Contenido

Pág.

Resumen…….…….. V

Lista de figuras……4

Lista de tablas……5

Introducción……7

Capítulo 1……..9

Revisión literaria…….……9

1. Virus de la hepatitis E……9

1.1 Organización genómica y subgenómica del virus de la Hepatitis E……9

1.2 Virus de la Hepatitis E y su epidemiología……10

1.3 Características clínicas en humanos…….……13

1.4 Características clínicas en cerdo……13

1.5 Diagnóstico en diferentes especies……16

1.6 Prevalencia del VHE en cerdos……..17

1.7 Curso clínico de la infección con VHE…….....18

1.8 Tratamiento.……..18

1.9 VHE como zoonosis…….……18

1.10 Patogénesis.…….……..20

1.11 Vacunación contra VHE en humanos.…….……..20

1.12 Cerdo como modelo animal para el estudio de VHE……21

1.13 El futuro de VHE a nivel mundial……21

Bibliografía……22

Capítulo 2……28

2. Seroprevalencia del VHE en cerdos faenados en Antioquia y su clasificación de municipios productores de cerdo según su nivel de seropositividad……28

Resumen……28

2.1 Introducción……30

2.2 Objetivos……32

2.3 Metodología……33

2.3.1 Consideraciones éticas……33

2.3.2 Tipo de estudio ……33

2.3.3 Toma de muestras de cerdos en plantas de beneficio……33

2.3.4 Análisis serológico ELISAS IgG anti-VHE……34

2.3.5 Estimación del valor de corte para la positividad de anticuerpos IgG en sueros de cerdo……34

2.3.6 Clasificación de municipios según nivel de seroprevalencia……35

2.3.7 Análisis estadístico……35

2.4 Resultados……36

2.4.1 Estandarización de la técnica de ELISA anti-VHE para cerdos……36

2.4.2 Reproducibilidad de los ensayos para los controles y reactivos del kit de ELISA anti-VHE……40

2.4.3 Reproducibilidad de los ensayos para los controles de cerdos, con anticuerpo secundario anti IgG de cerdo……42

2.4.4 determinación de seroprevalencia para VHE en cerdos faenados en Antioquia……44

2.4.5 Clasificación de municipios según nivel de seroprevalencia……45

2.4.6 Resultados de seroprevalencia por subregiones del departamento de Antioquia de procedencia de los cerdos……46

2.5 Discusión……47

2.6 Conclusiones……..…50

Bibliografía……..51

Capítulo 3……53

3. Determinación de la excreción del Virus de la Hepatitis E (VHE) mediante técnicas moleculares en heces de cerdo en plantas de beneficio en Antioquia.……..53

Resumen……53

3.1 Introducción……..55

3.2 Objetivos……..57

3.3 Metodología……..58

3.3.1 Consideraciones éticas……58

3.3.2 Tipo de estudio ……..58

3.3.3 Toma de muestras de cerdos en plantas de beneficio…….....58

3.3.4 Detección molecular del VHE a partir de muestras de heces porcinas……59

3.3.4.1 Preparación de las muestras……..59

3.3.4.2 Extracción de RNA.……..59

3.3.4.3 Transcripción reversa asociada a PCR (RT-PCR)……..59

3.3.4.4 PCR anidada……..61

3.3.5 Análisis estadístico……..61

3.4 Resultados……62

3.5 Discusión……..64

3.6 Conclusiones……66

Bibliografía……67

Recomendaciones Generales……69

Lista de figuras

Pág.

Figura 1.1: Organización genómica del VHE……10

Figura 1.2: Mapa de distribución del VHE a nivel mundial……12

Figura 1.3: Aproximación del curso de tiempo para la infección por VHE en cerdos……..15

Figura 1.4: Infiltrados linfociticos en cerdos infectados naturalmente con VHE……..16

Figura 2.1: Ensayo de ELISA con solo dos columnas para examinar controles de calidad…39

Figura 2.2: Ensayo de ELISA con plato completo con dos columnas de controles y diez columnas de muestras de suero de cerdo……40

Figura 2.3: Gráficos de Levey-Jennings del Control (-)……41

Figura 2.4: Gráficos de Levey-Jennings del Calibrador Kit……41

Figura 2.5: Gráficos de Levey-Jennings del Control Positivo Kit……..41

Figura 2.6: Gráficos de Levey-Jennings del Control (+) Env 6……..42

Figura 2.7: Gráficos de Levey-Jennings del Control (+) Anticuerpo secundario……43

Figura 2.8: Gráficos de Levey-Jennings del Calibrador kit con anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo……43

Figura 2.9: Gráficos de Levey-Jennings del Control (-) Lechones……43

Figura 2.10: Distribución de la población de muestras de 1000 cerdos tomados en plantas de beneficio……44

Figura 2.11 Subregiones de procedencia de los cerdos muestreados en cinco plantas de beneficio de Antioquia. Resultados de positividad para cada tipo de anticuerpo: (número de positivos/número de muestras) porcentaje%.....46

Figura 3.1: Amplicón de 171 pb de la región OFR-1 del VHE en heces de plantas de beneficio……62

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2.1: Detección de anticuerpos específicos para VHE en cerdos, con anticuerpo conjugado provisto por el kit comercial y el anticuerpo secundario IgG anti cerdo……..36

Tabla 2.2: Controles de calidad del estuche comercial HEV IgG (DIA.PRO Diagnostic Bioprobes)……37

Tabla 2.3. Ensayo de dilución del anticuerpo secundario IgG anti cerdo……38

Tabla 2.4. Interpretación de resultados en muestras humanas según su DO dadas por el kit de ELISA……...38

Tabla 2.5: DO450 nm de los controles para validación de la prueba de ELISA……..39

Tabla 2.6. Control de calidad interno para los controles de la prueba ELISA anti-VHE……44

Tabla 2.7: Seropositividad de 1000 muestras de suero porcino, discriminado por Componente 1 sueros Negativos y Componente 2 sueros positivos……45

Tabla 2.8: Proporciones de positivos y negativos ante IgG anti-VHE en cada una de las plantas de beneficio……48

Tabla 2.9: Clasificación de los 37 municipios en tres niveles dependiendo del porcentaje de positividad para IgG anti-VHE, en muestras de suero porcino.....46

Tabla 2.10: Resultados de seropositividad para los 10 municipios con mayores porcentajes de positividad para IgG anti-VHE.....45

Tabla 3.1: Primers usados para la amplificación de una región del ORF-1 del VHE……60

Tabla 3.2: Frecuencia y porcentaje de cerdo positivos y negativos a VHE por RT-PCR en heces……62

Tabla 3.3: Resultados de RT-PCR discriminados por subregión de Antioquia……..63

Tabla 3.4: comparación de análisis de ELISA (IgG) y pruebas moleculares (RT-PCR)…….63

Introducción

La Hepatitis E, es conocida como hepatitis no A, no B de transmisión entérica y donde el Virus de la Hepatitis E (VHE) es el responsable de la infección. Sus características clínicas y epidemiológicas en humanos son las de una hepatitis aguda (Emerson y Purcell, 2003). La infección es transmitida por vía fecal-oral y principalmente ocurre a través de aguas contaminadas con heces, puede manifestarse en forma de casos esporádicos como de brotes epidémicos. Estos casos ocurren con mayor frecuencia en áreas con condiciones sanitarias y suministro de aguas inadecuados, y se presenta como la causa principal de hepatitis aguda (Kabrane-Lazizi et al., 1999)

El primer brote documentado de VHE fue registrado en Delhi (India) entre 1955 y 1956, en él se pudieron registrar29.000 casos de hepatitis ictérica, sin embargo, fueron atribuidos a una infección por el virus de la hepatitis A (VHA). Posteriormente, se confirmó que este brote se debía a infección por VHE. Este brote fue causado por aguas contaminadas con heces, de origen residual, vertidas al río que suministraba el agua a las plantas potabilizadoras de la ciudad, lo que confirmó que el tratamiento con cloro aplicado no prevenía la contaminación originada por VHE (Wong et., al 1980).

