al pool 1 de la población 2 de pecarí.

|                                | <b>Pool 1</b> | <b>Pool 2</b> | <b>Pool 3</b> |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Ciervo axis (CA)</b>        | Muestra 1     | Muestra 4     | Muestra 7     |
|                                | Muestra 2     | Muestra 5     | Muestra 8     |
|                                | Muestra 3     | Muestra 6     | Muestra 9     |
| <b>Ciervo dama (D)</b>         | Muestra 1     | Muestra 4     | -             |
|                                | Muestra 2     | Muestra 5     | -             |
|                                | Muestra 3     | Muestra 6     | -             |
| <b>Pecarí población 1 (P)</b>  | Muestra 1     | Muestra 5     | Muestra 9     |
|                                | Muestra 2     | Muestra 6     | Muestra 10    |
|                                | Muestra 3     | Muestra 7     | Muestra 11    |
|                                | Muestra 4     | Muestra 8     | -             |
| <b>Pecarí población 2 (P2)</b> | Muestra 1     | Muestra 4     | Muestra 7     |
|                                | Muestra 2     | Muestra 5     | Muestra 8     |
|                                | Muestra 3     | Muestra 6     | Muestra 9     |
|                                | -             | -             | Muestra 10    |

Por otro lado, los ARNs de las muestras de materia fecal provenientes de Pan de Azúcar fueron extraídos con el kit QIAmp Viral minikit (QIAGEN, USA) según las especificaciones del fabricante.

## DetECCIÓN DEL GENOMA

A partir del ARN extraído de las muestras de materia fecal, se amplificó la región de la metiltransferasa (MT) perteneciente al ORF1 mediante retrotranscripción con la enzima Revert Aid (ThermoFisher Scientific, USA) seguida de nested PCR (RT-nPCR) con la enzima Taq Polymerase (ThermoFisher Scientific, USA) con los primers y los métodos descritos por Wang et al.<sup>49</sup>. La retrotranscripción se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ L con 5  $\mu$ L de ARN, 1  $\mu$ M de primer reverse HEA1, 1X RT Buffer, 1 mM de dNTPs y 10 U/  $\mu$ L de retrotranscriptasa en cada tubo. El ciclado utilizado para esta RT consistió en una primera etapa de 5 minutos a 70°C para desnaturalizar estructuras secundarias del ARN y una segunda etapa de 1 hora a 42°C para síntesis de ADNc y 15 minutos a 70°C para inactivar la enzima. Por otro lado, para la nPCR se realizaron dos PCR con los mismos reactivos y ciclados entre ellas, pero diferentes pares de primers (HEA1 y HES1 en la primera y HEA2 y HES2 en la segunda) en un volumen final de 50  $\mu$ L. Para esto se colocaron 5  $\mu$ L de ADNc en un mix con 1X Taq Buffer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1  $\mu$ M de primer forward, 1  $\mu$ M de primer reverse y 0,03 U/  $\mu$ L de Taq Polimerasa. El ciclado para estas PCR consistió de un primer paso de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 50°C y 45 segundos a 72°C y una última extensión de 10 minutos a 72°C.

Con las mismas enzimas y el ARN de las muestras que resultaron positivas en la RT-nPCR específica para MT, se realizó una RT con random primers (Invitrogen, USA) y una nPCR específica para la región de la cápside (CAP) perteneciente al ORF2 viral con los primers y métodos descritos por Meng et al.<sup>50</sup>. La RT se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ L. Para esto se colocaron 5  $\mu$ L de ARN, 0,015  $\mu$ g/ $\mu$ L de random primers, 1X RT Buffer, 1 mM de dNTPs y 10 U/  $\mu$ L de retrotranscriptasa en cada tubo. Estos se incubaron durante 5 minutos a 70°C y luego se realizó un ciclado de 10 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C y 15 minutos a 70°C. Por otro lado, la nPCR específica para CAP se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ L con 5  $\mu$ L de ADNc, 1X Taq Buffer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1  $\mu$ M de primer forward (3156 en la primer PCR y

3158 en la segunda), 1  $\mu$ M de primer reverse (3157 en la primer PCR y 3159 en la segunda) y 0,04 U/  $\mu$ L de Taq polimerasa. El ciclado de esta nPCR tuvo una primera etapa de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, una segunda etapa de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 44°C y 1 minuto a 72°C y una tercera etapa de 10 minutos a 72°C.

En el caso de no haber existido amplificación para CAP se realizó una RT-nPCR específica con las enzimas SuperScript II (Invitrogen Life Technologies, USA) y Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, USA). La RT se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ L con 5  $\mu$ L de ARN, 0,5  $\mu$ M del primer reverse 3157, 1X First Strand Buffer, 1 mM de dNTPs, 5 mM de dTT y 10 U/  $\mu$ L de retrotranscriptasa SuperScript II. Luego se realizó un ciclado con una primera etapa de 5 minutos a 70°C y una segunda etapa de 1 hora a 42°C y 15 minutos a 70°C. A continuación, se realizó la nPCR específica para CAP realizada con Taq Platinum (Invitrogen Life Technologies, USA) con un volumen final de 25  $\mu$ L. Para esto se agregaron 2,5  $\mu$ L de ADNc en un mix con 1X PCR Rxn Buffer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1  $\mu$ M de primer forward (3156 en la primer PCR y 3158 en la segunda), 1  $\mu$ M de primer reverse (3157 en la primer PCR y 3159 en la segunda) y 0,015 U/  $\mu$ L de Taq Platinum. El ciclado de esta nPCR tuvo una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 44°C y 1 minuto a 72°C y una tercera etapa de 10 minutos a 72°C.

Como control negativo (C-) de las RT-nPCR se utilizó agua estéril libre de nucleasas (UltraPure™ DNase/Rnase-Free Distilled Water-DEPC, Invitrogen®) en lugar de ARN para poder descartar contaminaciones. Por otro lado, como control positivo (C+) de la RT-nPCR realizada para MT con los pools del parque Lecocq se utilizó el ARN extraído previamente de una muestra de materia fecal HEV positiva proveniente de un paciente humano. Para el resto de las RT-nPCR se utilizó como C+ el ARN de los pools positivos provenientes de los pools del parque Lecocq.

Con los productos resultantes de la RT-nPCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1,5% para evaluar la presencia de las bandas de amplificación esperadas (287pb para la región MT y 330pb para la región CAP). Para esto se disolvió 0,75 g de Agarosa en 50 mL de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X y posteriormente se añadieron 2,5 µL del agente intercalante SYBR Safe (Invitrogen Life Technologies, USA). Luego de gelificado, se cargaron 6 µL de las muestras y controles con 2 µL de buffer de carga 6X (Thermo Scientific, USA) agregado. Además, se incluyeron en la corrida electroforética los marcadores de peso molecular 100 pb Plus o 1 Kb (Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladders, USA). La corrida electroforética se realizó a 100V por 30 minutos.

## Secuenciación y análisis filogenéticos

Los productos de PCR específicos se purificaron a partir del gel de agarosa con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, USA) para luego ser secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. Las secuencias se editaron con BioEdit y se utilizó el programa informático MEGA v6.0 para alinearlas con secuencias correspondientes a todos los genotipos de HEV obtenidas a partir de la base de datos GenBank. Además, MEGA v6.0 se utilizó para realizar las reconstrucciones filogenéticas con el método de Neighbour-Joining y el modelo Kimura 2-parameter.

## Aislamiento de HEV en cultivo celular

Se realizó una suspensión al 10% en PBS de los pools de materia fecal HEV positivos seguida de una filtración con un filtro de 0.22 µm (Millex-GV; Millipore). Se realizaron diluciones 1/5, 1/10 y 1/20 del inóculo viral con medio DMEM-F12. Estas diluciones se utilizaron para inocular por duplicado monocapas de células A549 (carcinoma pulmonar humano, ATCC CCL-185) en placas de 24 wells crecidas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. El medio utilizado para su crecimiento fue medio DMEM-F12, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen, Life

Technologies) y con 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies), 2,5 µg/ml de anfotericina B (Gibco, Invitrogen, Life Technologies) y 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies).

