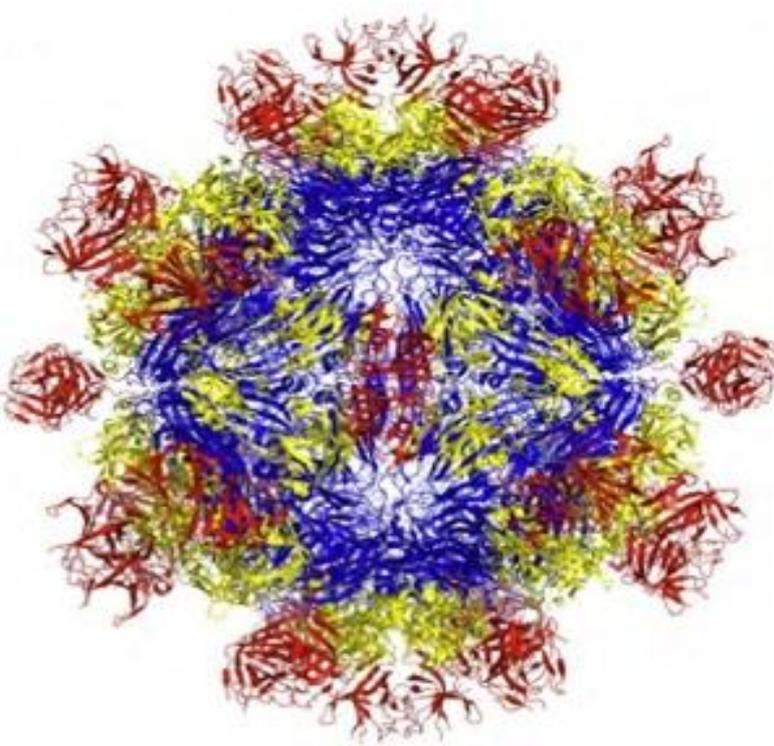


# HEV en suinos de Uruguay: relevamiento, detección y caracterización.



Bach. Cecilia D´Albora  
Licenciatura en Ciencias Biológicas  
Orientación Genética y Evolución

Tutor: Dr. Santiago Mirazo

Co-tutor: Dr. Juan Arbiza

2015

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	5
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
2.1. Características generales de HEV.....	7
2.1.2. Taxonomía.....	7
2.1.2. Organización genómica.....	8
2.1.3. Epidemiología Molecular.....	9
2.2. Modos de Transmisión.....	11
2.2.1. Vía fecal-oral.....	11
2.2.2. Zoonosis.....	12
2.2.3. Transmisión persona-persona.....	13
2.2.4. Transmisión parenteral.....	13
2.2.5. Transmisión vertical.....	14
2.3. HEV en América Latina.....	14
2.3.1. Seroepidemiología (suinos y humanos).....	14
2.3.2. Epidemiología molecular.....	15
2.3.3. Epidemiología de HEV en Uruguay.....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	18
3.1. Objetivo General.....	18
3.2. Objetivos Específicos.....	18
<b>4. ESTRATEGIA DE TRABAJO</b> .....	20
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
5.1. Detección de HEV por PCR convencional (RT-nPCR).....	21
5.1.1. Muestras analizadas.....	21
5.1.2. Obtención de ARN por TRIZOL®.....	22
5.1.3. Amplificación de región del ORF2 viral.....	22
5.1.4. Amplificación de región del ORF1 viral.....	23
5.1.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	25
5.1.6. Secuenciación.....	25
5.1.7. Análisis filogenético.....	25
5.2. Diseño de rtPCR.....	26
5.2.1. Muestras analizadas.....	26

5.2.2. Amplificación de región de ORF3 viral.....	26
5.3. Aislamiento viral.....	27
5.3.1. Células.....	27
5.3.2. Virus.....	27
5.3.3. Inoculación y propagación de HEV en células Hep-G2....	27
5.3.4. Obtención por Trizol® de ARN viral a partir de cultivo.....	28
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
6.1. Detección de HEV por RT-nPCR.....	30
6.1.1. Amplificación de región del ORF2 viral.....	30
6.1.2. Amplificación de región del ORF1 viral.....	32
6.2. Análisis Filogenético.....	33
6.3. rtPCR con muestras suinas.....	34
6.4. Aislamiento viral en células Hep-G2.....	36
6.4.1. Análisis aislamiento de HEV por rtPCR.....	36
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>43</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>44</b>

## **Abreviaturas**

ADN	Acido desoxirribonucleico	mg	Miligramo
ADN <sub>c</sub>	ADN copia	mL	Mililitro
aa	aminoácidos	µg	Microgramo
ARN	Ácido ribonucleico	µL	Microlitro
ARNm	ARN mensajero	nm	Nanómetro
ATB	Antibiótico	nt	Nucleótidos
CAP	Caperuza	ORF1	Marco de Lectura Abierto 1
cm	Centímetro	pb	Pares de bases
ct	Ciclo crítico	PBS	Solución salina tamponada de fosfato
dNTP's	Desoxinucléotidos	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EtOH	Etanol	PM	Marcador de Peso Molecular
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético	RT-nPCR	Retrotranscripción y PCR anidada
G1	Genotipo 1	rtPCR	PCR en Tiempo Real
G2	Genotipo 2	rpm	Revoluciones por minuto
G3	Genotipo 3	SFB	Suero Fetal Bovino
G4	Genotipo 4	TAE	Tris Acetato EDTA
HEV	Virus de la Hepatitis E	U/m	Unidades por mililitro
KDa	Kilo Dalton	UTR	Regiones no traducidas
L	Litro		
M	Molar		

## **1. RESUMEN**

Una de las enfermedades virales emergentes que preocupa a la salud pública dada su compleja epidemiología es el virus de la Hepatitis E (HEV). HEV es el único miembro de la familia *Hepeviridae* y se transmite principalmente por la vía fecal-oral. La infección por este virus presenta una mortalidad que llega hasta el 4 % en la población general, superior a la mortalidad que presenta Hepatitis A y puede alcanzar al 20% en mujeres embarazadas siendo la principal causa del síndrome de la Falla Hepática Fulminante. HEV se clasifica en 4 genotipos (G1-4), siendo los G1 y G2 antroponóticos, responsables de las epidemias en zonas endémicas. Los G3 y G4 se asocian a casos esporádicos en regiones no endémicas y países desarrollados, son considerados zoonóticos y los suidos son los principales animales reservorios.

En los últimos años en Uruguay se han reportado los primeros casos de infección por HEV en humanos, tratándose de casos autóctonos y asociados al G3. Mediante un exhaustivo análisis molecular se comprobó que las cepas de nuestro país están filogenéticamente emparentadas con aislados suinos y humanos Europeos, lo que sugiere un origen zoonótico de la infección. Recientemente también se detectó el primer caso autóctono de infección por HEV humano G1 en Uruguay, filogenéticamente emparentado con cepas de origen Venezolano y Cubano.

Dado el panorama actual de HEV en Uruguay, se propuso como objetivo principal de este trabajo el relevamiento del estatus de HEV en cerdos, jabalíes y en productos cárnicos derivados a partir de la amplificación por PCR convencional de una región del ORF 2 que codifica para la cápside viral y la amplificación de una región del ORF1 que codifica para la metiltransferasa viral. Para de esta forma poder evaluar el impacto zoonótico de la enfermedad. Se investigó la presencia de HEV por PCR convencional en 37 muestras de órganos de jabalíes colectados en el este del país (2011-2012), 55 muestras de cerdos de distintos criaderos (2013) y 7 muestras de jamón serrano de origen Europeo, de Argentina y Uruguay.

Por otro lado se propuso la estandarización de una metodología de rtPCR con tecnología SYBR® Green diseñada para amplificar una región del ORF3, utilizando muestras previamente analizadas por RT-nPCR, como método rápido, sensible y cuantitativo para la detección de HEV en muestras de suinos. Como tercer objetivo se planteó el aislamiento de HEV a partir de materia fecal suina en la línea celular de carcinoma humano Hep-G2, como posible modelo para el estudio de la replicación de HEV en cultivo celular *in vitro* y para el análisis de la infectividad de HEV G3 en células de hepatocarcinoma humano. A partir de este trabajo en el que se realizó por primera vez un amplio relevamiento de HEV en suinos de Uruguay, poniendo a punto metodologías de RT-nPCR y de rtPCR, se encontró una baja frecuencia de HEV en suinos de Uruguay. Por primera vez en América se detectó un aislado de HEV G1 en hígado de cerdo, considerado hasta el momento como exclusivamente antroponótico. Este resultado, que solo posee un antecedente a nivel mundial, puede suponer un cambio importante en la epidemiología de HEV.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Características generales del Virus de la Hepatitis E**

#### **2.1.2. Taxonomía**

El agente causal de la Hepatitis E se identificó por primera vez durante los años 80 (Bradley et al. 1988), siendo denominado Hepatitis E virus en 1990 (Reyes et al. 1990). La primera epidemia de Hepatitis E ocurrió durante los años 1955-1956 en Nueva Delhi, India (Grupta et al. 1957).

Durante la década de los 80´ se reportó la presencia de partículas esféricas de 32 nm de diámetro a través de microscopia electrónica en muestras de materias fecales pertenecientes a pacientes de distintas zonas con hepatitis de transmisión entérica no-A, no-B (ET-NANBH) (Bradley et al 1988).

En primera instancia, y basándose en la estructura superficial y la organización del genoma, el virus de la Hepatitis E fue clasificado como un género aparte dentro de la familia *Calciviridae* (Tam et al. 1991).

Sin embargo, HEV muestra similitudes con varias familias virales pero posee suficientes diferencias como para ser clasificado dentro de otra familia viral (Meng et al. 2012)

Actualmente el virus de la Hepatitis E (HEV) pertenece al género *Hepevirus*, siendo este, único miembro de la familia *Hepeviridae* (Fauquet et al. 2005; Smith et al. 2014).

### 2.1.2. Organización Genómica

El virus de la Hepatitis E es un virus no envuelto de un tamaño de 27-34nm, cápside icosaédrica, cuyo genoma es de ARN simple cadena de polaridad positiva y aproximadamente 7200 nt de longitud (Emerson et al. 2003).

El genoma viral posee dos regiones no codificantes (UTRs, del inglés “Untranslated Regions”) situadas en los extremos 5’ y 3’, respectivamente. HEV posee una caperuza o casquete (CAP) de metilguaninas en el extremo 5’, mientras que en el extremo 3’ este posee una cola poli-A (Emerson et al. 2006a), importante para la estabilidad del ARNm.

HEV posee tres marcos de lectura abiertos (ORF1, 2 y 3; del inglés “Open Reading Frame”) parcialmente solapados (Fig.1) (Panda et al. 1995).

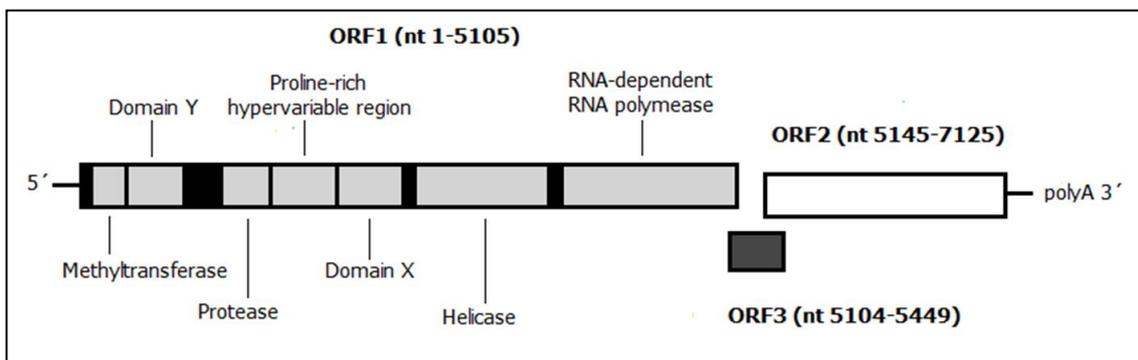
El ORF1 codifica para las siguientes proteínas virales no estructurales: metiltransferasa (MeT), ARN helicasa, ARN polimerasa dependiente de ARN y una proteasa (PCP). Estas proteínas poseen actividad enzimática y participan en la replicación viral. (Koonin et al. 1992).