El Consejo Ejecutivo de la OMS (2010), consideró las hepatitis virales como un problema grave de salud pública mundial, y expresó su preocupación por falta de progreso en prevención y control en países en desarrollo; por lo que se pretende entonces, implementar sistemas de vigilancia epidemiológica para obtener información fiable y orientar las medidas de prevención y control.

Inicialmente, la mayoría de los casos descritos correspondían a pacientes de países no endémicos, que habían viajado recientemente a zonas endémicas, sin embargo, es cada vez más frecuente que se describan más casos de hepatitis E esporádicas en pacientes que nunca han viajado a dichas zonas (Smith, 2001; Worm et al., 2002). En humanos, se han descrito hasta el momento cuatro genotipos para VHE (genotipos 1 al 4) con distinta distribución geográfica. Los genotipos 3 y 4 de VHE han sido encontrados en animales de granja, lo que apoya la hipótesis de que la hepatitis E sea una zoonosis (Emerson y Purcell 2003; Schlauder, 2004). Dentro del genotipo 3 se agrupan los aislados de regiones consideradas hasta ahora como no endémicas (Norte y Suramérica, y gran parte de Europa) y representan un grupo de secuencias más diverso (Emerson y Purcell 2003).

El primer reporte de seroprevalencia para VHE en cerdos y la caracterización de VHE porcino se realizaron en los años noventa (Balayan et al., 1990; Meng, 1997). Existen estudios que demuestran que el VHE es capaz de atravesar la barrera interespecie, por lo que la infección por VHE constituye un importante problema de salud pública, en el que se ven implicadas las personas que trabajan con cerdos, las cuales presentarían un alto riesgo de padecer la infección por VHE (Tosoncin da Silva et al., 2012). De hecho, se han publicado varios estudios en los que se demuestra una elevada prevalencia de anticuerpos contra VHE (anti-VHE) en personas que tenían una exposición ocupacional a cerdos (Emerson y Purcell 2003; Schlauder 2004).

Aunque el VHE es la causa principal de hepatitis de transmisión entérica en humanos de países con condiciones de aguas inadecuadas y considerados como endémicos, en Colombia se desconoce su situación epidemiológica. En Medellín se demostró la circulación del virus de la hepatitis E en una persona con diagnóstico de hepatitis aguda sin marcadores para hepatitis A, B y C (Rendón et al., 2010), pero no se conocen evidencias de circulación de este virus en cerdos en Colombia.

La circulación detectada en el ganado porcino en diferentes países del mundo, sugiere que esta enfermedad es una zoonosis transmitida por aguas contaminadas con excretas porcinas o por carne contaminada destinada para el consumo humano (Meng et al., 2010). Considerando entonces la infección de VHE como un problema de salud pública, es importante conocer el estado sanitario de los municipios productores de cerdo en Antioquia, y luego clasificarlos según su riesgo epidemiológico de diseminar la infección, y de esta manera proponer un programa de vigilancia y control epidemiológico de la infección.

Revisión literaria

1. Virus de la Hepatitis E.

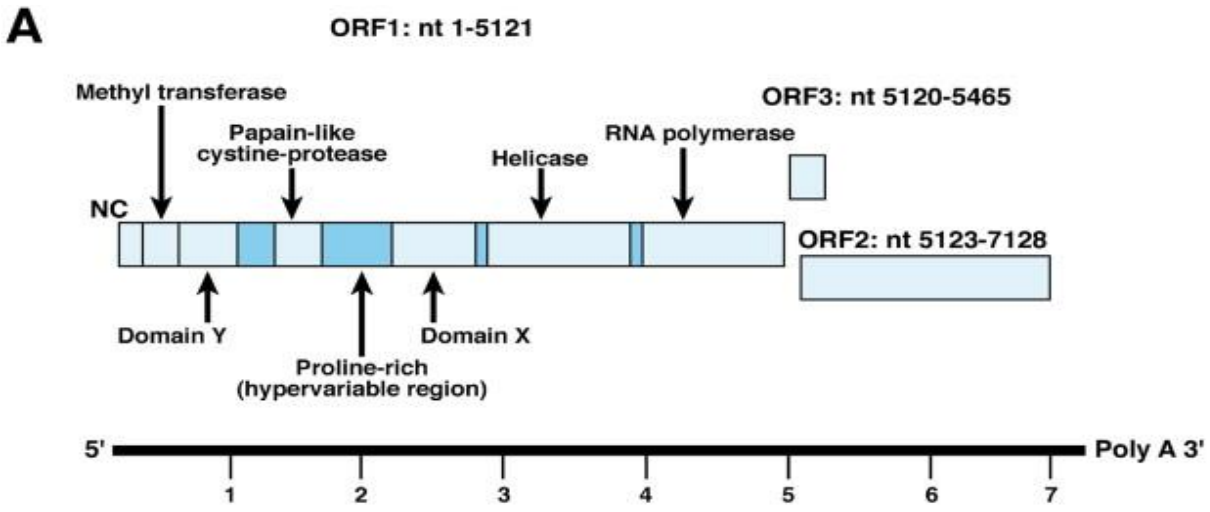
La Hepatitis E, es conocida como hepatitis no A, no B de transmisión entérica y donde el Virus de la Hepatitis E (VHE) es el responsable de la infección. Sus características clínicas y epidemiológicas en humanos son las de una hepatitis aguda (Emerson y Purcell, 2003). La infección es transmitida por vía fecal-oral y principalmente ocurre a través de aguas contaminadas con heces, puede manifestarse en forma de casos esporádicos como de brotes epidémicos. Estos casos ocurren con mayor frecuencia en áreas con condiciones sanitarias y suministro de aguas inadecuados, y se presenta como la causa principal de hepatitis aguda (Kabrane-Lazizi et al., 1999)

1.1 Organización genómica y subgenómica del virus de la Hepatitis E.

El Virus de la Hepatitis E, es un virus RNA de cadena sencilla de sentido positivo de aproximadamente 7,3 kilobases (kb); hacia el extremo 5' posee un "cap", seguido de una región no traducida corta (UTR) y tres marcos de lectura abierta (Open Reading Frame: ORF) ORF1, ORF2 y ORF3 (Figura 1.1). En el extremo 3` presenta otra UTR, la cual finaliza en cadena de 200 a 300 adeninas (Poli A) (Kabrane-Lazizi et al., 1999b; Purcell y Emerson 2001).

El ORF 1 de aproximadamente 5kb, codifica para las proteínas no estructurales metiltransferasa (MT), proteasa (Pro), Helicasa (Hel) y RNA polimerasa dependiente de RNA (Pol) responsable de la replicación del virus (Emerson y Purcell, 2003). Las proteínas estructurales de la cápside viral están codificadas por el ORF 2, el cual produce una proteína que se caracteriza por tener una señal de encapsidación, seguida de una región rica en arginina y varios sitios de glicosilación, que aparentemente son esenciales en la formación de partículas infecciosas (Ahmad, 2011). Se ha encontrado también que varios epítopes de esta proteína son importantes en la generación de anticuerpos neutralizantes (Tam et al., 1991; Jameel et al., 1996; Zafrullah, 1999). El ORF3 codifica para una fosfoproteína de aproximadamente 115 aminoácidos (aa), que está involucrada en la morfogénesis del virión y en la patogénesis viral (Emerson y Purcell 2003). Esta proteína interactúa con proteínas de citoesqueleto (Zafrullah, 1997; Okamoto, 2007) y con proteínas que están involucradas en la activación de la señalización celular; además, forma complejos con la proteína de cápside y el RNA viral. Se ha mostrado que esta proteína está presente en la superficie de los viriones recién formados y juega un papel importante en la salida del virión de la célula infectada. El ORF-3 podría también tener funciones reguladoras implicadas en la modulación de la señalización celular (Emerson y Purcell, 2003). Además, la proteína ORF-3 presenta próximos a su extremo 3', epítopes neutralizantes (Tam et al 1991, Meng, 2010). El VHE posee además dos secuencias de RNA sub genómico, una de las cuales posee cap en su extremo 5` (Meng, 2010).