Antes de inocular las monocapas de células, estas se lavaron con 1 mL de medio DMEM-F12 sin suplementar. Luego se inocularon 500 µL de las diluciones ya descritas y se incubaron durante 3 horas a 37°C. A las 3 horas se retiró el inóculo, se lavaron las células 2 veces con 500 µL de PBS, se agregó 1 mL de medio DMEM-F12 con 5% de SFB y se incubaron 3 días a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

Al tercer día se realizó el primer pasaje de células. Para esto cada pocillo fue lavado con 500 µL de PBS, se les agregó 200 µL de tripsina y se incubaron a 37°C para despegar las células de la placa y entre ellas. Una vez despegadas las células, se les agregó 200 µL de DMEM-F12 10% SFB para inactivar la tripsina y se resuspendieron. Posteriormente se tomaron 100 µL de estas células y se pasaron a nuevos pocillos generando una dilución 1:4. Luego se agregó a estos pocillos 900 µL de medio DMEM-F12 10% SFB.

Se realizaron 20 pasajes seriados con dilución 1:4 cada 3-4 días de las células inoculadas y el restante de cada pasaje fue centrifugado a 25°C por 5 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante fue descartado y las células contenidas en el pellet fueron utilizadas para la extracción de ARN total mediante el reactivo TRIzol (LifeTechnologies, USA) según las especificaciones del fabricante. Dado que HEV generalmente no presenta efecto citopático, El ARN obtenido en el pasaje 10 se utilizó para evaluar la presencia de HEV por RT-nPCR y el producto de PCR específico para la región MT fue purificado con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, USA) y enviado a secuenciar para verificar la identidad de la cepa.

En el caso de ser positiva la presencia de HEV en el pasaje 10, se realizó una RT-nPCR específica para la región MT a partir del ARN extraído de los pasajes 6 y 15.

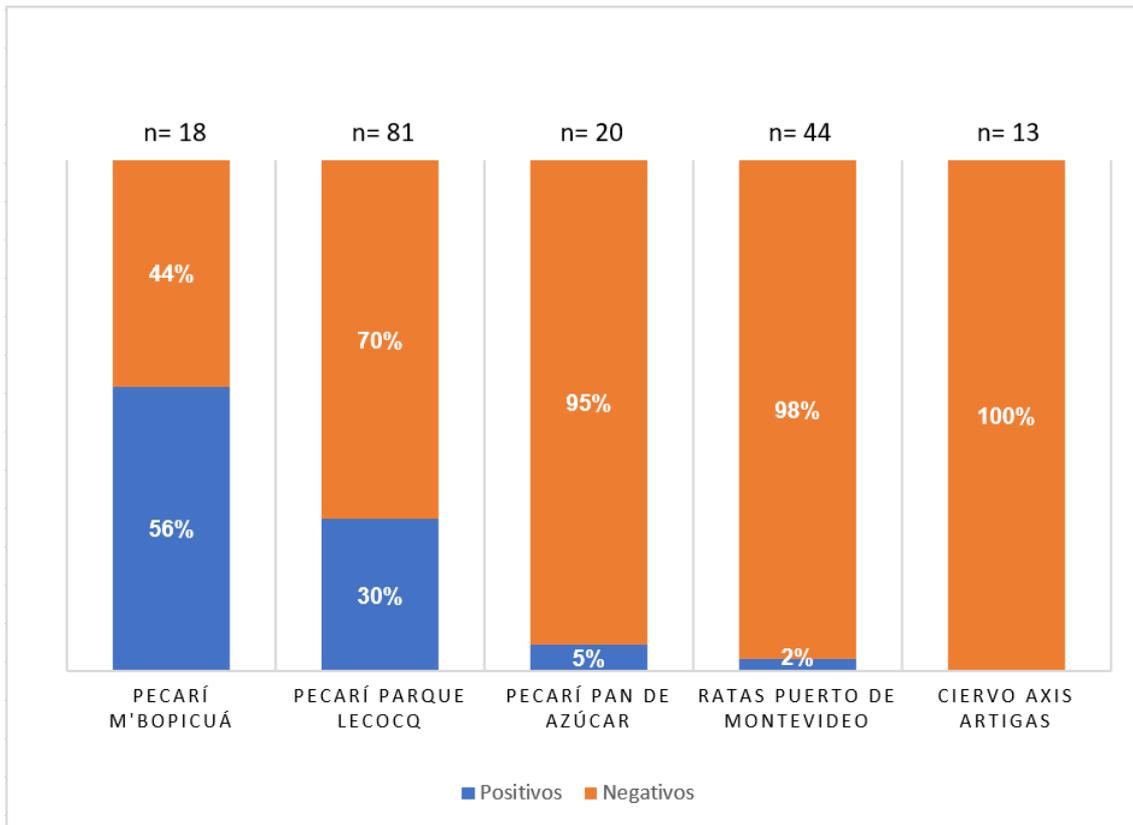
Como control negativo de infección se inoculó exclusivamente medio DMEM-F12 y como control positivo se inoculó el medio utilizado en células A549 infectadas por Cancela et al. con HEV proveniente de una muestra humana.

Estos procedimientos se realizaron mediante la adaptación de los métodos de Zhang et al.<sup>51</sup> y Mirazo et al.<sup>52</sup>.

## Resultados

### Estudios de seroprevalencia

Mediante el ensayo de ELISA se detectó la presencia de anticuerpos específicos anti HEV en pecaríes y ratas. Se pudo estimar una tasa de seroprevalencia de 56%, 30% y 5% en pecaríes de M´Bopicuá, Parque Lecocq y Pan de Azúcar respectivamente y una seroprevalencia de 2% en ratas del puerto de Montevideo. Por otro lado, no se encontraron anticuerpos específicos anti HEV en los sueros de ciervo axis provenientes del departamento de Artigas (Figura 5).



**Figura 5.** Relevamiento serológico de poblaciones de ratas del puerto de Montevideo, ciervos axis de Artigas y pecaríes de las reservas M'Bopicuá, Parque Lecocq y Pan de Azúcar. Se muestran las proporciones de resultados positivos y negativos del kit ELISA (ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDVet, Francia) de los sueros y el número de muestras analizadas (n) para cada grupo.

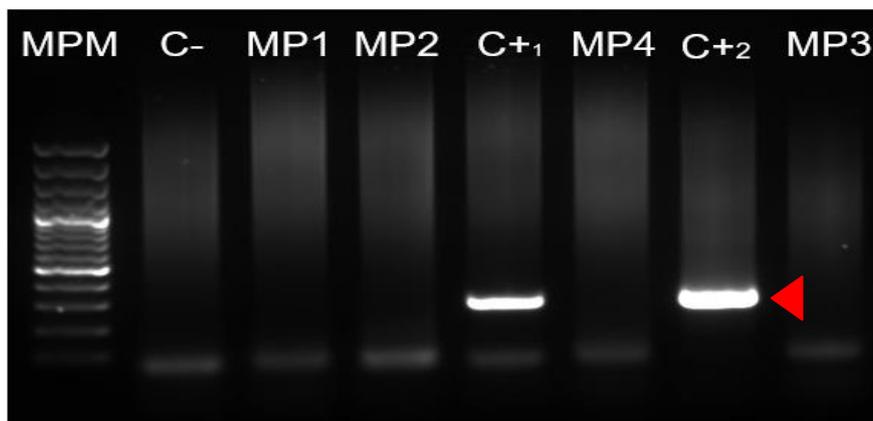
## Detección del genoma

En el gel de agarosa correspondiente a la RT-nPCR específica para MT realizada a partir de los pools de materia fecal del parque Lecocq, se pudieron observar bandas de un tamaño menor a 500 pb y mayor a 250 pb en los carriles de 2P y 3P, por lo que se obtuvieron bandas del tamaño esperado (287 pb). Este tamaño coincide con la banda que se observa en el C+, por lo que se considera que estos pools de materia fecal de pecarí son muestras positivas para HEV. Los demás pools de pecarí, ciervo axis y ciervo dama arrojaron resultados negativos, así como el C- (Figura 6).