Además de los dominios no estructurales antes mencionados, en el ORF1 existen dominios no caracterizados que son homólogos a dominios en otros virus ARN de polaridad positiva de plantas y de animales. Estos dominios se denominan X e Y, respectivamente (Ahmad et al 2012). El dominio X constituye un macrodominio conservado y se localiza hacia el extremo 3’ de una región rica en prolina hipervariable (Fig.1), mientras que el dominio Y se localiza hacia el extremo 3’ de la proteína metiltransferasa (Fig. 1). La región hipervariable rica en prolina (HVR, del inglés “Hypervariable Region”), implicada en replicación viral (Pudupakam et al. 2011), es importante para la subtipificación de HEV dada su alta variabilidad entre genotipos.

El ORF2, codifica para una única proteína estructural, la proteína de cápside, de unos 660 aa de longitud y que posee sitios glicosilados. Se ha demostrado que la mutación dirigida de estos sitios no permite la formación de partículas virales infectivas (Graff et al. 2008).

El ORF3, codifica una pequeña fosfoproteína (pORF3) de aproximadamente 13,5 Kda (Korkaya et al. 2001), y se ha propuesto su implicancia en la patogénesis de HEV (Emerson et al. 2010), y en el egreso de los viriones luego de la replicación debido a la interacción de la misma con proteínas celulares

promoviendo la supervivencia celular (Moin et al. 2007). Asimismo, se ha sugerido su participación en la respuesta del hospedador frente a la infección por HEV (Ahmad et al. 2012), y se ha demostrado que es prescindible para la replicación viral *in vitro* (Emerson et al. 2006b).



**Figura 1. Organización genómica de HEV.** Se muestran los tres ORF. En el ORF1 se localizan: Metiltransferasa, dominio Y, la proteasa, región hipervariable rica en prolina (HVR), macrodominio X, Helicasa y la ARN polimerasa dependiente de ARN. El ORF 2 codifica la proteína de cápside y el ORF3 una fosfoproteína viral. Extraído de Ruggeri et al.2013. Cepa de referencia utilizada No. M73218

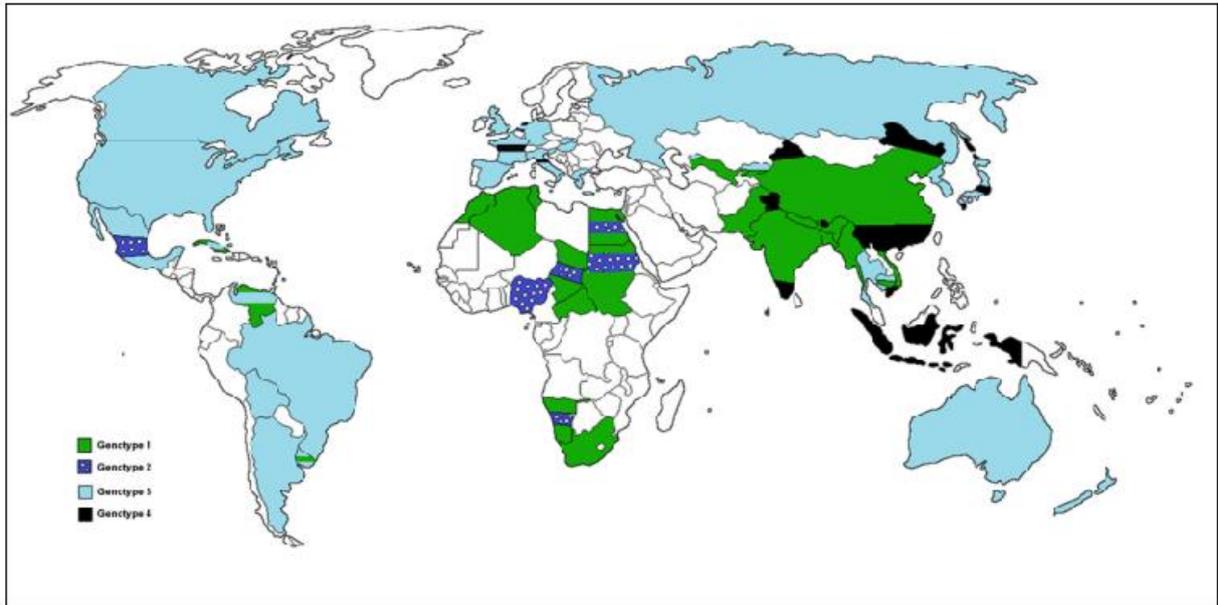
### 2.1.3. Epidemiología Molecular

El HEV se clasifica en cuatro genotipos: G1, G2, G3 y G4 (también descritos como I, II, III y IV) (Lu et al. 2006) (Fig. 3). El G1 es exclusivamente antroponótico y posee 5 subtipos (1a-1e). Agrupa cepas epidémicas y ha sido detectado tanto en Asia como en África, Cuba y Venezuela (Fig. 2) (Echevarria et al. 2013). Recientemente, se detectó en Uruguay el primer caso de HEV G1 en humanos (Mirazo et al. 2014b).

En cuanto al G2, presenta una diversidad baja con 2 subtipos (2a-b) y se considera al igual que el G1, antroponótico. Este genotipo se detectó en África y en México (Fig. 2), siendo la cepa mexicana la única con secuencia nucleotídica completa de este genotipo (Okamoto et al. 2007).

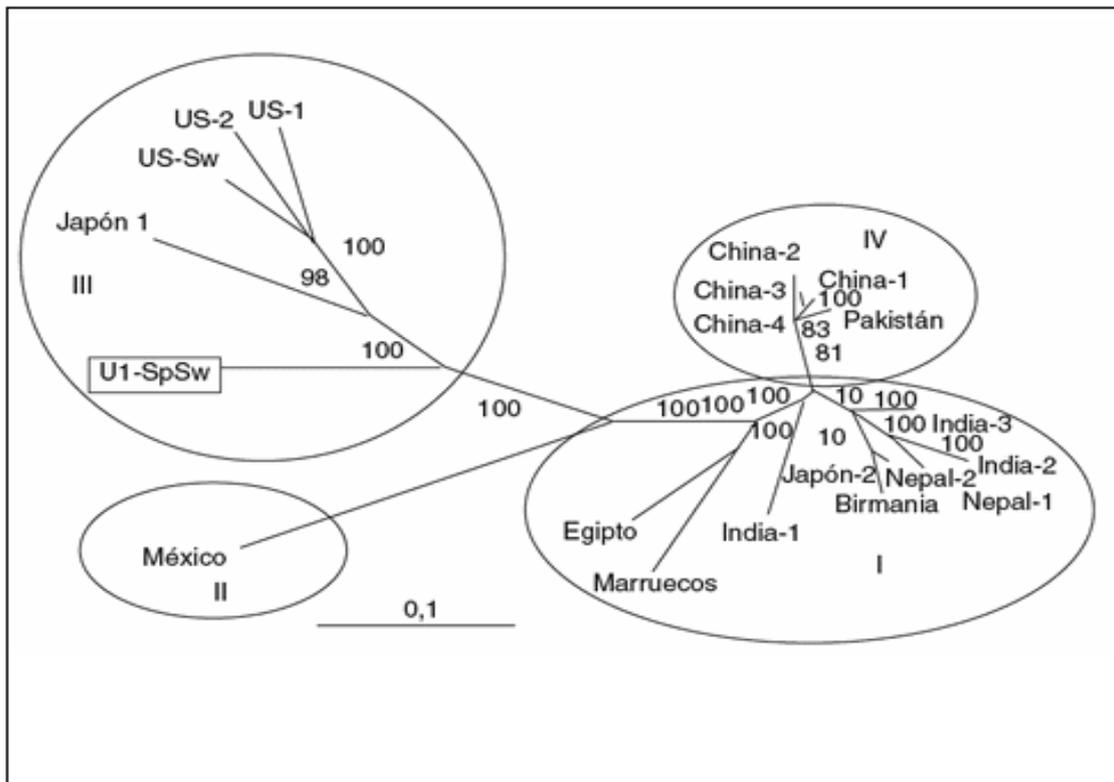
Tanto el G3 como el G4 son considerados no epidémicos, cuyas cepas son zoonóticas y con amplio rango de reservorios. El G3 posee elevada diversidad con 10 subtipos (3a-j) (Lu et al. 2006). Es de distribución mundial (Fig. 2) y se

ha detectado en países desarrollados asociado a casos esporádicos de hepatitis E. En cambio, el G4 posee menor diversidad que el G3, presentando 7 subtipos (4a-g) (Lu et al. 2006), y se distribuye actualmente en Asia y Europa Central (Figura 2).



**Figura 2:** Distribución actual geográfica de HEV y sus genotipos. Extraído de Mirazo et al. 2014a.

Como fue descrito anteriormente, la diversidad genética de Hepatitis E es grande, pero no existen hasta el momento evidencias de la existencia de más de un serotipo (Emerson and Purcell 2003).



**Figura 3:** Árbol filogenético de la familia *Hepeviridae* representando los cuatro genotipos (I, II, III, IV). Realizado en base a la secuencia completa del ORF2 del genoma viral. Extraído de Jiménez et al. 2007.

## 2.2. Modos de transmisión

Tanto el G1 como el G2 se asocian a grandes epidemias de Hepatitis E relacionadas con el consumo de agua contaminada y condiciones sanitarias desfavorables. En cambio, los casos esporádicos de infección por HEV en regiones no endémicas son menos entendidos (Purcell et al. 2008).

Existen varias vías de transmisión del HEV que a continuación serán detalladas, entre ellas: vía fecal-oral; vía parenteral; vía vertical; transmisión zoonótica; transmisión persona-persona (revisado por Mirazo et al. 2014).

### 2.2.1. Vía fecal-oral

La principal vía de transmisión del HEV es la fecal-oral, y desde hace más de 4 décadas han sido reportados numerosos casos de brotes epidémicos de

Hepatitis E en zonas endémicas (Vishwanathan, et al. 1957; Bile et al. 1994; Smith et al. 2001). Los brotes de Hepatitis E en zonas endémicas surgidos por esta vía se relacionan con la presencia de fuentes de agua contaminada en un contexto de condiciones sanitarias poco favorables, y están asociados al G1 y G2 en todos los casos. No obstante, se ha reportado la presencia de ARN viral en fuentes de agua pertenecientes a criaderos de suinos, y en aguas residuales en países industrializados (Clemente et al. 2003; Lopes dos Santos et al. 2011; Pina et al. 1998).

### **2.2.2. Zoonosis**

La Hepatitis E es la única entre las Hepatitis virales que posee animales reservorios, los cuales se presentan asintomáticos a diferencia de los humanos (Pavio et al. 2010).

Los primeros casos de Hepatitis E en cerdos fueron identificados en 1997 en el medio-oeste de Estados Unidos (Illinois), considerado hasta ese momento como país no endémico para HEV (Meng et al. 1997). En dicho estudio se analizó la seroprevalencia anti-HEV en cerdos de distintos criaderos comerciales utilizando una técnica estandarizada de ELISA (Tsarev et al. 1993a; Tsarev et al. 1993b). Posteriormente, análisis realizados por Meng et al. 1998 sugirieron por primera vez que los suinos serían potencialmente reservorio de HEV.

Actualmente, en estudios realizados en distintas regiones del mundo se ha detectado anticuerpos anti-HEV en numerosas especies animales, entre ellos, cerdos, jabalíes, ratas, perros, gatos, mangostas, vacas, ciervos, ovejas, cabras, conejos, caballos y especies aviarias. Además, se ha identificado ARN perteneciente a HEV de los G3 o 4 tanto en cerdos como en jabalíes, ciervos, mangostas y conejos (Pavio et al. 2010).