Figura 1.1. Organización genómica de VHE.



Tomado de Wedemeyer et al., 2012

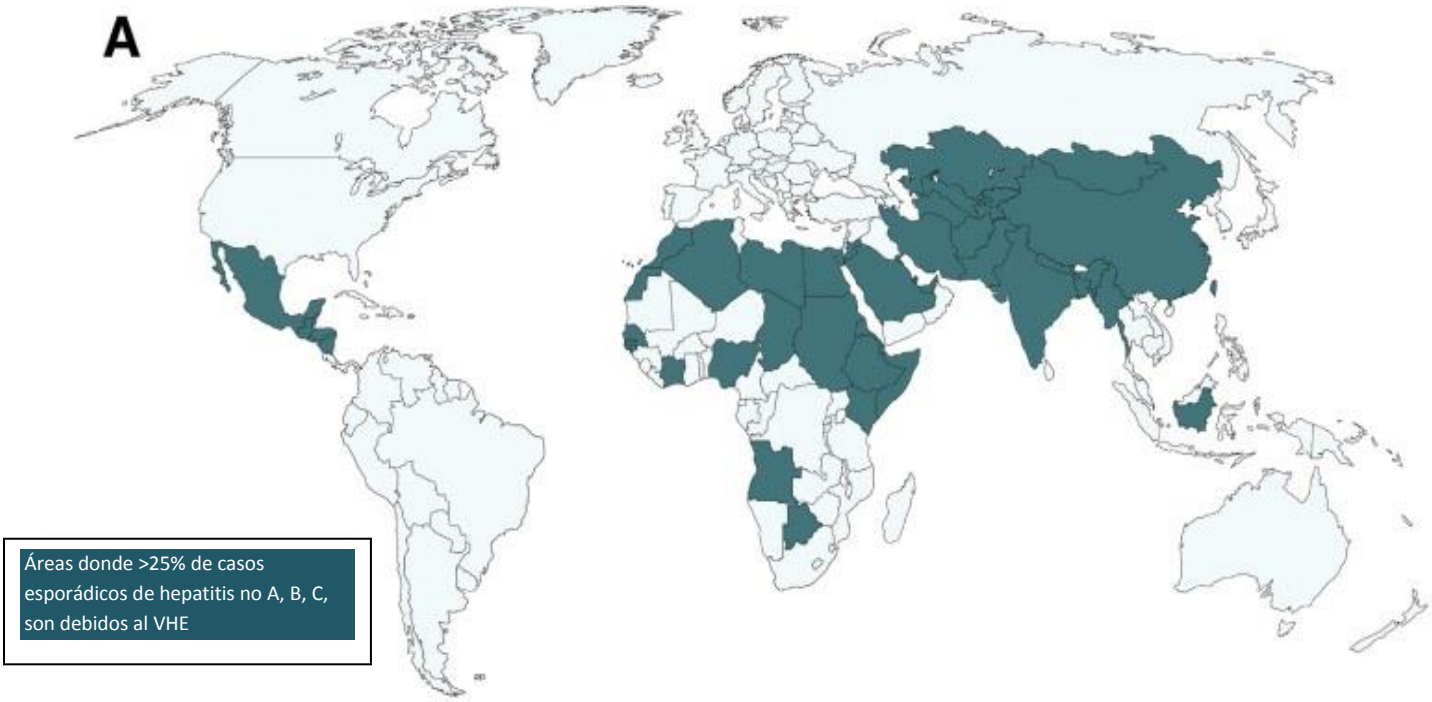
1.2 Virus de la Hepatitis E y su epidemiología.

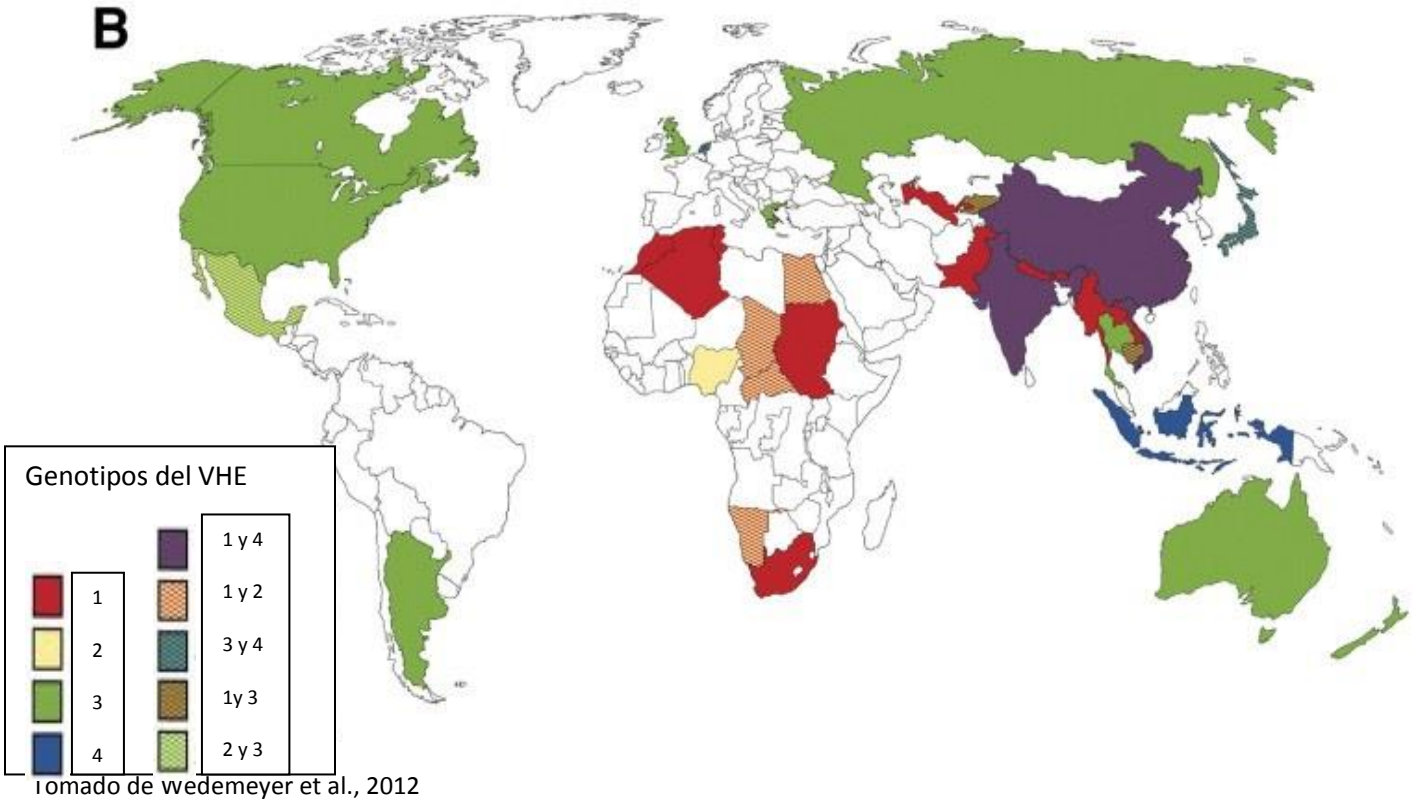
La taxonomía del virus de Hepatitis (VHE) ha sido confusa, debido a que inicialmente fue clasificado en la familia caliciviridae; sin embargo, las secuencias genómicas del virus carecían de homología con virus de esta familia. Actualmente este virus se clasifica en la familia hepeviridae donde el HEV es el único miembro del genero *hepevirus* perteneciente a esta familia; sin embargo, la secuencia genómica del VHE es bastante estable (Arankalle et al., 1999). Anteriormente se han realizado estudios en animales mediante el pase seriado del virus y no se han mostrado variaciones en el genoma viral, adicionalmente, los aislados provenientes de un mismo brote generalmente presentan una gran similitud en sus secuencias genómicas (Word et al., 2002; Schlauder 2004). Así pues, los aislados de distintas regiones geográficas del mundo presentan secuencias genómicas diferentes. Debido a esta heterogeneidad, el VHE se ha clasificado dentro de 4 genotipos diferentes. El genotipo 1 está presente principalmente en áreas endémicas de Asia y África. El genotipo 2 incluye los aislados de México y sur de África. Dentro del genotipo 3 se agrupan los aislados de regiones consideradas hasta ahora como no endémicas (Norte y Suramérica y gran parte de Europa) y representan un grupo de secuencias más diverso. Por último, el genotipo 4 incluye principalmente aislados de Asia (Word et al., 2002; Meng, 2003; Schlauder 2004). A pesar de esta diversidad genotípica, no hay evidencias claras de que haya diferencias serotípicas entre estos genotipos; sin embargo, una cepa aislada en una granja de conejos de China parece ser diferente genéticamente de los genotipos identificados hasta el momento, y podría convertirse en un quinto genotipo (Meng, 2010). Los virus provenientes de aves han sido clasificados tentativamente como genotipo 5. No obstante, algunas cepas aviares del virus pertenecen a tres diferentes genotipos reportados, y tienen solamente el 50 % de homología con las cepas de mamíferos (Okamoto, 2007). Debido a lo anterior, se hace necesario una revisión de la taxonomía para clasificar las cepas aviares como un género distinto dentro de la familia *hepeviridae*.