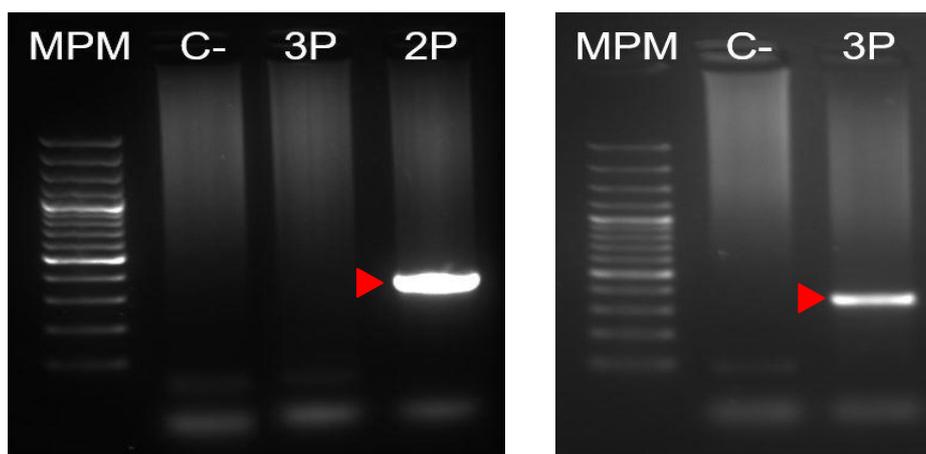
**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% correspondiente a la RT-nPCR específica para MT realizada a partir de los pools de heces de pecaríes de dos poblaciones (P y P2), ciervo axis (CA) y ciervo dama (D). El primer número indicado en cada carril corresponde a los pools definidos en la **Tabla 1**. Con la punta de flecha se indica el amplicón de tamaño de banda esperado (287pb) para la región de la metiltransferasa (ORF1) del genoma de HEV. El control positivo (C+) corresponde a la muestra de suero de un paciente confirmado para enfermedad de hepatitis E. C- corresponde al control negativo y MPM al marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder).

Por otro lado, en la electroforesis correspondiente a la RT-nPCR específica para MT realizada a partir de las muestras de heces de pecarí de la reserva de Pan de Azúcar se observaron bandas del tamaño esperado (287 pb) en los carriles de los controles positivos (2P y 3P) pero no en los carriles pertenecientes las muestras de materia fecal y el C-. Por lo tanto, no hubo muestras de materia fecal positivas para HEV en la población de pecarí de Pan de Azúcar (Figura 7).



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% correspondiente a la RT-nPCR específica para MT realizada a partir de las muestras (MP1, MP2, MP3 y MP4) de heces de pecaríes de la reserva de Pan de Azúcar. Con la punta de flecha se indica el amplicón de tamaño de banda esperado (287pb) para la región de la metiltransferasa (ORF1) del genoma de HEV. C+1 y C+2 corresponden a los controles positivos 3P y 2P respectivamente. C- corresponde a control negativo y MPM al marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder).

En cuanto a la amplificación de CAP por RT-nPCR de los pools positivos (2P y 3P) con las enzimas Revert Aid (ThermoFisher Scientific, USA) y Taq Polymerase (ThermoFisher Scientific, USA), se pudo observar una amplificación exitosa para 2P y no para 3P. A pesar de esto, la región CAP de 3P se logró amplificar por RT-nPCR al utilizar las enzimas Superscript II (Invitrogen Life Technologies, USA) y Taq Platinum (Invitrogen Life Technologies, USA). No hubo amplificación en los controles negativos de ambas RT-nPCR (Figura 8).



**Figura 8** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% correspondiente a la RT-nPCR específica para CAP realizada a partir del ARN de las muestras 2P y 3P. **A la izquierda:** realizada con las enzimas Revert Aid (ThermoFisher Scientific, USA) y Taq Polymerase (ThermoFisher Scientific, USA). **A la derecha:** realizada con las enzimas Superscript II (Invitrogen Life Technologies, USA) y Taq Platinum (Invitrogen Life Technologies, USA). Con la punta de flecha se indica el amplicón de tamaño de banda esperado (330pb). C- corresponde a control negativo y MPM al marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder).

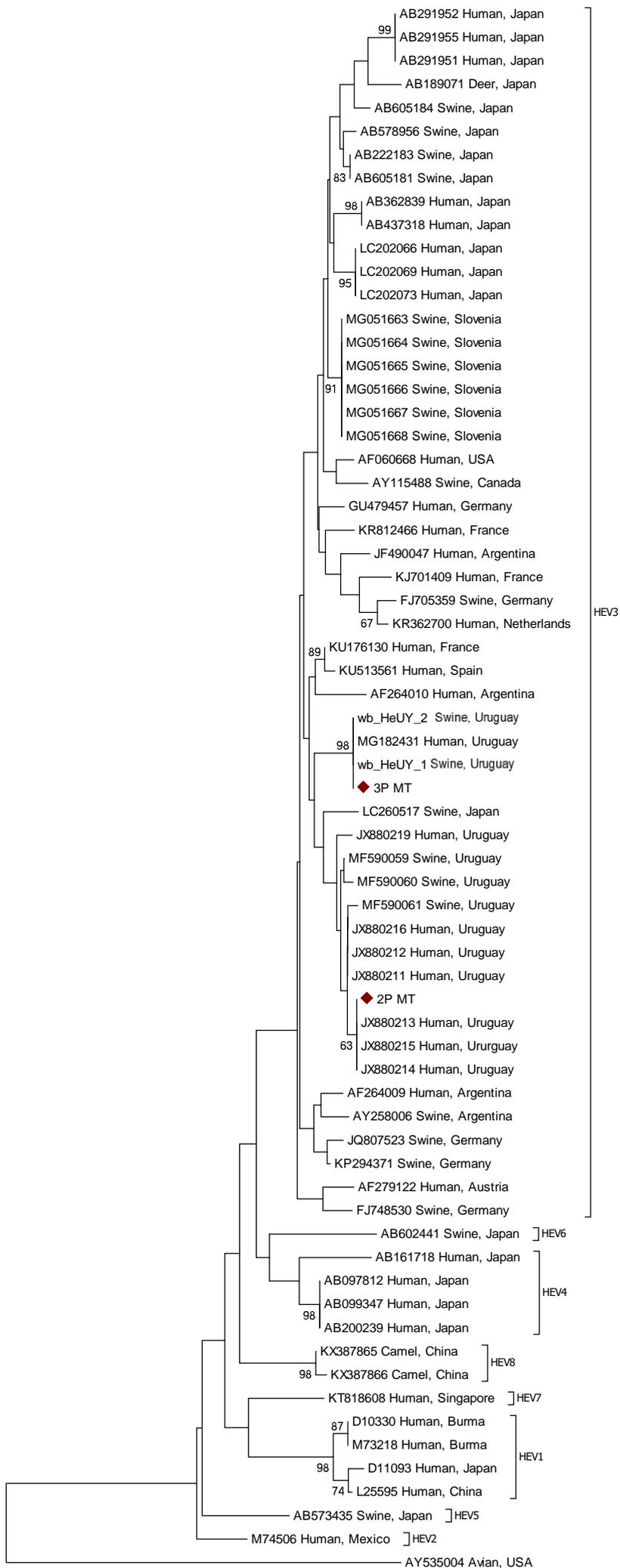
## Secuenciación y análisis filogenéticos

El análisis filogenético realizado con las secuencias de MT de las muestras positivas 2P y 3P mostró que ambas cepas pertenecen al Genotipo 3 (HEV3) (Figura 9). Estas son diferentes entre sí, presentando una identidad nucleotídica del 94% entre ellas. Es importante destacar que las secuencias de MT de ambas muestras son similares a cepas suinas y humanas uruguayas detectadas entre 2010 y 2018<sup>47</sup> (las cepas suinas wb\_HeUY\_1 y wb\_HeUY\_2 descubiertas por Libonatti et al. en 2018 no están publicadas aún) (Figura 9). Al comparar estas secuencias con las de 2P y 3P, se observó una identidad nucleotídica de 100-93% y de 100-92% respectivamente.