Cepas pertenecientes a los genotipos 3 y 4 han sido identificadas en cerdos y jabalíes, demostrando estar cercanamente emparentadas con cepas humanas, lo que sugiere una posible transmisión interespecies (Meng et al. 1997; Pavio et al. 2010). También se ha aportado evidencia acerca del posible riesgo que supone el contacto del humano con porcinos, ya que la prevalencia de

anticuerpos anti-HEV en personas que trabajan con dichos animales reservorios es en algunos estudios considerablemente mayor en comparación con el resto de la población (Galiana et al. 2008).

Existe evidencia de la transmisión de HEV a través del consumo de carne contaminada de animales reservorios (Meng et al. 2013; Yazaki et al. 2003), y además se identificó transmisión de HEV por consumo de productos cárnicos derivados de animales infectados (Colson et al. 2010).

Es por estos motivos que conocer las cepas zoonóticas así como también los reservorios animales que potencialmente pueden transmitir HEV, es de suma importancia para atacar la problemática que presume HEV en países no endémicos.

### **2.2.3. Transmisión persona-persona**

La transmisión de HEV persona a persona es baja y se considera que no tiene un papel preponderante durante la aparición de brotes epidémicos (Aggarwal et al 1992).

Existen reportes de transmisión de HEV intrafamiliar, pero se trata de casos poco frecuentes (Aggarwal et al. 1992; Somani et al. 2003). Sin embargo, es claro que ciertos hábitos como la falta de higiene pueden contribuir en la transmisión del virus de un humano a otro. A diferencia de esta ruta de transmisión de HEV, la vía vertical (de madre a hijo) si presenta índices mucho más elevados.

### **2.2.4. Transmisión parenteral**

La ruta parenteral no es la forma más frecuente de transmisión, y diversos investigadores han llevado adelante estudios acerca de la incidencia de HEV en donantes de sangre (Fischer et al. 2015; Juhl et al. 2014). Existe evidencia de contagio entre donantes y pacientes durante transfusiones de sangre en países de Europa y en Japón, considerados no endémicos para HEV (Colson et al.2007; Huzly et al. 2014; Matsubayashi et al. 2008). Los casos de

transmisión de HEV por vía parenteral han sido asociados todos a al G3 (Colson et al. 2007).

A pesar de no ser la principal vía de transmisión, la ruta parenteral supone un potencial riesgo para la población en países industrializados y en vías de desarrollo.

### **2.2.5. Transmisión vertical**

Como se describió anteriormente, los índices de transmisión de HEV madre a hijo son elevados (Khuroo et al, 1995). La hepatitis E en madres gestantes puede implicar una mortandad de hasta el 20% (Patra et al. 2007), asociada exclusivamente a cepas de G1 (Kar et al. 2008). Es así que la presencia de HEV puede suponer partos prematuros y un incremento en la mortalidad neonatal (Khuroo et al. 2003).

## **2.3. HEV en América Latina**

La primer cepa de HEV fue detectada por primera vez en América Latina en 1986 en México (Velazquez et al. 1990), y la primera evidencia serológica de HEV fue en Venezuela en el año 1994 (Pujol et al. 1994). Sin embargo, aún hoy sigue siendo limitada la información que existe acerca de la seroprevalencia y de la epidemiología molecular de HEV en esta región del mundo.

### **2.3.1. Seroepidemiología (suinos y humanos)**

El panorama actual de Hepatitis E en América Latina es complejo.

Venezuela es considerado hasta el momento como país no endémico por numerosos autores y las tasas de seroprevalencia varían entre, 1.6, 3.9 y 5.5% en diferentes poblaciones de ese país (Pujol et al. 1994).

En Chile han surgido estudios en los que se detectó anticuerpos específicos anti-HEV hasta en un 34% de las muestras de origen humano (Hurtado et al.

2005). En tanto, Bolivia presentó prevalencias de anticuerpos anti-HEV de hasta un 15% (León et al. 1999). Por su parte, estudios realizados en Cuba mostraron un total de 11 entre 209 muestras de sueros humanos positivas para anticuerpos específicos anti-HEV (prevalencia del 5.3%) (Quintana et al. 2005). En cuanto a países limítrofes a Uruguay, Argentina reportó datos de prevalencia específica de anticuerpos anti-HEV cercana al 2% (Rey et al. 1997) y estudios realizados recientemente mostraron valores de prevalencia específica cercana al 5% (Martinez et al. 2014). La seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV en Brasil varía notablemente entre distintos grupos de individuos en la población (Trinta et al. 2001); por ejemplo, del 2.3% al 11.8% entre grupos de donantes de sangre (Bortolierio et al. 2006).

Teniendo en cuenta que los suinos son los principales animales reservorios de HEV, es importante dar una breve introducción acerca de la situación actual de esta problemática en América Latina para poder analizar el potencial riesgo zoonótico que esto conlleva.

Han sido reportados suinos seropositivos en varios países de América Latina, entre ellos: Bolivia, Brasil, Argentina, Chile, Costa Rica, México (Echevarría et al. 2013). En Argentina, por ejemplo, la seroprevalencia tiene valores que oscilan del 4% al 58% (Munné et al. 2006b), en Brasil llega al 81% (Guimaraes et al. 2005) y en Chile al 9.5% (Reinhardt et al. 2003) variando notablemente entre distintas regiones del país.

Aún hoy, la información acerca de la seroprevalencia en suinos de América Latina es escasa, no existiendo datos de la situación seroepidemiológica de suinos de Uruguay.

### **2.3.2. Epidemiología molecular**

En Argentina, primer país de Sudamérica en reportar casos de hepatitis E no autóctonos (Shlauder et al. 2000), se han descrito y caracterizado cepas pertenecientes al G3 tanto en humanos como en cerdos, estando todas estrechamente relacionadas entre sí (Munné et al 2006a).

Durante el año 2010 se reportó el primer caso de Hepatitis E autóctono en Brasil, en un paciente que presuntamente había consumido carne de cerdo

aproximadamente un mes antes de contraer la enfermedad. Dicha cepa, perteneciente al G3, se demostró que estaba estrechamente relacionada con cepas suinas aisladas en Brasil (Lopes dos Santos et al. 2010). Cabe destacar que también ha sido reportado el riesgo de contaminación con HEV de aguas residuales de mataderos en Brasil, cuyas cepas se emparentan filogenéticamente con cepas suinas y con una cepa humana autóctona del mismo país. (Lopes dos Santos et al. 2011). Asimismo, a lo largo del tiempo se ha demostrado la similitud de cepas suinas con cepas humanas de las mismas regiones geográficas en Brasil (Jimenez de Oya et al.2007)

### **2.3.3. Epidemiología de HEV en Uruguay**

A fines de la década del 90 surgieron en Uruguay los primeros estudios sobre la seroprevalencia de HEV con resultados que arrojaron valores de 1.2% de seropositivos en una población de donadores de sangre y 2.8% de seropositivos en un total de 214 pacientes mayores de 40 años de una policlínica de Montevideo. Estos datos sugirieron por primera vez la circulación de HEV en el país (Cruells et al 1997).

Años más tarde, análisis moleculares basados en un sector de la región superpuesta ORF2-3 de 137pb mostraron nueve pacientes de Montevideo (periodo: noviembre 2009-junio 2010) con hepatitis aguda asociada a HEV. Se trató de casos autóctonos todos pertenecientes al G3 y filogenéticamente emparentados con aislados de origen Europeo, específicamente cepas suinas de origen Alemán y una cepa humana de origen Francés (Mirazo et al. 2011). El análisis de otras regiones del genoma de HEV demostraron que se trataba de aislados pertenecientes a los subtipos 3i y 3h (Mirazo et al. 2013). Dichos resultados sugirieron un origen zoonótico de la infección (Mirazo et al. 2013).

Recientemente se ha detectado en Uruguay el primer caso de Hepatitis E autóctono perteneciente al G1 asociado a cepas de origen Indio, emparentadas a su vez con aislados de Cuba y Venezuela. Cabe destacar que en estos países latinoamericanos en los cuales se reportó aislados de HEV asociados al Genotipo 1 son cepas autóctonas (Mirazo et al. 2014b).

Hasta el momento no existen resultados acerca de la epidemiología molecular de HEV en suinos domésticos y salvajes de Uruguay. Teniendo en cuenta que la transmisión zoonótica de HEV es una de las principales vías en países no endémicos y dados los datos aportados recientemente en Uruguay y la región, es importante realizar un relevamiento de HEV en estos animales reservorios y así poder analizar el posible riesgo zoonótico que representan.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General:**

Relevar en forma amplia en Uruguay la presencia de HEV en cerdos y jabalíes de distintas regiones del país así como también en productos cárnicos derivados, a través de la detección de ARN viral diseñando y poniendo a punto diferentes técnicas moleculares.

Asimismo, se plantea diseñar e implementar un sistema para aislar HEV suino en células de hepatocarcinoma humano.

### **3.2. Objetivos específicos:**

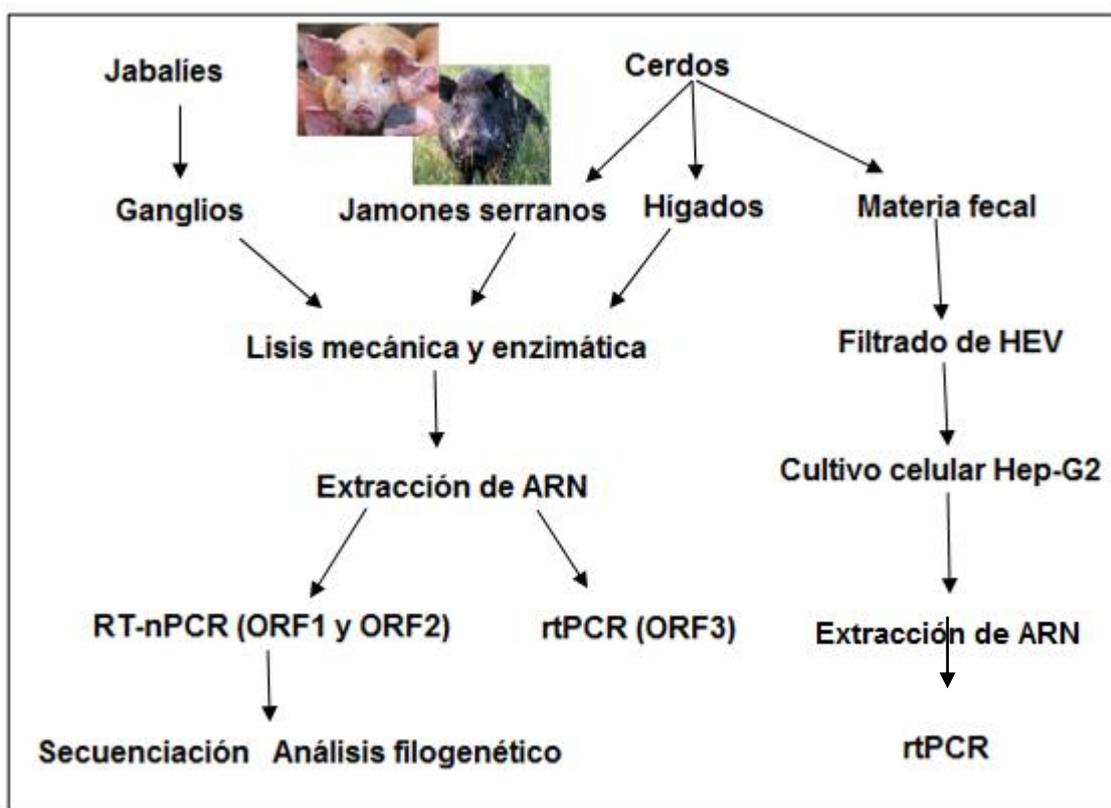
- Detectar HEV en suinos domésticos y salvajes, y en productos cárnicos derivados (jamones serranos comerciales) a través de RT-nPCR convencional, utilizando dos regiones distintas del genoma viral (ORF1 y ORF2).
- Secuenciar y realizar el correspondiente análisis filogenético de muestras positivas.
- Diseñar una metodología de rtPCR utilizando muestras previamente analizadas por RT-nPCR, con la finalidad de mejorar y optimizar la sensibilidad de las técnicas moleculares para detectar HEV en jabalíes, cerdos y productos cárnicos derivados y evaluar así el impacto zoonótico de la infección.