En la figura 1.2 se muestra la distribución del VHE en humanos a nivel mundial (Wedemeyer et al., 2012), tanto en zonas donde más del 25% de los casos de hepatitis no A, no B, no C, son

producidos por VHE (A), como la dispersión del virus en los diferentes países y los genotipos dominantes en cada uno de ellos (B). Aunque en el mapa no se denota, en Suramérica se han detectado anticuerpos anti-VHE en Brasil, Uruguay, Argentina, Bolivia (Souto *et al.,* 1997, Cruells *et al.,* 1997; Munné *et al.,* 2006a; Dell´Amico *et al.,* 2011). En Colombia se demostró la circulación de virus de hepatitis E en Humanos con diagnóstico de hepatitis aguda, no A, no B y no C (Rendón et al., 2010), y aunque no se conocen evidencias de circulación de VHE en Cerdos en Colombia, la seroprevalencia de VHE en un grupo de riesgo por contacto con cerdos encontrada por Betancur et al, (2013) fue del 11.22% de positividad.

Figura 1.2. Mapa de distribución del VHE en humanos a nivel mundial.





Tomado de Wedemeyer et al., 2012

1.3 Características clínicas del VHE en humanos.

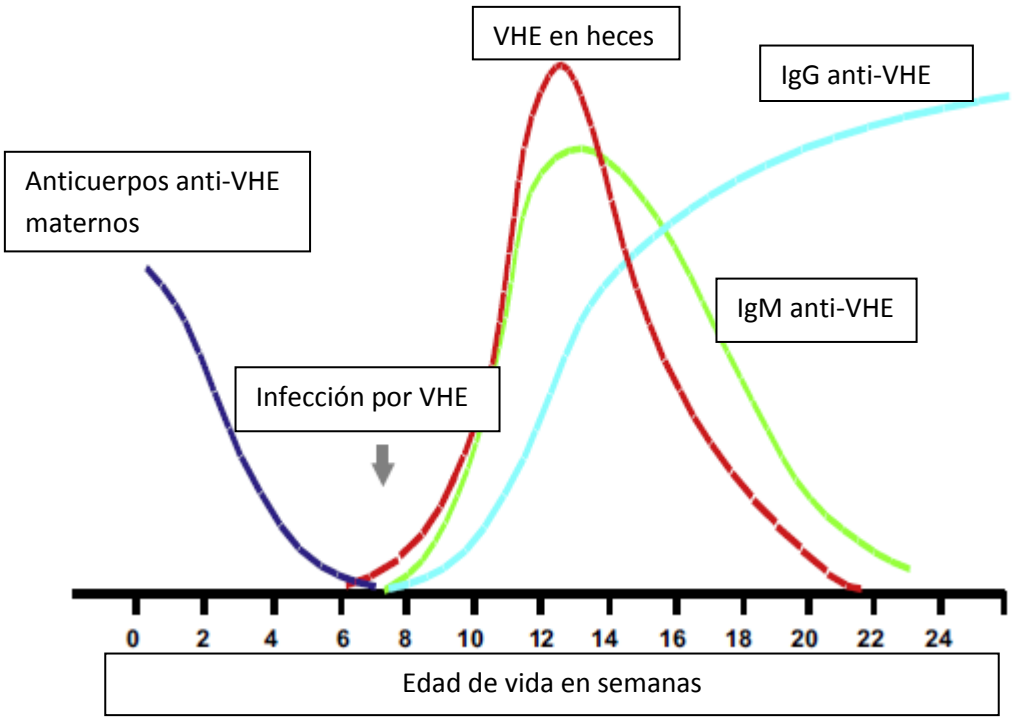
La hepatitis E en humanos, presenta unas características clínicas y epidemiológicas similares a las de la hepatitis A aguda. La infección de Ambas enfermedades es transmitida por vía fecal-oral y principalmente ocurre a través de aguas contaminadas con heces, se manifiestan tanto en forma de casos esporádicos como de brotes epidémicos (Purcell y Emerson, 2001). Inicialmente el curso clínico de la infección por VHE fue descrito en un voluntario humano a quien se suministró una preparación obtenida a partir de un cultivo purificado procedente de un paciente con hepatitis E. Se logró conocer el período medio de incubación obteniendo un resultado promedio de 40 días (rango, 15-60), y la elevación de los valores séricos de enzimas hepáticas se produce normalmente entre 30 y 120 días después de la infección (Krawczynski et al., 2001). Adicionalmente, se espera que la excreción fecal de VHE comienza alrededor de una semana antes del inicio de los síntomas de la enfermedad y continúa durante 2 o 3 semanas después (Skidmore et al., 2002). La fase ictérica se caracteriza por un cuadro similar al de la gripe, los síntomas se presentan principalmente con malestar general, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos, siendo síntomas que se pueden confundir con otras enfermedades; además, se puede observar anorexia, artralgias, astenia, heces de color arcilloso, orina de color oscuro, diarrea, prurito, exantemas cutáneos, hepatomegalia y esplenomegalia, siendo estas últimas, las más representativas de la enfermedad. (Krawczynski et al., 2001).