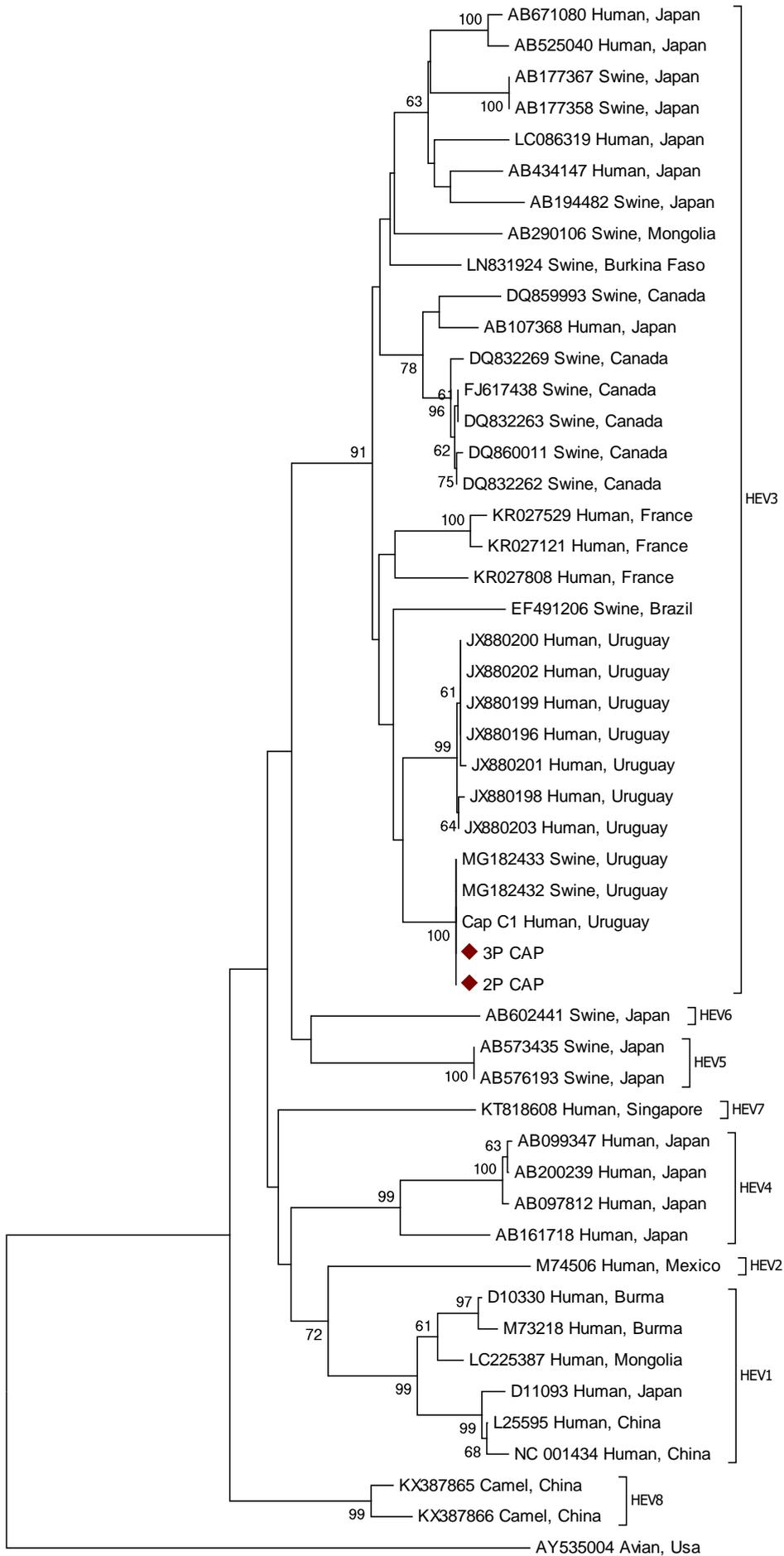
Cabe destacar que las secuencias obtenidas para MT de 2P y 3P tienen una identidad nucleotídica de 100% con cepas humanas uruguayas distintas entre sí (números de acceso JX880215 y MG182431 en GenBank respectivamente).

En cuanto al análisis filogenético realizado con las secuencias de CAP de 2P y 3P también se pudo observar que ambas cepas pertenecen a HEV3 (Figura 10). 2P y 3P presentan una identidad nucleotídica de 92,1-91,4% y 92,8-92,1% respectivamente con cepas uruguayas humanas detectadas en 2010<sup>46</sup>. Además, Ambas secuencias tienen una identidad nucleotídica de 99,6% con cepas suinas uruguayas descubiertas por Mirazo et al. en 2017 (con códigos de acceso MG182433 y MG182432 en GenBank).

Las secuencias de CAP de 2P y 3P son iguales entre sí, presentando una identidad nucleotídica de 100% con la secuencia de CAP perteneciente a una cepa humana todavía no publicada de Cancela et al.. Esta cepa es la misma que posee 100% de identidad con la secuencia de MT de 3P (número de acceso MG182431).



**Figura 9.** Árbol filogenético realizado con las secuencias de MT obtenidas a partir de los pools positivos 2P y 3P para HEV. Este árbol fue generado mediante el programa informático Mega v6.0 con el método de Neighbour-Joining. 2P y 3P se señalan con un rombo rojo. Se muestran valores de bootstrap mayores o iguales a 60%.



**Figura 10.** Árbol filogenético realizado con las secuencias de CAP obtenidas a partir de los pools positivos 2P y 3P para HEV. Este árbol fue generado mediante el programa informático Mega v6.0 con el método de Neighbour-Joining. 2P y 3P se señalan con un rombo rojo. Se muestran valores de Bootstrap mayores o iguales a 60%.