- Diseñar un método para aislar *in vitro* HEV utilizando la línea celular humana de carcinoma hepático, Hep-G2, a partir de muestras biológicas de animales infectados con HEV.

## 4. ESTRATEGIA DE TRABAJO

En Uruguay hasta el momento no existen estudios acerca de la prevalencia y frecuencia de HEV en suinos. Siendo estos animales los principales animales reservorios de HEV y considerando la situación actual de Uruguay y de la región, es de gran importancia realizar un amplio relevamiento de HEV en los distintos criaderos de Uruguay así como también en jabalíes salvajes y en productos cárnicos derivados. De esta forma, se podrá analizar el potencial riesgo zoonótico de la infección por HEV en Uruguay.

Para este relevamiento se propuso como objetivo la detección de HEV por RT-nPCR para dos regiones distintas del genoma viral y posteriormente diseñar una metodología de rtPCR para amplificar una región conservada del ORF3 viral con el fin de detectar HEV en menor tiempo y con mayor especificidad. Por último y a partir de una muestra de materia fecal de suino infectado con HEV se realizó el asilamiento viral en células Hep-G2 (Fig. 4)



**Figura 4:** Esquema de estrategia metodológica para la realización del presente trabajo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Detección de HEV por PCR convencional (RT-nPCR).

#### 5.1.1. Muestras analizadas

Para la detección de HEV por PCR convencional, a través de la amplificación de una región del ORF2 y del ORF1 viral, se analizaron 32 muestras de ganglios de jabalíes colectados en la Fiesta del Jabalí de Aiguá y Tala (localidades de los Departamento de Maldonado y Canelones, respectivamente) durante los años 2011 y 2012; 55 muestras de hígados de cerdos proporcionadas por cinco criaderos comerciales de distintas zonas del centro del Uruguay y del departamento de San José colectadas durante el año 2013. Además fueron analizadas 7 muestras de jamones serranos de distintas marcas, siendo dos de ellos originarios de Uruguay, 4 de origen Europeo y uno proveniente de Argentina (Tabla 1).

Tabla 1: Muestras analizadas por RT-nPCR y rtPCR.

Año de muestra	Procedencia	Animal	Tipo de muestra	Muestras analizadas
2011	Aiguá/Tala	Jabalíes	Ganglios	20
2012	Aiguá/Tala	Jabalíes	Ganglios	12
2013	Criadero 1	Cerdos	Hígados	17
2013	Criadero 2	Cerdos	Hígados	10
2013	Criadero 3	Cerdos	Hígados	7
2013	Criadero 4	Cerdos	Hígados	12
2013	Criadero 5	Cerdos	Hígados	9
2014	Europa/Uruguay/Argentina	Cerdos	Jamones	7
2011/2014	Tala/Paysandú/Aiguá	Jabalíes	Sueros	52

### **5.1.2. Obtención de ARN por Trizol®**

Cada una de las muestras fue sometida en primera instancia a lisis mecánica, para lo cual se cortaron secciones de un tamaño de 1 cm x 1 cm de cada una, que luego fueron trituradas. Este paso se realizó bajo cámara de flujo.

Posteriormente, para la lisis enzimática previa a la extracción del ARN, se utilizó buffer de lisis preparado con Proteinasa k 500 µg/mL (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos); 0.5M Tris pH 8; 0,45% Tween y agua hasta completar volumen de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las muestras fueron digeridas con el buffer de lisis en baño de agua a 56° durante 3 horas.

La extracción del ARN viral se realizó con Trizol® (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) de acuerdo a especificaciones del fabricante. Brevemente; se agregaron 350 µl del sobrenadante de las muestras con 800µl de Trizol®, se resuspendió y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se le añadió 160 µl de cloroformo (200 µl por ml de Trizol®), se procedió a centrifugar durante 15 minutos a 13400 revoluciones por minuto (rpm). Se recuperó la fase superior y se añadió 500 µl de isopropanol, luego de dejar 10 minutos en reposo a temperatura ambiente se procedió a centrifugar 10 minutos a 13400 rpm. Se retiró el sobrenadante y se añadió 1mL de etanol (EtOH) 75% al pellet que se mezcló utilizando vortex durante 5 segundos y se centrifugó durante 2 minutos a 8000 rpm. Luego de retirar el sobrenadante se secó ligeramente en estufa alrededor de 30 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet en 18 µl de agua H<sub>2</sub>O estéril (libre de ARNasa y ADNasa) y se conservó a -80°C hasta el momento de ser utilizadas.

### **5.1.3. Amplificación de región del ORF2 viral**

La detección de HEV se realizó mediante la amplificación de una región del ORF2 del genoma viral que codifica para la proteína de la cápside a partir del ARN extraído. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 2.

La retrotranscripción se realizó con la enzima RevertAid™ (Fermentas Life Sciences) según especificaciones de fabricante. La mezcla de la

retrotranscripción fue realizada en un volumen total de 10  $\mu$ L. Se incubaron a 70°C durante 5 minutos, 2.5  $\mu$ L del ARN extraído con 1  $\mu$ L 10 mM de primer 3157 y 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril. Posteriormente se le agregó a la mezcla anterior conteniendo 2  $\mu$ L de buffer de reacción 5X, 1  $\mu$ L de dNTP's 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril y 0,5  $\mu$ L de retrotranscriptasa. Se incubó la mezcla 1 hora a 42°C para la retrotranscripción y 15 minutos a 70°C para la inactivación de la enzima en termociclador.

Para la primer ronda de amplificación de la Nested PCR, realizada en un volumen final de 50  $\mu$ L, se colocó 5  $\mu$ L de ADNc, 5  $\mu$ L de buffer de reacción 10X, 4  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1  $\mu$ L de dNTP's 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ L de cada primer externo 3157 y 3156 (10 mM) (Tabla 2), 32,7  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril y 0,3  $\mu$ L de Taq™ DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences). El ciclado constó de un primer paso de 5 minutos de desnaturalización a 94°; 39 ciclos de: 45 segundos a 95°, 45 segundos a 44°, 1 minuto a 72°; y la extensión final durante 10 minutos a 72° (Meng et al. 1997). Para la segunda ronda de amplificación de la Nested PCR se utilizaron 5  $\mu$ L del producto del primer round de PCR utilizando en esta instancia los primers 3158 y 3159 con las mismas condiciones.

#### **5.1.4. Amplificación de región del ORF1 viral**

Además de la detección de HEV por amplificación de una región del ORF2 viral se procedió a la implementación de una metodología de RT-nPCR con el objetivo de amplificar una región del ORF1 del genoma viral (extremo 5´) que codifica para la proteína viral metiltransferasa, según protocolo previamente descrito (Tabla 2).

Para la retrotranscripción se utilizó, al igual que lo descrito para la amplificación de la región del ORF2 viral, la enzima RevertAid™ (Fermentas, Life Sciences. USA). La misma fue realizada en un volumen final de 10  $\mu$ L. Se colocaron 2,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril y 0,5  $\mu$ L del primer HEA1 10  $\mu$ M (Tabla 2) en un eppendorf de 0,5 mL, al que posteriormente le se añadió 2,5  $\mu$ L de ARN extraído, la mezcla fue incubada a 70°C durante 5 minutos y posteriormente se colocó en hielo

durante 5 minutos más. Posteriormente, se le agregó la Mix de a reacción y la mezcla se incubó 1 hora a 42°C y 15 minutos a 70°C en termociclador.

La Nested PCR se realizó en un volumen final de 50 µL. En la primer ronda de amplificación fueron colocados 5µL de ADN copia, 29,7 µL de H<sub>2</sub>O estéril, 5 µL de buffer de reacción 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 µM, 2,5 µL del primer HEA1 10 µM, 2,5 µL del primer HES1 10 µM (Tabla2), 1 µL de dNTP's y 0,3 µL de Taq<sup>TM</sup> DNA Polymerase (Fermentas, Life Sciences. USA). El ciclado corresponde a un primer paso de 5 minutos a 94°C de desnaturalización; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C; y un último paso de extensión durante 10 minutos a 72°C. La segunda ronda de amplificación se realizó con 5 µL de ADN perteneciente a la primer ronda de amplificación y los primers utilizados fueron HES2 y HEA2 (10 µM) (Tabla2).

**Tabla 2: Primers utilizados en el presente trabajo.**

Nombre	Secuencia (5'→3')	Polaridad	Posición	Producto	Referencia
HES 1	CTGGCATYACTACTGCYATTGAGC	Directo	51-77 (ORF1)	287 pb*	Wang et al.1999
HEA 1	CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC	Reverso	397-419 (ORF1)		
HES 2	CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG	Directo	50-70 (ORF1)		
HEA 2	GGCAGWRTACCARGCTGAACATC	Reverso	313-336 (ORF1)		
3156	AATTATGCCTCAGTACTCGGAGTTG	Directo	5687-5708 (ORF2)	348pb	Meng et al.1997
3157	CCCTTAGTCCTTGCTGACGCATTCTC	Reverso	6395-6417 (ORF2)		
3158	GTTAATGCTTCTGCATATCATGGCT	Directo	5972-5993 (ORF2)		
3159	AGCCGACGAAATCAATTCTGTC	Reverso	6298-6319 (ORF2)		
JVHEVF <sup>a</sup>	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	Directo	5243-5261 (ORF3)	105pb	Hill et al. 2006
JVHEVR <sup>a</sup>	AGGGGTTGGTTGGATGAA	Reverso	5330-5348 (ORF3)		

a. Primers para amplificación de ORF3 por rtPCR.

\* pb: pares de bases.

### **5.1.5. Electroforesis en gel de agarosa**

La visualización de las bandas de 348 pb para el caso de la amplificación del ORF2 del genoma viral y de 287pb para la amplificación parcial del ORF1 del genoma viral se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Para esto se colocaron 500 mg de Agarosa (Amresco, USA) en 50 mL de buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X y posteriormente se añadieron 2.5µL de Bromuro de Etidio (Invitrogen™ Life Technologies. USA). A las muestras se les agregó 2 µL de buffer de carga 6X (Fermentas, Life Technologies. USA). Además de las muestras y el control negativo se incluyó en la corrida electroforética al marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies, USA).

### **5.1.6. Secuenciación**

Luego de observar el fragmento con el tamaño indicado, se prosiguió con la purificación del mismo con el kit Nucleospin® (Macherey-Nagel Germany) según especificaciones del fabricante. Los fragmentos purificados fueron secuenciados por el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron analizados con el programa de alineamientos BLAST (*Basic Aligment Search Tool*) y cotejados con una base de datos.

### **5.1.7. Análisis Filogenético**

La secuencia obtenida fue alineada con secuencias de HEV pertenecientes a los cuatro genotipos virales de distintas regiones del mundo extraídas de GenBank con el paquete BioEdit v. 7.2.5. Posteriormente se realizó el análisis filogenético utilizando el software MEGA 5.1 mediante el método neighbour-joining para la construcción de los árboles, y el modelo de Kimura 2 parámetros como modelo de sustitución nucleotídica, con valores de bootstrap determinados cada 1000 réplicas y considerando significativo aquellos valores superiores a 70%.

## **5.2. Diseño de rtPCR**

Con el objetivo de obtener una metodología más rápida y sensible para la detección de HEV se detalla a continuación la puesta a punto de rtPCR (del inglés “Real Time PCR”, PCR en tiempo real).

### **5.2.1. Muestras analizadas**

Para la puesta a punto de la metodología de rtPCR, se utilizaron las muestras analizadas por RT-nPCR y que resultaron positivas mediante dicha metodología de detección. Además, se utilizaron 52 sueros de jabalíes que no fueron previamente analizados por RT-nPCR.