Una de las características principales, de mayor importancia en salud publica y más llamativas de la infección por VHE en humanos, es la extrema gravedad que la enfermedad presenta en mujeres embarazadas, pudiendo presentar fallo hepático fulminante (FHF) (Kasorndorkbua et al., 2003). Si bien la prevalencia de anticuerpos frente a VHE observada en mujeres embarazadas no es superior a la de la población general, la incidencia de fallo hepático fulminante (FHF) complicado con encefalopatía y coagulación intravascular diseminada es mucho mayor, con tasas de mortalidad superiores al 20%, que aumentan con el estado de gestación y llegan a duplicarse durante el tercer trimestre de embarazo (Previsani et al., 2001). Kasorndorkbua et al. (2003), se determinó el desarrollo de FHF en más del 60% de las mujeres embarazadas infectadas por VHE. Estos episodios de FHF llegan a ocasionar un 100% de mortalidad en embarazadas infectadas por VHE (Singh et al., 2003). Adicional, las tasas de muerte neonatal temprana, establecidas por la Organización Mundial de la Salud en mujeres embarazadas infectadas por VHE debidas a aborto espontáneo circulan alrededor del33% (Singh et al., 2003). Por otro lado, en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas, la infección por VHE puede desencadenar una descompensación hepática grave y originar encefalopatía hepática y fallo renal (Kumar et al., 2004).

1.4 Características clínicas del VHE en cerdos.

En cerdos la infección por VHE es asintomática, lo que hace imposible orientar las fases del pico de infección para optimizar la sensibilidad de las pruebas (Di Bartolo *et al.,* 2011). En la figura 1.3 se puede observar la dinámica de anticuerpos IgG e IgM en cerdos en diferentes semanas de vida, representando la cinética de la seroconversión contra el VHE (Pavio *et al.,* 2010).

Figura 1.3: Aproximación del curso de tiempo para la infección por VHE en cerdos.



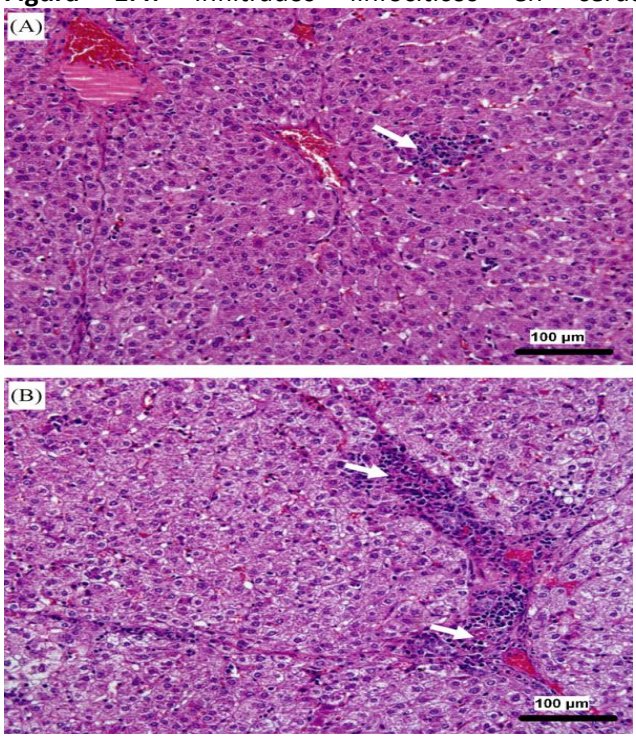
Tomada de: Pavio *et al.,* 2010

En la figura 1.3, se puede observar como bajo condiciones naturales de infección, la dinámica de infección con VHE es similar a la descrita para otros agentes virales en cerdos, la adquisición de inmunidad pasiva a través de la absorción de calostro posterior al nacimiento de los cerdos, tiene un declive a partir de la 8-10 semana de edad. La seroconversión entre la semana 14 y 17 de vida, corresponde al pico de viremia observado a la semana 15.

Al igual que en humanos, el VHE en cerdos se transmite principalmente por aguas contaminadas, o por el contacto entre animales infectados (Kasorndorkbua et al., 2004). La afección de VHE en cerdos se ha determinado en tejido hepático, lugar en el cual, pueden presentarse infiltrados linfocitarios multifocales. Además, puede presentarse afección irregularmente distribuida en hígado y células inflamatorias mononucleares (de Deus et al., 2008) (Fig 1.4)

Se ha determinado que la dinámica de anticuerpos contra VHE, es muy similar a la que se presenta en otros virus que afectan a los porcinos (Gelberg et al., 1991; Rodríguez-Arrioja et al., 2002).

Figura 1.4: Infiltrados linfociticos en cerdos infectados naturalmente con VHE.



Tomado de: de Deus *et al*., 2008

1.5 Diagnóstico en diferentes especies.

La hepatitis aguda o crónica que no son identificadas como Hepatitis A o B, o no pueden ser explicados por otras causas, deben ser parte del análisis de diagnóstico para humanos. La infección aguda por VHE está basada en la detección de anticuerpos IgM anti-VHE y se diagnostica en individuos inmunocompetentes, lo cual sugiere que la infección con este virus es reciente. Adicionalmente, y aunque el aumento de títulos de IgG anti-VHE puede indicar la exposición al virus en alguna etapa de la vida. (Herremans et al., 2007; Drobeniuc et al., 2010). Varios ensayos se basan en antígenos expresados por un solo genotipo de VHE, los cuales pueden ser limitados en la detección de los genotipos totales de VHE. Aunque la mayoría de los ensayos comerciales detectan la infección por VHE genotipo 3 con altos niveles de especificidad, los valores de sensibilidad pueden ser menores (Legrand-Abravanel et al., 2009). Estas variaciones podrían explicar algunas de las discrepancias en las tasas de seroprevalencia ante el VHE informado en diferentes estudios.

Tanto para las diferentes especies animales en las que se ha determinado el VHE, como para los humanos, el RNA de VHE puede ser detectado en la sangre y las heces durante varias semanas durante la infección por VHE aguda. Sin embargo, las pruebas de ácidos nucleicos de VHE no han sido bien estandarizadas. Un estudio de 20 laboratorios de 10 países mostró una diferencia de 100 - 1000 veces en la sensibilidad de los ensayos (Baylis et al., 2011).

1.6 Prevalencia del VHE en cerdos.

Los cerdos domésticos y jabalíes son el principal reservorio animal para los genotipos 3 y 4 de VHE en todo el mundo (Meng, 2009). Varios estudios descriptivos sobre la prevalencia del VHE se han llevado a cabo en producciones porcinas en diferentes países (Pavio et al., 2010). En estas investigaciones, se han encontrado diversos resultados: la detección de diferentes clases de anticuerpos anti-VHE (IgG e IgM y en ocasiones IgA) (Fernandez-Barredo et al., 2006; Munné et al., 2006; Leblanc et al., 2007); y la detección de RNA viral por RT-PCR en muestras de suero (Takahashi et al., 2005), heces (Huang et al., 2002; Rutjes et al., 2007), e hígado de cerdo comercializados en puntos de venta de carne (Feagins et al., 2007; Yazaki et al., 2003). Todos los estudios serológicos convergieron en una distribución muy amplia de VHE en piaras de cerdos alrededor del mundo (Pavio et al., 2010). Si se considera que una piara es positiva cuando al menos se identifica un cerdo como seropositivo, se ha encontrado que el 100% (15/15) de muestras de suero fueron positivas en USA (Meng et al., 1997), 90% (20/22) en Nueva Zelanda (Garkavenko et al., 2001), 46% (23/50) en Laos (Blacksell et al., 2007), 100% (10/10) en México (Cooper et al., 2005), y 98% (40/41) en España (Seminati et al., 2008).