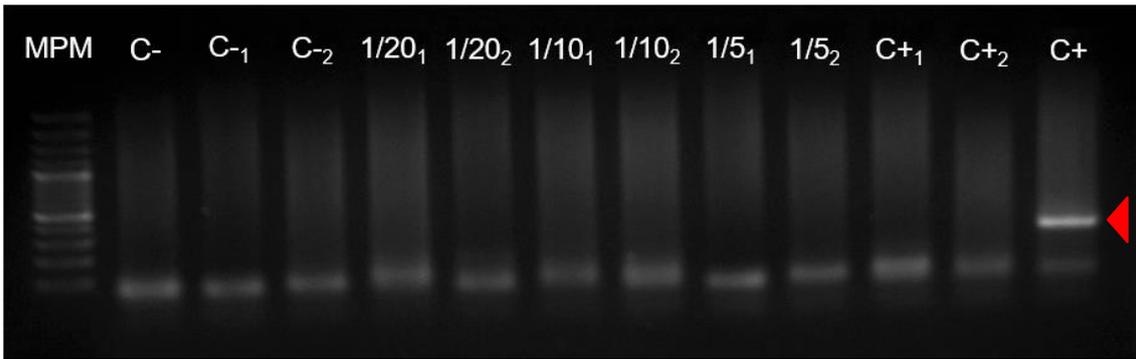
0.05

## Aislamiento de HEV en cultivo celular

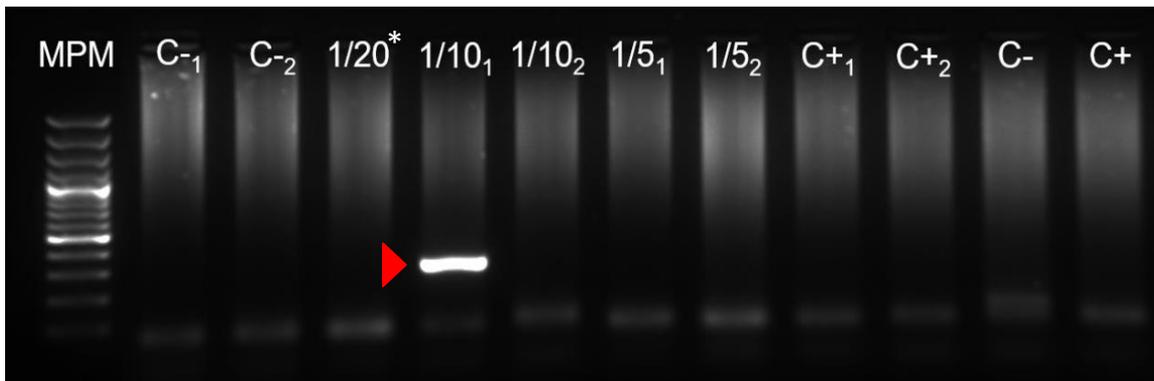
En el gel de agarosa correspondiente a la RT-nPCR específica para MT realizada a partir del pasaje 10 de las células inoculadas con 2P, se pudo visualizar la amplificación de una banda correspondiente al tamaño esperado (287 pb) en el control positivo de PCR. Por otro lado, no se observó amplificación ni en el control negativo de la PCR, ni en los carriles pertenecientes a las diferentes diluciones y controles de infección (Figura 11).

En cuanto al pasaje 10 de las células inoculadas con 3P, se observó la amplificación por RT-nPCR de una banda correspondiente al tamaño esperado (287 pb) en uno de los carriles correspondientes al inóculo con dilución 1/10. Por otro lado, no se observó amplificación ni en los controles de la PCR y de infección, ni en los carriles pertenecientes al resto de las diluciones (Figura 12). La secuencia de MT obtenida luego de purificar y enviar a secuenciar la banda amplificada reveló un cambio de base de una T por una C con respecto a la secuencia original del pool 3P. Al analizar este cambio se pudo observar que el cambio de base no generó un cambio de aminoácido.

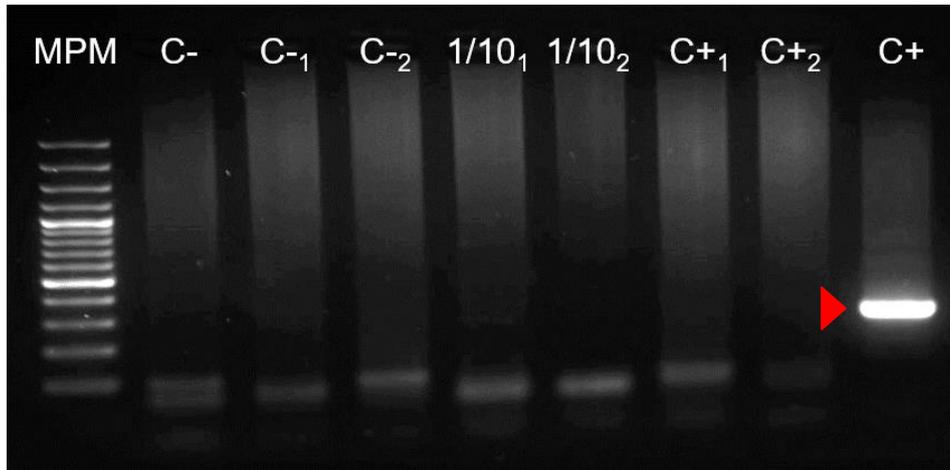
En las electroforesis de las RT-nPCR específicas para MT realizadas a partir de los pasajes 6 (Figura 13) y 15 (Figura 14) de las células inoculadas con 3P, se pudo observar una banda correspondiente al tamaño esperado (287 pb) en el control positivo de PCR. Por otro lado, no se observaron bandas de amplificación en el carril del control negativo de la PCR y tampoco en los pertenecientes a la dilución 1/10 y controles de infección.



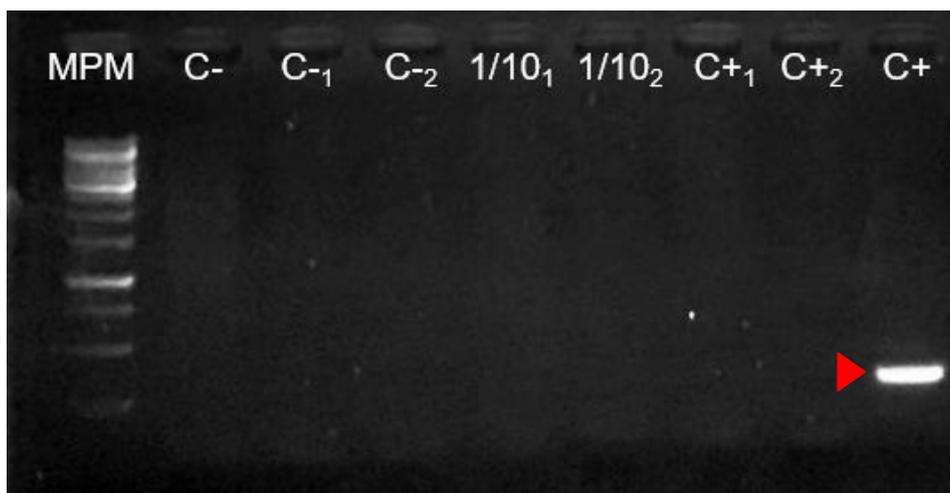
**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% correspondiente a la RT-nPCR específica para MT realizada a partir del pasaje 10 de células A549 inoculadas por duplicado con diluciones de 2P. Con la punta de flecha se indica el amplicón de tamaño de banda esperado (287pb) para la región de la metiltransferasa (ORF1) del genoma de HEV. C- corresponde a control negativo de PCR; C-<sub>1</sub> y C-<sub>2</sub> y C+<sub>1</sub> y C+<sub>2</sub> corresponden a los controles negativos y positivos de infección respectivamente; 1/20, 1/10 y 1/5 corresponden a las células inoculadas con estas diluciones; C+ es el control positivo de PCR (a partir de ARN de 2P); MPM refiere al marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder).



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% correspondiente a la RT-nPCR específica para MT realizada a partir del pasaje 10 de células A549 inoculadas por duplicado con diluciones de 3P. Con la punta de flecha se indica el amplicón de tamaño de banda esperado (287pb) para la región de la metiltransferasa (ORF1) del genoma de HEV. C- corresponde a control negativo de PCR; C-<sub>1</sub> y C-<sub>2</sub> y C+<sub>1</sub> y C+<sub>2</sub> corresponden a los controles negativos y positivos de infección respectivamente; 1/20, 1/10 y 1/5 corresponden a las células inoculadas con estas diluciones; C+ es el control positivo de PCR (a partir de ARN de 2P); MPM refiere al marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder). \*No se procesó la dilución 1/20 por duplicado.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% correspondiente a la RT-nPCR específica para MT realizada a partir del pasaje 6 de células A549 inoculadas por duplicado con diluciones de 3P. Con la punta de flecha se indica el amplicón de tamaño de banda esperado (287pb) para la región de la metiltransferasa (ORF1) del genoma de HEV. C- corresponde a control negativo de PCR; C-1 y C-2 y C+1 y C+2 corresponden a los controles negativos y positivos de infección respectivamente; 1/10 corresponde a las células inoculadas con esta dilución; C+ es el control positivo de PCR (a partir de ARN de 2P); MPM refiere al marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder).