### **5.2.2. Amplificación de región de ORF3 viral**

La Real Time PCR fue diseñada para la amplificación de un fragmento altamente conservado del ORF3 de 105 nt de longitud según protocolo descrito por Jothikumar et al. (2006) con modificaciones.

Para la rtPCR se realizó en primera instancia la retrotranscripción en un volumen final de 10  $\mu$ L. Fueron colocados 2,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril, 0,5  $\mu$ L de cebadores hexaméricos randómicos (random primers) (Fermentas, Life Technologies. USA) y 2,5  $\mu$ L de ARN extraído previamente como se describe en la sección 5.1.2. La mezcla fue incubada durante 5 minutos a 70°C en termociclador, y seguidamente fue llevada a hielo durante otros 5 minutos. Posteriormente se añadió a la mezcla anterior los siguientes reactivos: 2  $\mu$ L de buffer de reacción 5X, 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril, 1  $\mu$ L de dNTP's (10  $\mu$ M) y 0.5  $\mu$ L de la retrotranscriptasa RevertAid™ M-MuLV (Fermentas Life Sciences). Seguidamente, la mezcla se incubó en termociclador 10 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C y 15 minutos a 70°C.

La rtPCR se realizó en un volumen final de 12,5  $\mu$ L donde se colocaron 6,25  $\mu$ L de Master Mix SYBR® Green (Bioline, Estados Unidos) 0.25  $\mu$ L de primer

JVHEVR (10  $\mu$ M), 0,25  $\mu$ L de primer JVHEVF (10  $\mu$ M) (Tabla 2), 2,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril y 3,0  $\mu$ L de ADNc. Utilizando el equipo ABI-7500 (Applied Biosystems), se realizó el ciclado que corresponde a 10 minutos a 95°C; 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C.

### **5.3. Aislamiento viral**

Obtener una línea celular propicia para el aislamiento de HEV es relevante para profundizar en el estudio de HEV *in vitro*. Hasta el momento no existe un cultivo celular que utilice células hepáticas que permita la replicación del HEV *in vitro* que sea fácil de aplicar. Es por eso, que con el objetivo de implementar un sistema de cultivo celular y de analizar la infectividad de HEV de origen suino en células de hepatocarcinoma humano, se utilizó la línea celular Hep-G2 para el aislamiento.

#### **5.3.1 Células**

La línea celular continua utilizada para el aislamiento de HEV fue Hep-G2 (ATCC HB80-65) de carcinoma hepatocelular humano.

#### **5.3.2. Virus**

La muestra utilizada para la infección de las células Hep-G2 provino de materia fecal de cerdo que fue colectada en un criadero de suinos de Uruguay. La cual fue previamente identificada como positiva para HEV y genéticamente caracterizada como perteneciente al G3. La muestra de materia fecal se mantuvo a -80° C hasta el momento de ser utilizadas para la infección de las células Hep-G2.

### **5.3.3. Inoculación y propagación de HEV en células Hep-G2**

Previo a la infección de las células Hep-G2, la muestra de materia fecal suina se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 10%, se mezcló mediante vortex durante 10 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 8000 rpm. Posteriormente se procedió al filtrado de la muestra utilizando un microfiltro con un tamaño de poro de 0.22  $\mu$ M (Millex-GV; Millipore Corp.).

El crecimiento de las células Hep-G2 se realizó en medio Dulbecco-Eagle (DMEM) (Invitrogen, Life Technologies); con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO Life Technologies) y antibióticos (ATB) (Invitrogen Inc.) estreptomina a concentración final 100 $\mu$ g/mL y penicilina a concentración final de 100 U/mL. Las células se incubaron en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.

Una vez que las monocapas celulares tuvieron una confluencia de alrededor del 70% en placa de doce pocillos, se procedió a la inoculación de las mismas con 200  $\mu$ L del filtrado de la muestra diluida en PBS y se incubó durante una hora en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Pasadas 24 horas de la inoculación las monocapas fueron lavadas con PBS y se les agregó medio de mantenimiento DMEM. Al tercer día post infección las células fueron replicadas, para ese procedimiento se lavó las monocapas con PBS, se tripsinizaron con 0.2 mL de Tripsina 0.25% (Invitrogen, Life Technologies). Luego de 5 minutos se realizó la dilución 1:4 en medio de crecimiento fresco y 0.2 mL fueron pasados a una nueva placa de doce pocillos. La replicación de las células se realizó cada 2 días mientras las células en mantenían viables, esto era controlado bajo microscopio invertido.

Se realizaron 12 pasajes seriados del cultivo celular infectado, 0.3 mL de las células infectadas a partir del tercer pasaje fueron conservadas a -80°C hasta ser utilizadas para la detección de HEV por rtPCR.

### **5.3.4. Obtención por Trizol<sup>®</sup> de ARN viral a partir de cultivo celular**

A partir del cultivo de células Hep-G2 infectadas con HEV G3 se extrajo el ARN viral de 9 de los 12 pasajes seriados. El ARN se extrajo con Trizol<sup>®</sup> según indicaciones del fabricante como se detalla en el punto 5.1.2. La rtPCR para la

identificación de la infección productiva se implementó como se indica en el punto 5.2.2.

## **6. RESULTADOS**

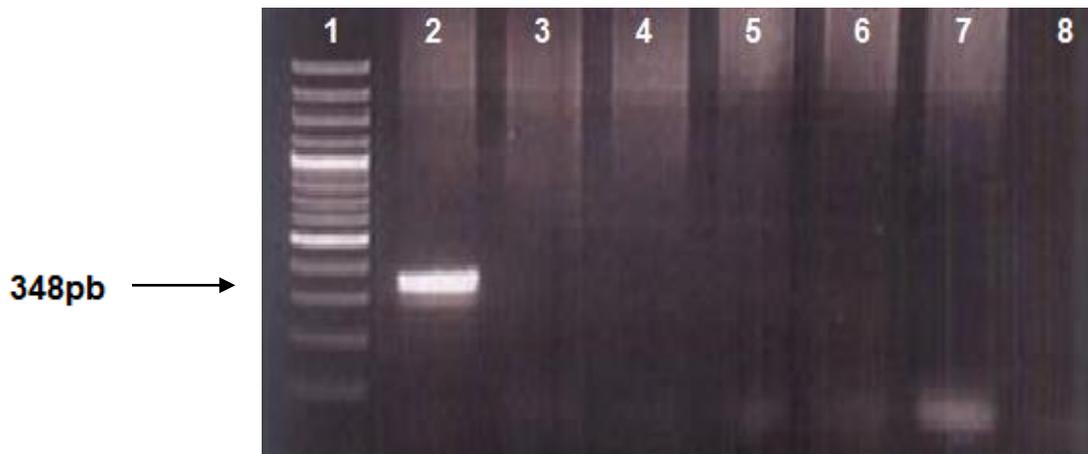
Este trabajo aporta por primera vez en Uruguay datos acerca de la situación epidemiológica de HEV en cerdos y jabalíes del país, a través de un amplio relevamiento que incluyó también el análisis molecular de productos cárnicos derivados.

### **6.1. Detección de HEV por RT-nPCR convencional**

En la tabla 1 se muestran todos los órganos analizados así como su procedencia y los años de colecta. Tal como se describe en la sección de materiales y métodos, fueron analizadas por RT-nPCR cada una de las muestras de órganos de cerdos y jabalíes de distintas zonas del país. Asimismo, fueron analizadas muestras de jamones serranos manufacturados en Italia, Alemania, España, Argentina y Uruguay.

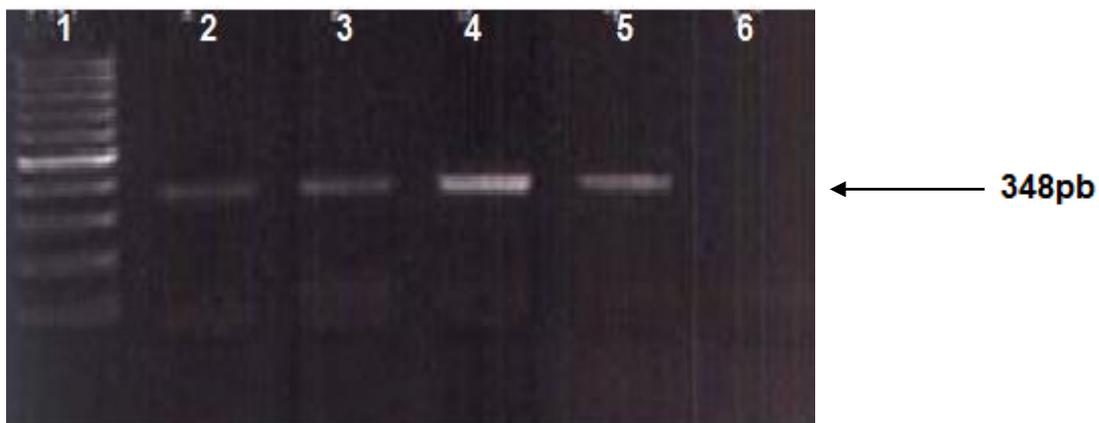
#### **6.1.1. Amplificación de región del ORF2 viral**

Fue posible detectar a través de la amplificación por RT-nPCR de una región del ORF2 del genoma viral, la presencia de ARN viral en 3 de las 94 muestras analizadas (Fig. 5 y Fig. 6). La banda de 348 pb se logró visualizar mediante gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En la figura 5 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa para 6 muestras del criadero 4 (Tabla 1), con la inclusión de un control negativo.



**Figura 5:** Se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para seis muestras pertenecientes a extracciones de órganos suinos del criadero 4. En el primer carril, se observa el marcador de peso molecular de 100pb (GeneRuler™ Fermentas Life Sciences). En el segundo carril, se visualiza la banda de unos 348 pb para la muestra 1. Carril 8, control negativo.

En la Figura 6 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa para las diluciones seriadas (1/5 y 1/10) de 2 muestras pertenecientes al criadero 2 (Tabla 1).



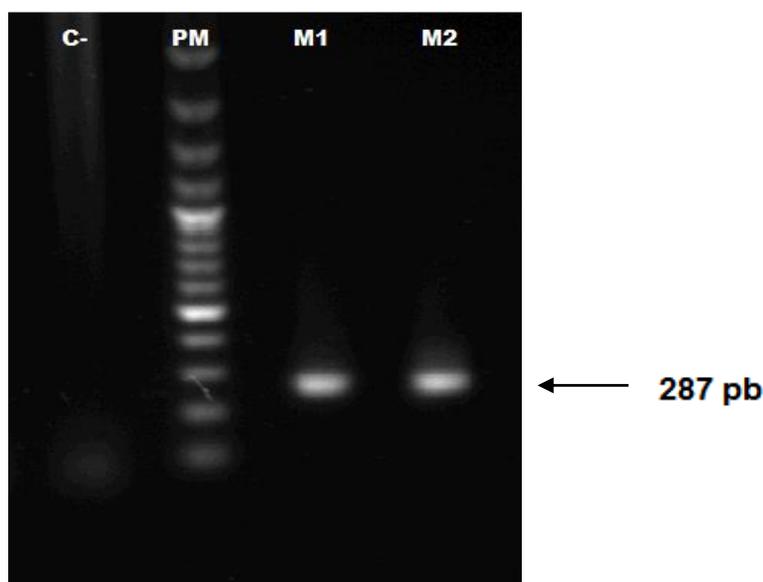
**Figura 6:** Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, de muestras pertenecientes al criadero 2. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler™ Fermentas Life Sciences). Carril 2: dilución 1/5 para muestra 1. Carril 3: dilución 1/10 de muestra1. Carril 4: dilución 1/5 de muestra 2. Carril 5: dilución 1/10 de muestra 2. Carril 6: control negativo.

Además de estos resultados es importante resaltar que no se obtuvieron muestras positivas para HEV pertenecientes a los distintos jamones serranos analizados por RT-nPCR.

### 6.1.2. Amplificación de región del ORF1 viral

Además de la amplificación de la región del ORF2, se procedió a la amplificación de una región del ORF1 (extremo 5') (descrito en materiales y métodos) de las muestras positivas por amplificación de la región del ORF2 del genoma viral. Fue posible amplificar dicha región de 287 pb en las muestras pertenecientes al criadero 2 (Fig. 7).