Fuertes fluctuaciones en la tasa de seroprevalencia a VHE se observan también de acuerdo a la edad del animal, ya que en cerdos de más de 4 meses de edad, la seroprevalencia por lo general es más alta (Takahashi et al., 2005). Esta observación es consistente con la infección de forma natural por VHE en cerdos entre 10 y 12 semanas de edad (Pavio et al., 2010). La tasa de seroprevalencia de IgG anti-VHE en las cerdas es mayor, entre 60 y 73% (Garkavenko et al., 2001; Seminati et al., 2008). Además, la detección de RNA de VHE en suero porcino muestra una influencia muy fuerte con respecto a la edad de los animales, Takahashi et al., (2005), observaron que el mayor número de animales virémicos, se presentó en edades alrededor de los 3 meses (32/310 positivos). En ese estudio, ninguno de los cerdos sometidos a prueba fue positivo a los 6 meses de edad. En un estudio español, el porcentaje de cerdos virémicos se incrementó entre las 9 y las 15 semanas de edad y se redujo gradualmente hacia el sacrificio (de Deus et al., 2008).

La excreción fecal de VHE parece depender en gran medida de la edad de los animales, alcanzando un máximo a las 18 semanas de edad (86% de los cerdos eliminando el virus en heces), y disminuyendo después a la edad del sacrificio (41%) (Leblanc et al., 2007). De manera similar, resultados obtenidos en España (Fernandez-Barredo et al., 2006), mostraron un mayor número de cerdos positivos (12/20) entre 13 y 16 semanas de edad. De igual forma, resultados obtenidos en Reino Unido (McCreary et al., 2008) mostraron un mayor número de cerdos con excreción fecal de VHE entre las 10 y las 12 semanas de edad (22%), mientras que se presentaba un 4% para los cerdos de más de 22 semanas de edad.

En condiciones naturales de infección, la dinámica de la infección por VHE en cerdos es similar a lo descrito para la mayoría de las infecciones virales: adquisición de inmunidad pasiva a través de la absorción de calostro (60% de los lechones), un declive progresivo de estos anticuerpos pasivos entre 8-10 semanas de edad, y la seroconversión entre 14 y 17 semanas de edad correspondiente al pico de viremia observado a las 15 semanas de edad (40% de los animales) (de Deus et al., 2008) (Fig.1.3).

1.7 Curso clínico de la infección con VHE.

La mayoría de las infecciones por VHE tienen un curso silente tanto en cerdos como en humanos. En un ensayo de vacuna de VHE en China de > 110.000 humanos, <5% de los individuos produjeron seroconversión (inicio de producción de anticuerpos contra VHE), y durante el tiempo de observación desarrollaron síntomas de la infección por hepatitis agudas (Zhu et al., 2010). El VHE rara vez se asocia con síntomas clínicos durante la infancia (Buti et al., 2008). En casos sintomáticos, el período de incubación varía de 2 a 8 semanas, con una media de 40 días; y los síntomas iniciales de la hepatitis E aguda, suelen ser inespecíficos e incluyen gripa, mialgia, artralgia, debilidad y vómitos. Algunos pacientes tienen ictericia, prurito, heces sin color, y orina oscura, acompañada por el aumento de los niveles de transaminasas hepáticas, bilirrubina, fosfatasa alcalina, y γ-glutamiltransferasa (Purcell y Emerson, 2008)

1.8 Tratamiento.

Hasta el momento no se encuentra disponible un tratamiento específico para el virus de la hepatitis E; en pacientes inmunocompetentes, la infección con hepatitis E aguda no requiere terapia con antivirales (Wedemeyer et al., 2012). Sin embargo, se han estudiado modelos animales donde se ha logrado una inmunización pasiva utilizando sueros de la fase convaleciente (Tsarev et al., 1994), Aun conociendo esto, en humanos la administración de inmunoglobulinas obtenidas de habitantes de regiones endémicas para VHE no tuvo éxito. Es necesario señalar, que en estos estudios no se había seleccionado el plasma para la realización de los ensayos, y que incluso en regiones endémicas, la prevalencia y los títulos de anticuerpos anti-VHE son generalmente bajos. Por ello, no se puede descartar que el uso de Ig específicas frente a VHE con títulos elevados pueda ser útil, específicamente en mujeres embarazadas y durante las epidemias (Khuroo et al., 1992).

Se consideran entonces diferentes opciones para el tratamiento de los pacientes con hepatitis E crónica, donde se incluyen la reducción de la inmunosupresión y la administración de interferón alfa o ribavirina. (Wedemeyer et al., 2012).

1.9 VHE como zoonosis.

Datos recientes apuntan a que la hepatitis E es una zoonosis, considerando un número elevado de vectores para la enfermedad (Zhu et al., 2012). Se ha detectado una población con anticuerpos anti-VHE en países industrializados donde esta enfermedad no es endémica, debido a esto se ha establecido la hipótesis de la existencia de uno o varios reservorios animales para VHE (Zhu et al., 2012). En España, Pina et al., (2000) han realizado la identificación genética de nuevos aislamientos de VHE a partir de suero de pacientes y de muestras de aguas residuales procedentes de plantas de sacrificio. Se identificaron dos aislamientos de VHE de muestras en humanos y mostraron entre sí una similitud del 93,4% en la secuencia nucleotídica comparándose 304 pb de la región ORF2 y un 92,7% de identidad en 371 pb de la región ORF1. Adicional a estas muestras humanas, se obtuvo una cepa de muestras de aguas residuales procedentes de una planta de faenado donde se sacrificaban preferentemente cerdos, este tipo de muestra presentaba una homología del 92,1 y del 94% en la región ORF2 con los dos aislamientos humanos. En conjunto, esta cepa porcina española presenta una homología en la región ORF2 del 85,5% con las cepas

porcinas de USA. Además, fueron detectados anticuerpos frente a VHE en el 25% de los sueros porcinos estudiados lo que demuestra la circulación del virus en las plantas. (Emerson y Purcell 2003, Schlauder 2004).

El primer reporte de seroprevalencia para VHE en cerdos y la caracterización de VHE porcino fue en los años noventa (Balayan et al., 1990, Clayson et al., 1995, Meng, 1997). Luego se realizó infección experimental de cerdos con VHE porcino y con aislados de humanos, observando que los animales infectados presentaron viremia y liberaron virus en las heces, pero no sintomatología clínica de la enfermedad (Meng, 1998). En España, con cerdos infectados de forma natural por VHE, se encontró que el 32% de los animales presentó una hepatitis leve o moderada, y en el 68% de ellos se podía detectar RNA de VHE en al menos, uno de los tejidos analizados. La detección del genoma viral fue más frecuente en bilis, seguida de los ganglios linfáticos mesentéricos y el hígado y en menor medida, en las heces y el suero (de Deus, 2006).

Se ha demostrado experimentalmente que el VHE puede atravesar la barrera de la especie. Es así, como se han infectado primates con VHE porcino; y cerdos, corderos y ratas con VHE humano (Yazaki *et al.,* 2003; Okamoto *et al.,* 2007). Los cerdos inoculados con el aislamiento de VHE humano americano rápidamente presentaron viremia y seroconversión, lo que indica que esta variante estaría perfectamente adaptada al cerdo y quizá su origen sea realmente porcino.

Por todo lo anterior, se considera a la infección por VHE como un importante problema de salud pública, viéndose implicadas las personas que trabajan con cerdos, ya sea en plantas de faenado, o en granjas productivas, las cuales presentarían un riesgo alto de padecer la infección por VHE (Tosoncin da Silva et al., 2012). De hecho, se han hecho publicaciones en los que se demuestra una elevada prevalencia de anti-VHE en personas con exposición ocupacional en la producción porcina (Emerson y Purcell 2003, Schlauder 2004).