**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% correspondiente a la RT-nPCR específica para MT realizada a partir del pasaje 15 de células A549 inoculadas por duplicado con diluciones de 3P. Con la punta de flecha se indica el amplicón de tamaño de banda esperado (287pb) para la región de la metiltransferasa (ORF1) del genoma de HEV. C- corresponde a control negativo de PCR; C-1 y C-2 y C+1 y C+2 corresponden a los controles negativos y positivos de infección respectivamente; 1/10 corresponde a las células inoculadas con esta dilución; C+ es el control positivo de PCR (a partir de ARN de 2P); MPM refiere al marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder).

## Discusión y conclusiones

El HEV es el agente causal de la hepatitis E, una enfermedad zoonótica de importancia en salud pública y con un creciente número de reservorios animales. Algunos de estos son los ciervos, las ratas, los cerdos y los jabalíes<sup>4,20,21</sup>. En Uruguay, se ha registrado la circulación de HEV en humanos, jabalíes y cerdos<sup>47</sup>, pero aún hay posibles reservorios por analizar. El objetivo de esta tesina fue relevar poblaciones de pecaríes, ciervos dama, ciervos axis y ratas como potenciales reservorios de HEV en Uruguay a través de un estudio serológico y molecular.

A partir del ensayo de ELISA se pudo observar que hubo sueros positivos con anticuerpos anti HEV en pecaríes y ratas de Uruguay. Este resultado pone en evidencia a los pecaríes como reservorio de HEV por primera vez a nivel mundial, presentando tasas de seroprevalencia incluso mayores (56% y 36% en M'Bopicuá y Parque Lecocq respectivamente) a los reportados anteriormente en cerdos y jabalíes de Uruguay (46.8% y 22.1% respectivamente)<sup>47</sup>. El kit de ELISA utilizado presenta una sensibilidad y especificidad >99.5%, por lo que todos los valores de seroprevalencia registrados (incluido el 2% en ratas) son significativos. Cabe destacar que el único suero de rata seropositivo era proveniente de una rata del puerto de Montevideo (sitio de arribo de barcos transportadores y pesqueros provenientes de otros países), por lo que no se puede afirmar que *Rattus rattus*, sea reservorio activo de HEV en Uruguay. Igualmente, la presencia de ratas con anticuerpos anti HEV podría indicar una posible transmisión entre ratas infectadas con HEV provenientes de otros países<sup>53</sup> y ratas uruguayas. A diferencia de las ratas y pecaríes, no se encontró presencia de anticuerpos anti HEV en sueros de ciervos axis. Este resultado negativo puede tomarse en cuenta como un control sobre el correcto funcionamiento del kit de ELISA, corroborando que los resultados positivos descritos previamente no son falsos positivos.

De entre las muestras recolectadas de materia fecal de ciervos y pecaríes, se identificaron (mediante la técnica de RT- nPCR específica para MT) dos pools (2P y 3P) de pecaríes del Parque Lecocq positivos para HEV. Es importante destacar que este resultado caracteriza a los pecaríes como reservorios activos de HEV por primera vez. La región CAP del pool positivo 2P logró amplificarse con las enzimas Revert Aid (ThermoFisher Scientific, USA) y Taq Polymerase (ThermoFisher Scientific, USA) mientras que hubo que utilizar las enzimas SuperScript II (Invitrogen Life Technologies, USA) y Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, USA) para amplificar CAP de 3P. Concordantemente, se ha reportado que muestras HEV positivas con baja carga viral no lograron amplificarse con una RT-nPCR convencional realizada con Revert Aid (ThermoFisher Scientific, USA) y Taq Polymerase (ThermoFisher Scientific, USA)<sup>47</sup>. Adicionalmente, SuperScript II (Invitrogen Life Technologies, USA) y Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technologies, USA) son enzimas más sensibles, por lo tanto, una posible explicación a los resultados obtenidos sería una menor carga viral en 3P comparado con 2P.

Si bien no hubo muestras de materia fecal positivas para HEV correspondientes a los pecaríes de Pan de Azúcar y no se analizaron muestras de materia fecal de pecaríes de la reserva de M'Bopicuá, la presencia de anticuerpos específicos anti HEV en estas poblaciones ponen en evidencia la circulación del virus en estos animales.

A partir del análisis filogenético realizado con las secuencias de MT de 2P y 3P se pudo observar que estas son dos cepas diferentes entre sí. Cabe destacar que estas se encuentran circulando en una misma población, lo que podría tener un gran impacto epidemiológico, debido a que los animales antes infectados con una cepa podrían reinfectarse con la otra.

Al analizar los árboles filogenéticos realizados a partir de las regiones MT y CAP se pudo concluir que ambas cepas son pertenecientes a HEV3, de potencial zoonótico. Adicionalmente, estas cepas son muy similares (91,4-100%) a cepas humanas y suinas previamente descritas en Uruguay<sup>46,47</sup>, teniendo un 100% de identidad nucleotídica con cepas humanas. Esto sugiere

que los pecaríes presentan alto potencial de transmisión zoonótico. Las secuencias de las regiones CAP y MT de 3P tienen un 100% de identidad nucleotídica con las regiones CAP y MT de una misma cepa humana uruguaya. Adicionalmente, la secuencia de CAP de 2P también posee un 100% de identidad nucleotídica con la misma cepa humana que CAP de 3P. Por otro lado, como fue descrito anteriormente, las secuencias de MT de 2P y 3P son diferentes entre sí, por lo que MT de 2P tiene 100% de identidad nucleotídica con una cepa humana distinta a la nombrada anteriormente. Esto podría explicarse ya que 2P es un pool de muestras, por lo que podría haber dos muestras con cepas diferentes dentro del pool. Otra posibilidad es que se haya dado una recombinación de dos cepas de HEV circulantes, fenómeno ya reportado con anterioridad en distintas regiones del genoma, incluida la unión de las regiones ORF1 y ORF2<sup>54,55</sup>.

A partir de la electroforesis de agarosa correspondiente al pasaje 10 de 2P se pudo observar que no hubo amplificación para MT en ninguno de los carriles pertenecientes a las células inoculadas con las distintas diluciones de 2P. Esto indica que no se logró aislar esta cepa en cultivo celular. Por otro lado, el fragmento de 287 pb que se observó en la electroforesis realizada con los productos de la RT-nPCR a partir del pasaje 10 de 3P indica que se logró el aislamiento *in vitro* de HEV proveniente de este pool en cultivo celular. Mirazo et al.<sup>52</sup> describieron una curva de cinética de replicación de HEV en la cual se observa un pico de carga viral en el pasaje 7 (primer pasaje donde se pudo confirmar la presencia de HEV por RT-nPCR). Luego, la carga viral se mantiene constante durante dos pasajes y posteriormente se observa un descenso pronunciado al tercer pasaje. Esto podría explicar por qué no hubo amplificación en las RT-nPCR realizadas a partir de las células de los pasajes 6 y 15.

A partir de la secuenciación del ADN extraído de la banda presente en el gel del pasaje 10 (34 días post-infección) de 3P, se pudo observar un cambio de base en la región MT de T por C con respecto a la secuencia de 3P original. Aunque no hubo un cambio de aminoácido, este cambio en 34 días llama la atención dado que la región de la metiltransferasa es una región altamente

conservada para HEV. Sari et al.<sup>56</sup> demostró que HEV presenta más alteraciones genómicas (incluyendo el ORF1) en células A549 que *in vivo*, pudiendo explicar lo observado en el cambio de secuencia de 3P.