Sin embargo, no se logró esta amplificación para la muestra 1 perteneciente al criadero 4, cuya amplificación del ORF2 se observa en la Figura 5.



**Figura 7:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Amplificación de una región ORF1 (extremo 5') que codifica para metiltransferasa. C-: control negativo. PM: marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler™ Fermentas Life Sciences). M1: banda de 287 pb para muestra 1. M2: banda de 287 pb para muestra 2.

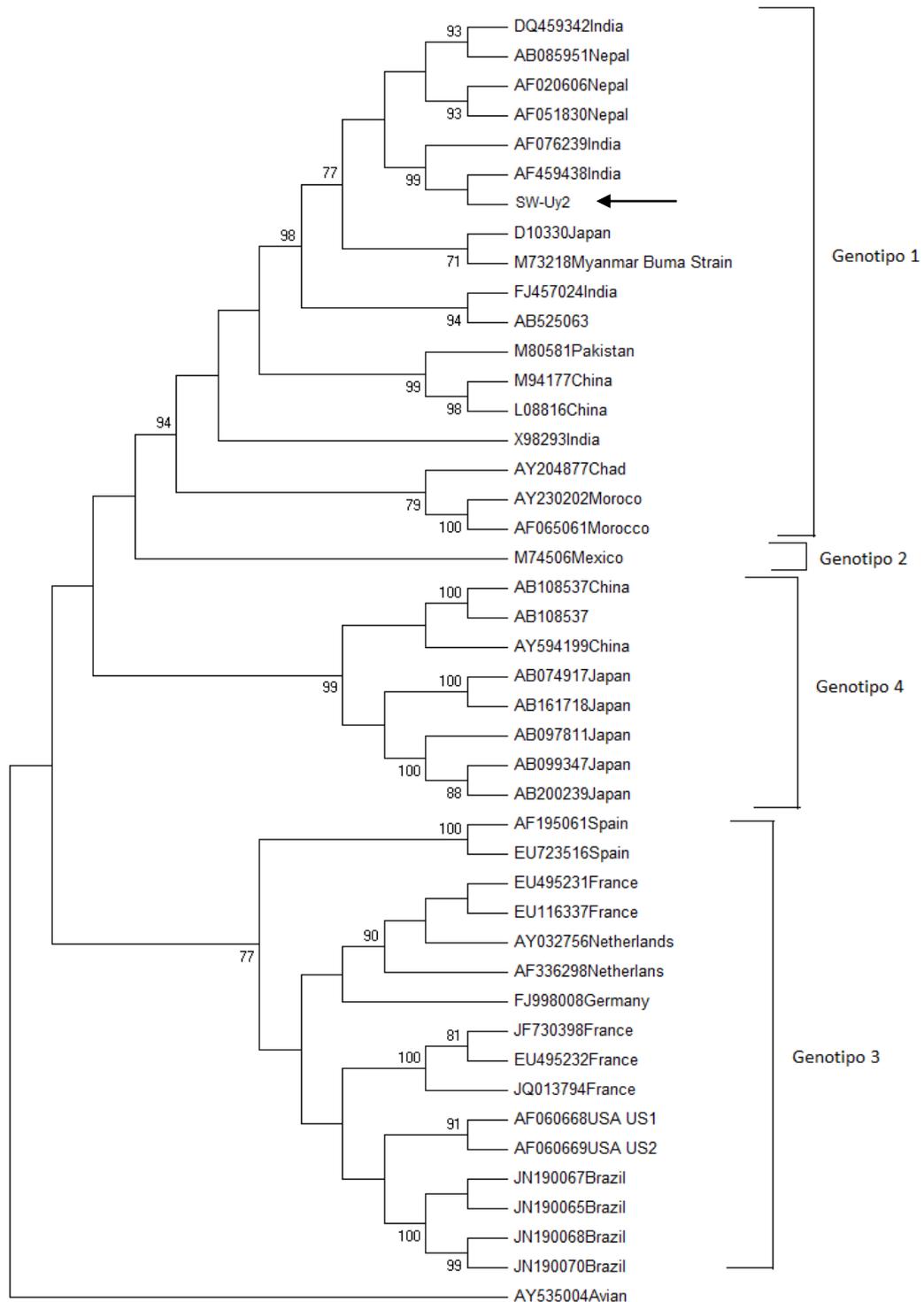
Lamentablemente, no se obtuvieron secuencias para las muestras M1 y M2 de calidad suficiente, es por tal motivo que no se pudo realizar la genotipificación y el correspondiente análisis filogenético. Esto puede ser debido a la baja concentración de ADN que se obtuvo en el producto de PCR.

## **6.2. Análisis filogenético**

La determinación del genotipo viral de la muestra positiva perteneciente al criadero número 4, se realizó mediante la secuenciación y análisis de las secuencias en ambos sentidos (directo y reverso), obtenidas del fragmento amplificado de la región perteneciente al ORF2 del genoma viral. Cabe aclarar que la muestra del criadero 4 fue de la única que se pudo obtener secuencia de calidad apropiada.

A través del análisis de las secuencias obtenidas por medio del programa de alineamiento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) se pudo determinar que la muestra pertenece al G1. De este análisis bioinformático se determinó una identidad nucleotídica cercana al 99% con cepas de origen indio.

Luego de obtener las secuencias y de la determinación del genotipo, se procedió a la realización del árbol filogenético construido en base a 341 pb por el método de neighbour-joining (Fig. 8). Se puede observar que la cepa uruguaya forma un cluster con cepas indias con un alto soporte estadístico (9% de Bootstrap). El análisis incluye cepas pertenecientes a los cuatro genotipos de HEV de distintas regiones del mundo. En el árbol filogenético sólo se muestran valores de bootstrap mayores a 70%.

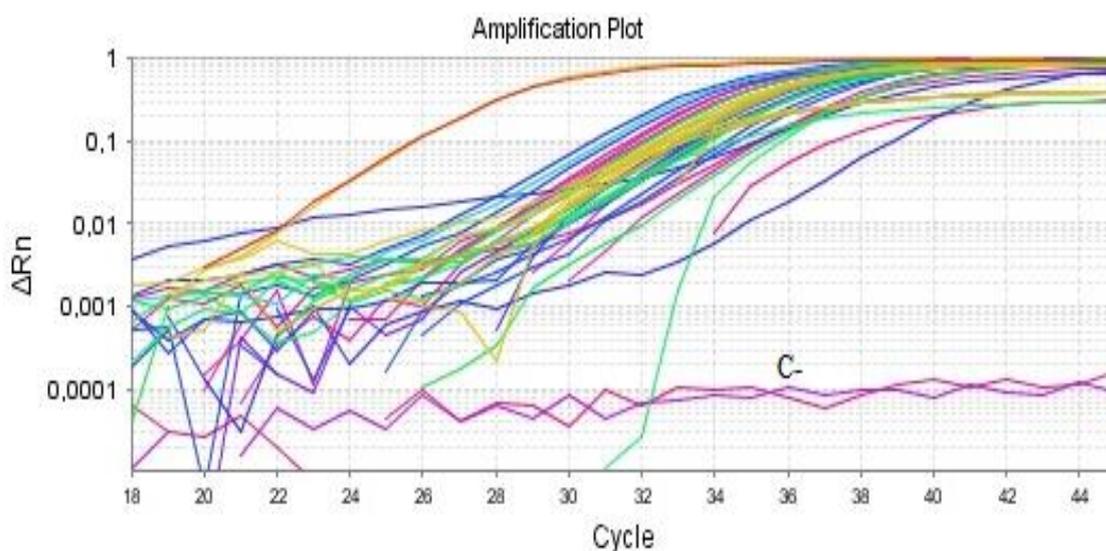


**Figura 8:** Análisis filogenético de la muestra positiva para HEV perteneciente al criadero 4. Árbol construido en base a 341 pb de una región del ORF2 viral que codifica para la cápside, realizado por el método de neighbor-joining, y el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros. La cepa uruguaya es señalada con flecha (SW-Uy2). Se muestran solamente valores de bootstrap superiores a 70%.

### 6.3. rtPCR con muestras suinas

Para amplificar un fragmento altamente conservado de aproximadamente 105 pb del ORF3, fue diseñada una metodología de rtPCR con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la detección de HEV. Como se detalló en materiales y métodos, esta técnica fue realizada según Jothikumar et al. 2006 con modificaciones. Por rtPCR se analizaron las muestras que habían resultado positivas anteriormente por RT-nPCR y además fueron analizados 52 sueros de jabalíes de las localidades de Tala, Paysandú y Aiguá (Tabla 1). De estos 52 sueros 2 resultaron positivos por rtPCR, ambos pertenecientes al departamento de Paysandú.

En la Figura 9 se muestran las curvas de fluorescencia generadas para todas las muestras analizadas por rtPCR. Se obtuvieron los valores de Ct (Theshoold cycle o Ciclo crítico) siendo considerados positivos, según Jothikumar et al. 2006, los valores  $\leq 30$ .



**Figura 9:** Detección de HEV por Real Time PCR con tecnología SYBR® GREEN, según Jothikumar et al. 2006 con modificaciones. C- control negativo.

## **6.4. Aislamiento viral en células Hep-G2**

Dado que no existe hasta el momento un sistema celular establecido de células hepáticas para el aislamiento de HEV *in vitro*, los resultados sobre la biología viral son aún escasos. Este estudio muestra una primera aproximación del aislamiento de HEV suino en la línea celular de hepatocarcinoma humano (Hep-G2).

### **6.4.1. Análisis de aislamiento de HEV por rtPCR**

No se observó efecto citopático durante los 12 pasajes en las células Hep-G2 infectadas con la suspensión de materia fecal de cerdo infectado con HEV.

Para demostrar la presencia de ARN viral se realizó PCR en tiempo real diseñada para amplificar un fragmento altamente conservado del ORF3 del genoma viral de 105 pb a cada una de las muestras obtenidas de los pasajes del 3 al 12.

Debido a que no se obtuvo una infección sostenida durante los 12 pasajes seriados en las células Hep-G2, en la figura 10A se muestra las curvas generadas para las muestras A y B con sus réplicas poseen un valor de Ct (Ciclo crítico/Threshold cycle) cercano a 30, precisamente 26.9 para el pasaje número 9 de cultivo celular y 32.4 para pasaje número 5 de cultivo celular (Figura 10B), valores considerados como positivos para la detección de HEV por rtPCR (Jothikumar et al. 2006).



Muestra	Ct (ΔRn)
Muestra A	26.9
Muestra A réplica	26.9
Muestra B	32.2
Muestra B réplica	32.4
Control negativo	No Ct

(A)

(B)

**Figura 10:** Detección de ARN viral proveniente de infección *in vitro* de células Hep-G2 con HEV genotipo 3 de cerdo. (A): Muestra A y su respectiva réplica: corresponde al pasaje 9 del cultivo celular. Muestra B y su respectiva réplica: corresponde al pasaje 5 del cultivo celular. Blanco: control negativo. (B): Tabla de valores de Ct para las muestras A y B.

## 7. DISCUSIÓN

El virus de la hepatitis E, único miembro de la familia *Hepeviridae*, se transmite principalmente por vía fecal-oral. La infección por este virus presenta una mortalidad que llega hasta el 4 % en la población general y puede alcanzar al 20% en pacientes embarazadas (revisado por Mirazo et al. 2014). Es la única hepatitis viral zoonótica con animales no humanos reservorios, siendo los suinos domésticos y salvajes los principales (Pavio et al. 2010). Esto supone riesgo sanitario por transmisión zoonótica para la población en países no endémicos y en vías de desarrollo como lo es Uruguay.

Este trabajo representa el primer estudio hecho en Uruguay en el que se realiza un amplio relevamiento del estatus del Virus de la Hepatitis E en cerdos, jabalíes y productos cárnicos derivados. En este sentido fueron analizadas 94 muestras de distintas regiones del país por PCR convencional, además de 52 sueros de jabalíes analizados por rtPCR.