Aun teniendo toda esta información, los diferentes programas de vigilancia epidemiológica en personas en contacto directo con cerdos han arrojado datos contradictorios. Inicialmente, estudios llevados a cabo en regiones endémicas como China y Tailandia demostraron prevalencias elevadas (entre el 50 y el 100%) en los individuos evaluados (Meng, 2003). Investigaciones realizadas en países industrializados considerados no endémicos, han reducido los porcentajes de seropositividad. Se demostró en estudios realizados en USA que la prevalencia de anticuerpos anti-VHE era mayor en médicos veterinarios que estaban en contacto con cerdos, llegando a un 26% a diferencia de donantes de sangre que alcanzaban un 18% (Meng et al., 2002). Un estudio posterior describió una seroprevalencia del 35% en cerdos, y del 11% en personas que estaban en contacto con cerdos, frente al 2,5% encontrado en personas que no lo estaban (Withers et al., 2002). Estudios más recientes, realizados en China han descrito que el riesgo de infección por VHE es un 74% mayor en los trabajadores que realizan actividades relacionadas con la cría de cerdos que en los que se dedican a otras ocupaciones (Zheng et al., 2006). Por el contrario, estudios en regiones consideradas como no endémicas, como es el caso de Suecia, no se han observado diferencias estadísticas entre las personas que trabajan en el sector porcino (13%) y las personas que no tienen contacto con cerdos (9,3%) (Olsen et al., 2006).

La demostración del carácter zoonótico de VHE fue la descripción de casos de hepatitis aguda tras la ingesta de carne cruda de ciervo infectado por VHE (Tei et al., 2003), de mariscos contaminados (Cacopardo et al., 1997), y de carne de jabalí cruda (Yazaki et al., 2003, Li et al., 2005). En la actualidad, la infección con VHE es considerada una enfermedad zoonótica re-emergente también

en países industrializados, ya que las infecciones con VHE genotipo 3 y 4 se ha incrementado tanto en el occidente de Europa, como en Norte América (Pischke y Wedemeyer 2010). Masia et al., (2009), estudiando la seroprevalencia de humanos en Italia, encontraron que la prevalencia de anti-VHE fue 5% en donadores de sangre y 2.3% en trabajadores con riesgo zoonótico. En individuos positivos se realizó la extracción de RNA en suero para detección viral y no fue determinada presencia de genoma viral. Este mismo estudio en cerdos detectó genoma de VHE en muestras de bilis en el 6.3% de la población muestreada y fue postulado el cerdo como un posible reservorio del virus para los humanos.

1.10 Patogénesis.

En las especies que se ha evaluado la presencia de VHE, se considera que la entrada del virus al organismo se da por la vía oral (Kasorndorkbua et al., 2004). El sitio de replicación primaria no se ha identificado; sin embargo, algunos autores especulan que ocurre en el tracto gastrointestinal (Williams et al., 2001), mientras que otros dicen que en hígado (Lee et al., 2009). No hay claridad sobre los mecanismos que utiliza el virus para alcanzar el hígado, pero se presume que llegan a este órgano por vía porta, allí el virus se replica en el citoplasma de los hepatocitos (Bradley, 1995; Rogeé et al., 2013), luego es liberado en bilis (por mecanismos que se desconocen) (Reyes et al., 1990), desde donde alcanza el intestino a través del conducto biliar, para posteriormente, ser excretado en heces generalmente durante 2 semanas, período durante el cual el virus también suele estar presente en el suero (Aggarwal y Naik 1994). En estudios de infección oral en humanos, el virus fue inicialmente detectado en las heces por RT-PCR entre los días 22 y 30 post infección (Chauhan *et al.,* 1993), las partículas virales se determinaron por microscopía electrónica entre los 28 y 34 días post exposición, y las enzimas hepáticas alcanzaron un valor pico en el día 4 y 46. Los voluntarios en estos experimentos se recuperaron completamente. Asimismo, el VHE se ha detectado en sangre y heces durante períodos de hasta 16 semanas, lo que implica la posibilidad que individuos infectados asintomáticos puedan almacenar el virus y servir como reservorios de éste entre brotes epidémicos, y de esta forma, originar infecciones esporádicas por contaminación de agua y alimentos, o entre personas (Chauhan et al., 1993).

1.11 Vacunación contra VHE en humanos.

La inmunidad protectora también puede ser inducida por la vacunación. Una vacuna recombinante desarrollada por GlaxoSmithKline y el Instituto del Ejército Walter Reed tuvo éxito en un estudio de fase II de 2.000 soldados nepalíes, con una eficacia del 96% tras la administración de 3 dosis (Shrestha et al., 2007), sin embargo, esta vacuna no se ha desarrollado más. Un estudio de fase III de > 100.000 adultos chinos informaron que una vacuna recombinante de VHE (HEV 239) previene la hepatitis E aguda con un 94% -100% de eficiencia (Zhu et al., 2010). Esta vacuna se basa en VHE genotipo 1 producido en células bacterianas, conteniendo 30 mg antígeno (de VHE) purificado, y adsorbido en 0,8 mg de hidróxido de aluminio. La vacunación no se asoció con efectos secundarios inesperados, y se catalogó como segura en mujeres embarazadas (Wu et al., 2011). Esta vacuna protegía contra la infección por VHE genotipos 1 y 4, pero su eficacia contra VHE genotipo 3 no se conoce. La vacuna requiere una evaluación adicional de los grupos especiales de riesgo, como los pacientes con enfermedad hepática en fase terminal o personas

inmunosuprimidas. También se requieren estudios adicionales para determinar qué títulos de anti-VHE pueden considerarse protectores y con qué rapidez estos descienden después de la vacunación (Wedemeyer y Pischke, 2011). La vacuna fue aprobada en China en diciembre de 2011. Sin embargo; ninguna vacuna contra VHE se encuentra en etapas avanzadas de desarrollo (según Clinicaltrials.gov base de datos el 15 de enero de 2012).

1.12 El Cerdo como modelo animal para el estudio de VHE.

Utilizando el cerdo como modelo animal, se ha podido demostrar que los genotipos 3 y 4 de VHE se replican eficientemente en éstos (Meng et al., 1998). Los modelos animales cerdo y primate no humano, se utilizaron para demostrar las infecciones de especies cruzadas o de los sitios extra-hepáticos de la replicación de VHE (Williams et al., 2001). Estos modelos de infección por VHE (primates no humanos y porcinos) representan un interés clínico limitado para los estudios de patogénesis viral, dado que los animales permanecen asintomáticos, sólo se presenta viremia con eliminación del virus en las heces y la seroconversión (Aggarwal et al., 2001; Halbur et., 2001;). La comparación de las lesiones patológicas entre el genotipo 3 porcino y cepas de VHE humanos no reveló una diferencia importante (Halbur et al., 2001). La infección experimental de cerdas gestantes con VHE genotipo 3 porcino no condujo a ninguna hepatitis fulminante, aborto o la transmisión vertical de la enfermedad (Kasorndorkbua et al., 2003).

1.13 El futuro de VHE a nivel mundial.

La infección por VHE es una importante carga para la salud mundial, ya que tiene una importante morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Las mujeres embarazadas tienen mayor riesgo de insuficiencia hepática aguda grave en la infección por VHE (Kasorndorkbua et al., 2003). La hepatitis E se ha determinado en los países industrializados, donde la transmisión zoonótica parece ser una causa importante de infecciones de VHE en USA, Europa, y Japón (Cao y Meng, 2012; Zhu et al., 2012). Es particularmente importante poner a prueba individuos inmunocomprometidos con enzimas hepáticas elevadas para relacionar con RNA de VHE, debido a que la hepatitis E crónica se ha observado en pacientes VIH positivos, y en receptores de trasplantes de órganos (Wedemeyer et al., 2012).