Los controles negativos de infección no presentaron amplificación en ninguno de los pasajes evaluados para 2P y 3P, lo cual descarta la posibilidad de contaminación durante el proceso de aislamiento viral. Llamativamente, los controles positivos de infección en el pasaje 10 de 2P y 3P tampoco mostraron bandas de amplificación. Esto podría explicarse por el hecho de que las células correspondientes a este inóculo fueron infectadas y guardadas a -80°C en 2015 y pueden haberse alterado debido a problemas en su mantenimiento (por ejemplo, pérdida en la cadena de frío), sumado a la dificultad para reinfectar. Dado que hubo amplificación de MT a partir de la RT-nPCR de células inoculadas con 3P en el pasaje 10, esta banda se puede considerar como control positivo de infección en el resto de los pasajes.

El control positivo de PCR utilizado en todas las RT-nPCR realizadas a partir de los pasajes en cultivo celular fue el ARN extraído de 2P. En la electroforesis correspondiente al pasaje 10 de 3P no se observó la banda de amplificación de 287 pb esperada en este control, por lo que se volvió a extraer el ARN de 2P para realizar las RT-nPCR de los pasajes 6 y 15. En estas RT-nPCR sí se logró una amplificación del control positivo, por lo que probablemente el ARN de 2P utilizado para la RT-nPCR del pasaje 10 se había degradado por sus sucesivos usos.

Como fue mencionado anteriormente, no se logró infectar las células A549 con 2P, pero sí con 3P. Esto podría explicarse en el caso de que 2P fuera una cepa generada por recombinación de 2 cepas circulantes y que en esta recombinación se haya perdido su capacidad infectiva. Otra posibilidad podría ser una diferencia significativa en la carga viral entre 3P y 2P, siendo 2P la de menor carga viral. Por otro lado, se ha reportado anteriormente que las inserciones en posiciones específicas de la región hipervariable del ORF1 del genoma de HEV permiten su adaptación en cultivo celular<sup>57</sup>. Por esta razón, también se podría tener en cuenta la posibilidad de que 3P hubiera adquirido adaptaciones por mutaciones en regiones del genoma no estudiadas en este

trabajo, que le permitieran aumentar su capacidad infectiva *in vitro* o que 2P hubiera adquirido mutaciones que disminuyeran su capacidad infectiva *in vitro*. Se tendrían que realizar estudios a futuro para comprobar estas posibilidades.

En el presente trabajo se hipotetizó que HEV circula entre las poblaciones de recría de ciervos (axis y dama), pecaríes y ratas de Uruguay. Con lo ya discutido anteriormente, se puede confirmar esta hipótesis en pecaríes y parcialmente en ratas. Otra hipótesis planteaba que, en las especies estudiadas, las tasas de seroprevalencia serían más bajas que en cerdos domésticos y jabalíes<sup>47</sup>. Con los resultados obtenidos se puede verificar esta hipótesis en ratas y ciervos pero no en pecaríes, dado que su seroprevalencia es mayor a la reportada en cerdos y jabalíes. Por último, las cepas de HEV encontradas en pecaríes se identificaron como cepas zoonóticas, por lo que la hipótesis de que las cepas de HEV circulantes en estos reservorios alternativos podrían ser cepas zoonóticas fue confirmada.

En conclusión, se pudo identificar al pecarí como reservorio activo de HEV en el Uruguay. Las cepas descritas encontradas en este reservorio poseen potencial zoonótico y capacidad infectiva (en el caso de 3P). Dado que en nuestro país existe un plan para la reintroducción del pecarí en su hábitat natural<sup>58</sup>, los hallazgos de este trabajo sugieren que estos animales podrían representar un riesgo para la dispersión de HEV en el medio salvaje.

Este trabajo es el primer estudio a nivel mundial que demuestra la presencia de HEV en pecaríes, adicionándolos a la lista de reservorios animales de HEV<sup>59</sup>. Sin embargo, los resultados aún deben profundizarse. La información aquí presentada brinda valiosas herramientas para el diseño de políticas sanitarias para la prevención de la transmisión e infección por HEV.

## Perspectivas

A partir de este trabajo surgieron nuevas preguntas a contestar. Para eso se plantea continuar con las siguientes actividades:

1. Extracción de ARN y posterior RT-qPCR de las muestras de suero con anticuerpos anti HEV con mayores absorbancias relativas (de acuerdo con los resultados del ensayo de ELISA) de cada población estudiada en este trabajo para analizar la viremia y posibles cepas nuevas.
2. Realizar un análisis más amplio en ratas para evaluar si estas son reservorios activos para HEV en Uruguay.
3. Extracción de ARN y análisis por RT-nPCR de las muestras pertenecientes a los pools 2P y 3P para evaluar cuántas muestras positivas hay en cada pool y sus respectivas secuencias de MT y CAP.
4. Cuantificación absoluta de ARN viral en 2P y 3P mediante RT-qPCR para relacionarlo con los resultados obtenidos en el aislamiento viral y en la amplificación de CAP.
5. Análisis de posibles regiones de recombinación de HEV en 2P para comprender el origen diferente de CAP y MT de esta cepa.
6. Análisis de posibles mutaciones en 3P y 2P que puedan influir en la capacidad infectiva de estas cepas.

## Bibliografía

1. Smith, D. B. *et al.* Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* **95**, 2223–2232 (2014).
2. Purcell, R. H. & Emerson, S. U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* **42**, 161–177 (2001).
3. Ahmad, I. Holla, R. P., Jameel, S. NIH Public Access. *Biophys. Chem.* **161**, 47–58 (2011).
4. Yugo, D. M. & Meng, X. J. Hepatitis E virus: Foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **10**, 4507–4533 (2013).
5. Lu, L., Li, C. & Hagedorn, C. H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* **16**, 5–36 (2006).
6. Tsarev, S. A. *et al.* Characterization of a Prototype Strain of Hepatitis E Virus Source: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Published by: National Academy of Sciences Stable URL: <https://www.jstor.org/stable/2358580> National A. **89**, 559–563 (2019).
7. Heller, B. *et al.* Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 1147–1152 (2017).
8. Tam, A. W. *et al.* Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* **185**, 120–131 (1991).
9. Jameel, S., Zafrullah, M. & Ozdener, M. H. Expression in Animal Cells and Characterization of the Hepatitis E Virus Structural Proteins. *J. Virology* **70**, 207–216 (1996).
10. Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Arbiza, J. & Gerona, S. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update.

11. Teo, C. G. CDC Health Information for International Travel. in (eds. Brunette, G. W., Kozarsky, P., Magill, A. J., Shliml, D. R. & Whatley, A. D.) 335–337 (Mosby, 2009).
12. Katiyar, H. *et al.* Prevalence of hepatitis E virus viremia and antibodies among healthy blood donors in India. *Indian J. Gastroenterol.* **37**, 342–346 (2018).
13. Mushahwar, I. K. Hepatitis E Virus : Molecular Virology , Clinical Features , Diagnosis , Transmission , Epidemiology , and Prevention. **658**, 646–658 (2008).
14. Jefferies, M., Rauff, B., Rashid, H., Lam, T. & Rafiq, S. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. *World J. Clin. Cases* **6**, 589–599 (2018).
15. Purdy, M. A. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile : Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2645–2646 (2017).
16. Teo, C. G. Much meat, much malady: Changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 24–32 (2010).
17. Buisson, Y. *et al.* Identification of Genotype 1 Hepatitis E Virus in Samples from Swine in Cambodia. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3440–3442 (2006).
18. Echevarría, J. M., González, J. E. & Lewis-Ximenez, L. L. Hepatitis E virus infection in Latin America: A review. *J. Med. Virol.* **85**, 1037–1045 (2013).
19. Arbiza, J. *et al.* Indigenous Hepatitis E Virus Genotype 1 Infection, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 171–173 (2013).
20. Meng, X. J. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis e virus. *Semin. Liver Dis.* **33**, 41–49 (2013).
21. Meng, X. J. From barnyard to food table: The omnipresence of hepatitis E

- virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* **161**, 23–30 (2011).
22. Okamoto, H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* **127**, 216–228 (2007).
  23. Heyries, L. *et al.* Pig Liver Sausage as a Source of Hepatitis E Virus Transmission to Humans. *J. Infect. Dis.* **202**, 825–834 (2010).
  24. Berto, A. *et al.* Hepatitis E Virus in Pork Liver Sausage, France. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 264–266 (2013).
  25. Vach, W. *et al.* Time Trend of the Prevalence of Hepatitis E Antibodies among Farmers and Blood Donors: A Potential Zoonosis in Denmark. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 1026–1031 (2008).
  26. Bertrand, J. J. *et al.* Possible Zoonotic Transmission of Hepatitis E from Pet Pig to Its Owner. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1094–1096 (2012).
  27. Sooryanarain, H. & Meng, X. Hepatitis E virus : reasons for emergence in humans. *Curr. Opin. Virol.* **34**, 10–17 (2019).
  28. Rein, D. B., Stevens, G. A., Theaker, J., Wittenborn, J. S. & Wiersma, S. T. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology* **55**, 988–997 (2012).
  29. Kar, P. *et al.* Does Hepatitis E Viral Load and Genotypes Influence the Final Outcome of Acute Liver Failure During Pregnancy ? *Am. J. Gastroenterol.* **10**, 2495–2501 (2008).
  30. Kumar, A. *et al.* Risk factors for vertical transmission of hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* **24**, 1067–1075 (2017).
  31. Aggarwal, R. & Naik, S. Hepatitis E: does person-to-person spread occur? *Indian J. Gastroenterol.* **11**, 109–112 (1992).
  32. Kamar, N. *et al.* Hepatitis E. *Lancet* **379**, 2477–2488 (2012).
  33. Beale, M. A., Tettmar, K., Szypulska, R., Tedder, R. S. & Ijaz, S. Is there

- evidence of recent hepatitis E virus infection in English and North Welsh blood donors? *Vox Sang.* **100**, 340–342 (2011).
34. Kumar, S., Subhadra, S., Singh, B. & Panda, B. K. Hepatitis E virus: The current scenario. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, e228–e233 (2013).
  35. Taniguchi, M. *et al.* Epidemiology of hepatitis E in Northeastern China, South Korea and Japan. *J. Infect.* **58**, 232–237 (2009).
  36. Schlosser, B. *et al.* Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J. Hepatol.* **56**, 500–502 (2012).
  37. Buchholz, S. *et al.* Chronic hepatitis E in hematopoietic stem cell transplant patients in a low-endemic country? *Transpl. Infect. Dis.* **14**, 103–106 (2011).
  38. Gérolami, R., Moal, V. & Colson, P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.* **358**, 859–860 (2008).
  39. Rostaing, L. *et al.* Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **358**, 811–817 (2008).
  40. Pischke, S. *et al.* Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transplant.* **16**, 74–82 (2010).
  41. González Tallón, A., Moreira Vicente, V., Mateos Lindemann, M. & Achécar Justo, L. Chronic hepatitis E in an immunocompetent patient. *Gastroenterol. Hepatol.* **34**, 398–400 (2011).
  42. Patra, S., Kumar, A., Trivedi, S., Puri, M. & Sarin, S. No Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann. Intenal Med.* **147**, 28–33 (2007).
  43. Castaño, G. C., Sookoian, S., Frider, B., Mushahwar, I. K. & Schlauder, G. G. Identification of 2 Novel Isolates of Hepatitis E Virus in Argentina. *J. Infect. Dis.* **182**, 294–297 (2002).
  44. Munné, M. S., Vladimirovsky, S. & Otegui, L. Identification of the first strain

- of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J. Med. Virol.* **78**, 1579–1583 (2006).
45. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C., Gagliano, G. & Arbiza, J. Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human hepatitis E virus infection in Uruguay. *Arch. Virol.* **156**, 1451–1454 (2011).
  46. Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C. & Arbiza, J. Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res.* **173**, 364–370 (2013).
  47. Mirazo, S. *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.* **213**, 21–27 (2018).
  48. Ojeda, G. N., Amavet, P. S., Rueda, E. C. & Siroski, P. A. DNA extraction from skins of wild ( *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Pecari tajacu* ) and domestic ( *Sus scrofa domestica* ) species using a novel protocol. *Genet. and Mol. Res.* **11**, 672–678 (2012).
  49. Wang, Y. *et al.* A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* **80**, 169–177 (2015).
  50. Meng, X.-J. *et al.* A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 9860–9865 (1997).
  51. Zhang, H. *et al.* Both swine and human cells are capable to support the replication of swine hepatitis E virus type 4 in vitro. *Virus Res.* **158**, 289–293 (2011).
  52. Mirazo, S. *et al.* A case of incidental infection of Hepatitis E virus (HEV) genotype 1 in a domestic pig. *Arch. Virol.* **163**, 3403–3407 (2018).
  53. De Sabato, L. *et al.* Detection of hepatitis E virus RNA in rats caught in pig farms from Northern Italy. *Zoonoses Public Heal.* 1–8 (2019). doi:10.1111/zph.12655

54. Luk, K., Coller, K. E., Dawson, G. J. & Cloherty, G. A. Identification of a putative novel genotype 3 / rabbit hepatitis E virus ( HEV ) recombinant. *PLoS One* **13**, 1–19 (2018).
55. Zhou, K. *et al.* Hepatitis E virus in Tibetan pigs on the Qinghai - Tibetan Plateau : detection , molecular characterization and infection of BALB / c mice. *Arch. Virol.* **164**, 2943–2951 (2019).
56. Sari, G. *et al.* Hepatitis E Virus Shows More Genomic Alterations in Cell Culture than In Vivo. *Pathogens* **8**, 255–264 (2019).
57. Johne, R. *et al.* An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *J. Viral Hepat.* **21**, 447–456 (2014).
58. Sotullo, A., Clavijo, C. & Martínez-Lafranco, J. A. *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares.* (Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA), 2013).
59. Doceul, V., Bagdassarian, E., Demange, A. & Pavio, N. Zoonotic Hepatitis E Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. *Viruses* **8**, 270–293 (2016).

## Agradecimientos

Agradezco a mi tutor Dr. Santiago Mirazo por abrirme las puertas del laboratorio, por haberme guiado a lo largo de este proceso y confiar en mis capacidades como futura científica.

También agradezco a mi co-tutora Msc. Florencia Cancela por instruirme y supervisarme en la realización de nuevas técnicas y estar al pie del cañón ante cualquier circunstancia.

Además, Agradezco a Lic. María Laura Herrera y Lic. Ignacio González por iniciar conmigo este trabajo a partir del proyecto PAIE-CSIC que compartimos y a Valeria Libonatti por ayudarnos en este proceso.

Quiero agradecer a los docentes y compañeros de laboratorio de la Sección Virología de Facultad de Ciencias (Udelar) por su ayuda, compañía y apoyo y por festejar mis logros como si fueran suyos.

Se agradece a los Dres Carmen Leizagoyen, Gustavo Castro, Matías Loureiro y Hugo Arellano, al DMV. Lorenzo Verger y a la Asociación de Controladores de Jabalí de Artigas por brindar las muestras de suero que permitieron realizar el análisis serológico presente en esta tesina.

Igualmente agradezco a las Doctoras Jimena Hochmann y Pilar Moreno por aceptar ser parte del tribunal evaluador de esta tesina.

Por último, pero no menos importante, agradezco a mi familia por apoyarme incondicionalmente durante toda mi vida y en estos 5 años de carrera en particular, a Nacho por ser mi compañero, escucharme y entenderme siempre y a mis amigos (de la vida, del colegio, del coro, de la manada y de la Antártida) por estar siempre presentes en las buenas y en las no tan buenas.