A partir de este trabajo se detectó por primera vez en América un caso positivo de infección por HEV asociado al G1 en cerdos, a través de la amplificación de una región del ORF2 del genoma viral en una muestra de hígado de cerdo perteneciente a un criadero comercial de Uruguay. Cabe aclarar que tanto el G1 como el G2 son considerados en la literatura como genotipos exclusivamente humanos o antroponóticos (Pavio et al. 2010). La transmisión interespecies está ampliamente documentada para los genotipos 3 y 4, no así para los genotipos 1 y 2. A nivel mundial existe, hasta el momento, un único antecedente documentado de HEV G1 en un cerdo de Camboya. En ese estudio se analizó un total de 181 muestras de cerdos con una edad de entre 2 y 6 semanas, resultando 22 positivas (21 de ellas pertenecientes al G3 y una perteneciente al G1) (Caron et al. 2006).

Los resultados del presente trabajo, sumado al antecedente de HEV G1 en suino de Camboya, sugieren que este genotipo no está limitado estrictamente a humanos como se cree sino que también infecta suinos. Estos resultados indicarían un cambio importante en cuanto en la epidemiología de HEV, sugiriendo que el G1 no sólo es antroponótico sino que también infecta otros animales.

Asimismo, la cepa Uruguay SW-Uy2 se encuentra filogenéticamente emparentada con cepas de origen Indio con un 99 % de similitud a nivel nucleotídico. Esto es interesante, dado que durante el año 2014 se detectó por primera vez en Uruguay un caso de infección por HEV G1 en una paciente de 26 años. Se trató de un caso autóctono y filogenéticamente emparentado con cepas de origen Indio, Venezolano y Cubano (Mirazo et al. 2014b). Desafortunadamente, en este trabajo no se logró comparar la cepa humana uruguaya con la cepa suina, ambas pertenecientes al G1. Esto se debe a que la longitud de las secuencias analizadas no son coincidentes como para realizar el análisis filogenético comparativo correspondiente.

Cabe resaltar, que la amplificación tanto de regiones del ORF1 como del ORF2 viral en distintas muestras de suinos fue exitoso, y, por tanto se puso a punto la metodología de Nested RT-PCR para la detección de HEV en suinos en Uruguay. Sin embargo, no se logró amplificar una región del ORF1 viral que codifica para la metiltransferasa de HEV para la muestra SW-Uy2. La detección de HEV es sumamente compleja y es abundante la evidencia referida a la extrema variación en la sensibilidad de las diferentes metodologías moleculares para la detección de HEV (Baylis et al. 2011; Abravanel et al. 2011).

Otro resultado a destacar es la no detección de ARN viral en muestras de jamones serranos de origen Europeo y nacional. En Uruguay los aislados humanos de Hepatitis E se relacionan filogenéticamente con aislados suinos de origen Europeo (Mirazo et al. 2011; Mirazo et al. 2013). Este análisis preliminar en jamones serranos es una primera aproximación a la dilucidación del origen de la infección en los casos humanos de hepatitis E detectados previamente.

La información acerca de la circulación de HEV en América Latina es aún escasa. Sin embargo, los resultados realizados en Uruguay durante los últimos años arrojan a la luz datos sumamente interesantes en cuanto a las cepas de HEV circulantes en el país. En este trabajo, de las 87 muestras de suinos analizadas por RT-nPCR, 3 muestras resultaron positivas por dicha metodología, y 2 muestras de sueros de jabalíes (departamento de Paysandú) de 52 analizadas, resultaron positivas a través del análisis por rtPCR. Es decir que un 3.6% de todas las muestras analizadas resultaron positivas para HEV.

Estos datos sugieren una baja frecuencia de circulación de HEV entre los suinos del Uruguay.

A su vez, estos resultados revisten importancia desde el punto de vista zoonótico. En países como España, Italia, Alemania. (Kaci et al. 2008; Martelli et al. 2008; Deus et al. 2008), han sido reportados jabalíes infectados con cepas HEV G3 y 4 estrechamente relacionadas con aislados humanos de regiones geográficas cercanas. (Li et al 2005; Kaci et al. 2008). Estos datos sugieren una posible transmisión interespecie (Pavio et al. 2010). En Uruguay, el jabalí salvaje (*Sus Crofa*) es considerado plaga nacional desde el año 1982 a través del Decreto N°463 donde se autorizó la libre caza, comercialización y transporte. Es por tal motivo y dada su amplia distribución, que la cercanía que presentan los jabalíes con los humanos en Uruguay a lo largo de todo el territorio, podría suponer un riesgo sanitario para la población debido a que la carne de jabalí es consumida, incluso en forma de embutidos. Asimismo, el contacto directo con estos animales durante la caza deportiva, representa un cierto riesgo de infección (Lombardi et al. 2015).

Otro punto a destacar de este trabajo es la puesta a punto una metodología de rtPCR como método rápido y sensible para la detección de HEV. Existe evidencia acerca de la mayor sensibilidad de métodos basados en esta tecnología en comparación con distintas RT-nPCR aplicadas para la detección viral (Jothikumar et al. 2006; Gyarmati et al. 2007). En este caso y como se describe en la sección de resultados, 2 de las muestras de jabalíes que habían resultado negativas por PCR convencional mostraron presencia de HEV a través del análisis por rtPCR.

La infección productiva *in vitro* de las células de hepatocarcinoma humano Hep-G2 con HEV G3 proveniente de materia fecal suina, fue corroborada a través de la amplificación de una región conservada del ORF3 del genoma viral por rtPCR. Este trabajo comprueba por primera vez la infección positiva de HEV suino en células humanas Hep-G2. Pero no menos importante es la posibilidad que se abre camino en cuanto al estudio de la biología viral de HEV *in vitro*. Si bien existen otros sistemas de cultivos celulares para replicar el virus, ellos no se basan en células de origen hepático (Takahashi et al.2010). Sin embargo, queda como perspectiva futura de este trabajo optimizar este

sistema ya que se obtuvo infección productiva (comprobado por rtPCR) en los pasajes 5 y 9 y no se logró una infección sostenida durante los 12 pasajes.

## 8. CONCLUSIONES

- ❖ Se pusieron a punto sistemas de detección molecular por RT-nPCR que permiten la amplificación parcial de dos regiones distintas del genoma viral de HEV en muestras de suinos. Estas corresponden a la región ORF1 (extremo 5´) que codifica la metiltransferasa viral y una región de ORF2 que codifica la cápside viral.
- ❖ Se implementó por primera vez en Uruguay un amplio relevamiento de HEV en reservorios que incluyó cerdos y jabalíes de distintas regiones del país.
- ❖ Se detectó por primera vez en América una cepa de HEV G1 en una muestra de hígado de cerdo de un criadero comercial de Uruguay.
- ❖ No se detectó HEV en muestras de jamones serranos manufacturados en España, Italia, Alemania, Argentina y Uruguay que fueron analizadas por RT-nPCR.
- ❖ A partir de muestras analizadas preliminarmente por RT-nPCR se logró poner a punto una metodología de rtPCR (descrita por Jothikumar et al. 2006, con modificaciones) basada en técnica con tecnología SYBR® Green diseñada para amplificar una región del ORF3 del genoma viral de 105pb.
- ❖ Utilizando la línea celular Hep-G2 se logró aislar, a partir de muestras fecales suinas, HEV G3. La verificación de la infección productiva se realizó a través de rtPCR. Sin embargo, diversos aspectos metodológicos esta técnica aún deben ser optimizados.

## 9. PERSPECTIVAS

Para poder evaluar el real impacto zoonótico que tiene el virus de la Hepatitis E en porcinos es fundamental comparar molecularmente las cepas de origen suino con aislados de HEV humanos (Mirazo et al. 2013; Mirazo et al. 2014). Por tal motivo, sería importante realizar un análisis exhaustivo de las cepas suinas, tratando de amplificar otras regiones del genoma viral que puedan permitir subtipificar las cepas suinas de Uruguay y realizar además un análisis filogenético comparativo entre las cepas suinas y los aislados de HEV humanos descritos en Mirazo et al. 2013.

Debido a que el aislado suino G1 identificado durante el presente trabajo es un caso con un único antecedente a nivel mundial, sería interesante poder ahondar en la investigación analizando la infectividad del G1 en cerdos, a través de una infección experimental *in vivo*.

Sería importante poder optimizar el modelo celular Hep-G2 utilizado para aislamiento celular *in vitro* en este trabajo. Desarrollar un modelo más realista para el aislamiento de HEV en cultivos celulares es imperioso y redundará en una mejor comprensión de su biología viral, incluyendo aspectos del ciclo replicativo.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Abravanel, F., Sandres-Saune, K., Sebastien Lhomme, S., Martine Dubois, M., Jean-Michel Mansuy, J., M., Jalzopet, J. (2011). Genotype 3 Diversity and Quantification of Hepatitis E Virus RNA. *J. of Clin. Microbiol.* 50(3): 897–902.

Aggarwal, R., Naik, S.R. (1992). Hepatitis E: does person-to-person spread occur? *Indian J. Gastroenterol.* 11: 109–112.

Ahmad I, Holla R. P., Jameel S. (2012) Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis.* 33(1): 3–14.

Bortolierio, A.L., Bonametti, A. M., Matsuo, T., Reiche, E. M., (2006). Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Paraná , Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 48(2): 87-92.

Baylis, S., A., Hanschmann, K., Blumel, J., Nußbling C., (2011) Standardization of Hepatitis E Virus (HEV) Nucleic Acid Amplification Technique-Based Assays: an Initial Study To Evaluate a Panel of HEV Strains and Investigate Laboratory Performance. *J. of Clin. Microbiol.* 49 (4): 1234-1239.

Bradley, D. W., Andjaparidze, A., Cook, E. H., JR., et al. (1988). Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J. Gen. Virol.* 69: 731-738.

Caron M, Enouf V, Than S C, Dellamonica L, Buisson Y, and Nicand E. (2006) Identification of Genotype 1 Hepatitis E Virus in Samples from Swine in Cambodia. *J. Clin. Microbiol.* 44 (9): 3440-3442.

Clemente P., Pina S., Buti M. et al. (2003). Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9; 448–454.

Colson P., Borentain P., Queyriaux B. et al. (2010). Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* 202(6): 825-834

Colson, P., Coze, C., Gallian, P., Henry, M., De Micco, P., Tamalet, C. (2007). Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 648–649

Cruells, M.R., Mescia, G., Gaibisso, R., Ramírez, M., Gutiérrez, M., Kohen, S. (1997). Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay. *Gastroenterol. Hepatol.* 20(6): 295–298.

Deus N., Mateu E., Peralta B., Vidal D., Pina S., Ruiz F., Allepuz A., Marti M., Gorta, C., Segale, J. (2008). Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet. Microbiol.* 129: 163-170.

Echevarría J. M., González J. E., Lewis-Ximenez LL., et al. (2013). Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. *J Med Virol.* 85(6): 1037–1045.

Emerson SU., Nguyen H., Torian U., Purcell RH. (2006b) ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J. Virol.* 80: 10457–10464.

Emerson SU., Purcell RH. Hepatitis E virus. In: Knipe, DM.; Howley, PM.; Griffin, DE.; Lamb, RA.; Martin, MA.; Roizman, B.; Straus, SE., editors. (2006a) *Fields Virology*. 5. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia: p. 3047-3058.

Emerson S.U., Purcell R.H., (2003). Hepatitis E virus. Reviews in Medical Virology. *Med. Virol.* 13: 145–154.

Emerson SU., Nguyen H., Torian U., Burke D., Engle R., Purcell RH. (2010) Release of genotype 1 hepatitis E virus from cultured hepatoma and polarized intestinal cells depends on open Reading frame 3 protein and requires an intact PXXP motif. *J. Virol.* 84 (18): 9059-9069.

Fauquet CM., Mayo MA., Maniloff J., Desselberger U., Ball LA., editors. (2005) Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London. *Elsevier Academic Press*. Pp: 1024-1028.

Fischer C., Hofman M., Danzer M., Hofer K., Kaar J., Gabriel C., Meng X. J. (2015). Seroprevalence and Incidence of hepatitis E in Blood Donors in Upper Austria. *PloS One*. 10(3): e0119576.

Galiana C., Fernández-Barredo S., García A., Gómez M., T., Pérez-Gracia M., T. (2008) Short Report: Occupational Exposure to Hepatitis E Virus (HEV) in Swine Workers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78(6): 1012–1015

Graff J., Zhou YH., Torian U., Nguyen H., St Claire M., Yu C., Purcell RH., Emerson SU. (2008) Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J Virol*. 82: 1185–1194.

Gupta D., Smeatana H. (1957). The histopathology of viral hepatitis as seen in the Delhi epidemic (1955-1956) *Indian. J. Med. Res.* 45: 101-13.

Gyarmati P., Mohammed N., Norder H., Blomberg J., Belak S., Wid F. (2007) Universal detection of hepatitis E virus by two real time PCR assays: and Primer. Probe Energy Transfer. *J. of Virol. Meth.* 146: 226-2335.

Hurtado C, Muñoz G, Brahm J. (2005) Anti-VHE IgM en casos de infección por el virus de hepatitis E. *Rev Med Chile*. 133: 645-7.

Jiménez de Oya, N., Romero, E. E., Blázquez, A., B., Saiz, j. C. (2007). El virus de la hepatitis E: implicaciones zoonóticas. *Gastroenerol. Hepatol.* 30(7): 408-418.

Jothikumar N., Cromeans T. L., Robertson BH, Meng X. J., Hill V. R. (2006). A broadly reactive one-step realtime RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Meth.* 131(1): 65–71.

Juhl D., Baylis S. A., Bumel J., Gorg S., Hennig H. (2014). Seroprevalence and incidence of hepatitis E virus in German Blood donors. *Transf.* 54(1): 49-56.

Kaci S., Nockler K., Johne R. (2008) Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet. Microbiol.* 128:380–385.

Kar P., Jilani N., Husain S. A., Pasha S. T., Anand R., Rai A., Das, B. C., (2008). Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am. J. Gastroenterol.* 103(10): 2495-2501.

Khuroo M. S., Kamili S., Jameel S., (1995). Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet.* 345: 1025-1026.

Khuroo M. S., Kamili S. (2003). Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat.*10: 61-9.

Koonin E.V., Gorbalenya A. E., Purdy M. A. M., Rozanov M. N., Reyes G. R., Bradley D. W., (1992). Computer-assisted assignment of functional domains in the on-structural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(17): 8259-8263.

Korkaya H., Jameel S., Gupta D., et al. (2001) The ORF3 protein of hepatitis E virus binds to Src homology 3 domains and activates MAPK. *J. of Biol. Chem.* 276(45): 42389–42400.

Li TC., Chijiwa K., Sera N., Ishibashi T., Etoh Y., Shinohara Y., Kurata Y., Ishida M., Sakamoto S., Takeda N., Miyamura T. (2005) Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11(12): 1958–1960.

León P., Venegas E. and Bengoechea L. (1999) Prevalencia de las Infecciones por virus de las hepatitis B, C, D y E en Bolivia. *Ver. Panam. Salud Pública.* 5: 144-52.

Lombardi R., Geymonat G., Berrini R. (2015) El Jabalí en el Uruguay (Problema, desafío y oportunidad).

Lopes dos Santos D. R., Lewis-Ximenez L. L., Figueira Marques da Silva M., Fonseca de Sousa P. S., Coimbra Gaspar A. M., Alves Pinto M. (2010). First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. *J. of Clin. Virol.* 47: 276–279.

Lu L., Li C., Hahedorn C., H. (2006). Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. in Med. Virol.* 16: 5-36.

Martelli F., Caprioli A., Fiegna C., Zengarini M., Di Bartolo I., Marata A., Ruggeri F., Delogu., Ostanello F. (2008). Detection of Hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet. Microbiol.* 126: 74-81.

Martínez Wassaf M.G., Pisano M.B., Barril P.A., et al., (2014). First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. *J. Clin. Virol.* 61(3): 334-339.

Matsubayashi K., Kang J. H., Sakata H., Takashi K., Shindo M., Kato M., Sato S., Kato T., Nishimori H., Tsujj K., 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. *Transf.*, 48(7): 1368-1375

Meng X.J., Purcell. Halbur P. G., Lehman J. R., D. M., Webb T. S. T., Sareva J. S., Haynes B. J., T Hacker, and S. U. Emerson. (1997). A novel virus in swine is closely related to de human hepatitis E virus. *Med. Science.* 94: 9860-9865.

Meng X.J., Halbur P.G., Shapiro M.S., Govindarajan S., Bruna J.D., Mushahwar I.K., Purcell R.H., Emerson S.U., (1998). Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J. Virol.* 72 (12): 9714–9721.

Meng X.J. Yugo D. M. (2013) Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin. Liver.* 33: 41–49.

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. *Arch. Of Virol.* 156 (8): 1451–1454.

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

Mirazo S., Ramos N., Mairnardi V., Gerona S., Arbiza J., (2014a) Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Dove Med. Press* 6: 45-59.

Mirazo S., Mainardi V., Ramos N., Gerona S., Rocca A. and Arbiza J. (2014b). Indigenous Hepatitis E Virus Genotype 1 Infection, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* 20: 171-173

Moin S., M., Panteva M., Jameel S. (2007). The Hepatitis E Virus Orf3 Protein Protects Cells from Mitochondrial depolarization and Death. *J. of Biol. Chem.* 282(29): 21124-21133.

Munné M. S., Vladimirovsky S., Otegui L., Brajterman L., Castro R., Soto S., Moreiro R., Ciocca M., Cuarterolo M., Buamscha D., Giannivelli S., Sasbón J., Schlauder G., González J. E., (2006a). Caracterización molecular del virus de hepatitis E en tres casos de falla hepática fulminante en niños de Argentina. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 36: 125-130

Munné M. S., Vladimírky S., Otegui L., Castro R., Brajterman L., Soto s., Guarnera J. E., Molina V., Monfellano M., Schlauder G. G. and Gonzalez J. E. (2006n). Identification of the First Strain of Swine Hepatitis E virus in South América and Prevalence of Anti-HEV Antibodies in Swine in Argentina. *J. of Med. Virol.* 78: 1579-1583.

Panda SK., Nanda SK., Zafrullah M., Ansari IH., Ozdener MH., Jameel S. (1995) An Indian strain of hepatitis E virus (HEV): cloning, sequence, and expression of structural region and antibody responses in será from individuals from an area of high-level HEV endemicity. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2653–2659.

Patra S., Kumar A., Trivedi S.S., Puri M., Sarin S.K. (2007). Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann. Intern. Med.* 147(1): 28-33.

Pavio N., Meng X. J., Renou C., (2010). Zoonotic hepatitis E: animals reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.* 41 (6): 46-60.

Pudupakam R. S., Kenney S. P., Córdoba L. (2011). Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J. Virol.* 85(19): 10031-10040.

Purcell R.H., Emerson S.U. (2008) Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease, *J. Hepatol.* 48: 494–503.

Pujol F. H., Favorov M. O., Marcano T., Este J,A., Magris M., Liprandi F., Khudyakov Y. E., Khudyakova N. S., Fields, H. A. (1994). Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban and rural populations in Venezuela. *J. Med. Virol.* 42: 234–236.

Quintana A, Sanchez L, Larralde O, Anderson D. (2005). Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in residents of district in Havana, Cuba. *J Med Virol.* 76: 69-70.

Reinhardt G., Ibarra, H., Riedemann, S., Vega, I. (2003). Swine hepatitis E preliminary serological study in Chile. *Arch. Med. Vet.* 35(2); 233-236.

Rey J.A., Findor J.A., Daruich J.R., Canero Velazco C., Bruch Igartúa E., Schemee E. (1997). Prevalence of IgG anti-HEV in Buenos Aires, a non-endemic area for hepatitis. *J. Travel. Med.* 4: 100–101.

Reyes G. R., Purdy M. A., Kim P., et al. (1990). Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247: 1335-1339.

Ruggeri F.; Di Bartolo I.; Ostanello M.; Trevisani M. Editor in Chief: Hartel, R., W.; University of Wisconsin. (2013). Hepatitis E Virus: An Emerging Zoonotic and FoodBorne Pathogen. *SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition*: p. 1-87.

Shlauder GG., Frider B., Sookoian S., Castaño G. C., Mushahwar I. K. (2000). Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J. Infect. Dis.* 182(1): 294-297.

Smith D. B., Simmonds P., Jameel S., Okamoto H., Emerson S. U., Harrison T., Wim H. M., Meng X. J., Purdy M. A. (2014) Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. of Gen. Virol.* 95: 2223-2232.

Somani SK., Aggarwal D., Rachline A., Naik SR., Srivastava S., Naik S. A. (2003). A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J. Viral. Hepat.* 10(6): 446-449.

Takahashi M., Jirintai, Mizuo H., Tanaka T., Yazaki Y., Isoda N., Takahashi H., Takagi t., Sugano K., Hoshino Y., Nagashima S., Azuma M., Okamoto H., Kusano E. (2010). Hepatitis E Virus (HEV) Strains in Serum Samples Can Replicate Efficiently in Cultured Cells Despite the Coexistence of HEV Antibodies: Characterization of HEV Virions in Blood Circulation. *J. of Clin. Microbiol.* 48: 1112-1125.

Tam A.W., Smith M.M., Guerra M.E., Huang C.C., Bradley D.W., Fry K.E., Reyes G.R., (1991). Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 185: 120–131.

Trinta K.S., Liberto M.I., de Paula V.S., Yoshida C.F., Gaspar A.M. 2001. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 96(1): 25–29.

Tsarev S. A., Tsareva T. S., Emerson S. U., Kapikian A. Z., Ticehurst J., London W. & Purcell R. H. (1993a) ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading frame-2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. *J. Infect. Dis.* 168: 369–378.

Tsarev S. A., Emerson S. U., Tsareva T. S., Yarbough P. O., Lewis M., Govindarajan S., Reyes G. R., Shapiro M. & Purcell R. H. (1993b). Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J. Infect. Dis.* 167: 1302–1306.

Velazquez O., Stetler HC., Avila C., Ornelas G., Alvarez C., Hadler SC., Bradley DW. (1990). Sepulveda J Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA*. 263: 3281-5.

Vishwanathan R. (1957). Infectious hepatitis in Delhi (1955-1956): A critical study: epidemiology. *Indian. J. Med. Res.* 45:1-29.

Wang Y., Ling R., Erker J.C., Zhang H., Li, H., Desai S., Mushahwar I.K., Harrison T., (1999). A divergent genotype of Hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. of Gen. Virology*. 80:169–177.

Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki N., Gotanda Y. (2003). Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be

food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol.* 84:2351-7.

## ***Agradecimientos***

Gracias a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la beca de iniciación.

Al Dr. Juan Arbiza que me permitió realizar esta etapa en el Laboratorio de Virología y por dejar una marca como docente desde los primeros años de la carrera.

A mi tutor, Dr. Santiago Mirazo por la paciencia y la dedicación al enseñar y por siempre estar presente en todas las etapas de este proceso.

A Natalia Ramos, por siempre estar dispuesta a ayudar y aportar ideas.

A Fernando López Tort, integrante del tribunal, por la corrección y los valiosos aportes.

Agradezco a todos los compañeros del Laboratorio de Virología por generar un lindo ambiente de trabajo tanto en lo académico como en lo personal, me llevo amigos y el recuerdo de lindas personas que es lo más importante.

A mis amigos que por suerte son muchos y que siempre estuvieron y están. Principalmente, Tati, Fer y Sole que compartieron conmigo las buenas y no tan buenas experiencias de estos años.

Gracias infinitas a mi familia, papá, mamá, Gaby, Silvi y Carlos por el amor, la comprensión, la dedicación y los buenos valores que me inculcaron. Gracias por siempre decirme que dedicarme a lo que me gusta es la mayor satisfacción, tenían razón. Carlos, un gracias aparte por aguantarme. Los amo.