Bibliografia

Aggarwal R, Naik SR. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. J Hepatol. 1994; 21:718-23.

Aggarwal R., Kamili S., Spelbring J., Krawczynski K., Experimental studies on subclinical hepatitis E virus infection in cynomolgus macaques, J. Infect. Dis. (2001) 184:1380–1385.

Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. Virus Research. 2011; 161: 47-58.

Arankalle VA, Paranjape S, Emerson SU, Purcell RH, Walimbe AM. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). J Gen Virol. 1999; 80:1691-700.

Baylis SA , Hanschmann KM , Blumel J , et al. 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 Clin Microbiol*. 2011;49:1234–1239

Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. J Med Virol. 1990; 32:58-9.

Betancur C, Mejia M, Portillo S. Seroprevalencia de hepatitis E en trabajadores de fincas porcícolas del Valle de Aburrá 2011-2012. Acta médica colombiana Vol. 38 n°2 ~ Abril-Junio 2013

Bhatia V, Singhal A , Panda SK , et al. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? . *Hepatology* . 2008;48:1577–1585.

Blacksell S.D., Myint K.S., Khounsy S., Phruaravanh M., Mammen M.P. Jr, Day N.P., Newton P.N., Prevalence of hepatitis E virus antibodies in pigs: implications for human infections in village-based sub- sistence pig farming in the Lao PDR, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (2007) 101:305–307.

Bradley DW. Hepatitis E virus: a brief review of the biology, molecular virology, and immunology of a novel virus. J.Hepatol. 1995; 22:140-5.

Buti M , Plans P , Dominguez A , et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in children in the northeast of Spain . *Clin Vaccine Immunol* . 2008;15:732–734

Cacopardo B, Russo R, Preiser W, Benanti F, Brancati G, Nunnari A. Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. Infection. 1997; 25: 313-6.

Cao DJ and Meng XJ. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. Emerging Microbes and Infections (2012) 1, e17

Chauhan A, Jameel S, Dilawari JB, Chawla YK, Kaur U, Ganguly NK. Hepatitis E virus transmission to a volunteer.Lancet.1993; 341: 149-50.

Clayson ET, Innis BL, Myint KS, Narupiti S, Vaughn DW, Giri S, et al. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. Am J Trop Med Hyg. 1995;53:228-32.

Cooper K., Huang F.F., Batista L., Rayo C.D., Bezanilla J.C., Toth T.E., Meng X.J., Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations, J. Clin. Microbiol. (2005) 43:1684–1688.

de Deus N, Seminati C, Pina S, Mateu E, Martin M, Segales J. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. Vet Microbiol. 2006; 34:56-60.

de Deus N, Casas M, Peralta B, Nofrarías M, Pina S, Martín M, Segalés J. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. Vet Microbiol. 2008; 132: 19-28.

Dell'Amico, M.C., Cavallo, A., Gonzales, J.L., Bonelli, S.I., Valda, Y., Pieri, A., Segund, H., Ibañez, R., Mantella, A., Bartalesi, F., Tolari, F., Bartolini, A., 2011. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Humans and Swine, Bolivia. Emerg. Infect. Dis. 17, 1488-1490**.**

Drobeniuc J , Meng J , Reuter G , et al. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances . *Clin Infect Dis* . 2010;51:e24–e27

Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. Rev Med Virol. 2003; 13: 145-54.

Feagins A.R., Opriessnig T., Guenette D.K., Halbur P.G., Meng X.-J., Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA, J. Gen. Virol. (2007) 88:912–917.

Fernandez-Barredo S, Galiana C, Garcia A, Vega S, Gomez MT, Perez MT. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest. 2006; 18: 462–465.

Garkavenko O., Obriadina A., Meng J., Anderson D.A., Benard H.J., Schroeder B.A., et al., Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand, J. Med. Virol. (2001) 65:525–529.

Gelberg, H.B., Patterson, J.S., Woode, G.N., 1991. A longitudinal study of rotavirus antibody titers in swine in a closed specific pathogen-free herd. Vet. Microbiol. 28, 231–242.

Halbur P.G., Kasorndorkbua C., Gilbert C., Guenette D., Potters M.B., Purcell R.H., et al., Compar- ative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human, J. Clin. Microbiol. (2001) 39:918–923.

Herremans M , Bakker J , Duizer E , et al. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity . *Clin Vaccine Immunol* . 2007;14:562–568.

Huang F.F., Haqshenas G., Guenette D.K., Halbur P.G., Schommer S.K., Pierson F.W., et al., Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States, J. Clin. Microbiol. (2002) 40:1326–1332.

Jameel S, Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins.J Virol. 1996;70:207-16.

Kabrane-Lazizi Y, Fine JB, Elm J, Glass GE, Higa H, Diwan A, et al. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. Am J Trop Med Hyg. 1999a; 61:331-5.

Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped.J Virol. 1999b; 73:8848-50.

Kamar N , Abravanel F , Selves J , et al. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation . *Transplantation* . 2011a; 89:353–360

Kamar N , Bendall RP , Peron JM , et al. Hepatitis E virus and neurologic disorders . *Emerg Infect Dis* . 2011b;17:173–179.

Kamar N , Weclawiak H , Guilbeau-Frugier C , et al. Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients .*Transplantation* . 2012 Jan 31; [Epub ahead of print]

Kasorndorkbua C, Thacker BJ, Halbur PG, Guenette DK, Buitenwerf R M, Royer RL, Meng XJ.. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus.Can.J.Vet.Res. 2003;67: 303-6

Kasorndorkbua C, Guenette DK, Huang FF, Thomas PJ, Meng XJ, Halbur PG. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. J.Clin.Microbiol. 2004; 42: 5047-52.

Khuroo MS, Dar MY. Hepatitis E: evidence for person-to-person transmission and inability of low dose immune serum globulin from an Indian source to prevent it. Indian J Gastroenterol. 1992;11:113-6.

Krawczynski K, Kamili S, Aggarwal R. Global epidemiology and medical aspects of hepatitis E. Forum (Génova). 2001;11: 166-79.

Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS.Hepatitis E in pregnancy.Int J Gynaecol Obstet. 2004;85:240-4.

Leblanc D, Ward P, Gagne MJ, Poitras E, Muller P, Trottier YL, et al. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. Int J Food Microbiol. 2007; 117: 160–166.

Lee YH, Ha Y, Ahn K K, Chae C. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs.Vet.J.2009; 179: 417-21.

Legrand-Abravanel F , Thevenet I , Mansuy JM , et al. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections . *Clin Vaccine Immunol* . 2009;16:772–774

Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat.Emerg Infect Dis 2005;11:1958-60.

Masia G, Orrù G, Liciardi M, Desogus G, Coppola RC, Murru V, Argiolas M, Orrù G. Evidence of hepatitis E virus (HEV) infection in human and pigs in Sardinia, Italy. J Prev Med Hyg.2009; 50:227-31.

Mallet V, Louvet A , Chakvetadze C , et al. Ribavirin treatment for chronic hepatitis E: a case-series. *Hepatology* .2010;52:919A–1020A

McCreary C., Martelli F., Grierson S., Ostanello F., Nevel A., Banks M., Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom, Vet. Rec. (2008) 163:261–265.

Meng X, Wiseman B, Elvinger F, Guenette D, Toth T, Engle R et al. Prevalence of antibodies to hepatitis e virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. J Clin Microbiol 2002; 40: 117-22

Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, et al. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. Arch Virol. 1998;143:1405-15.

Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:9860-5.

Meng XJ. Swine hepatitis E virus: cross-species infection and risk in xenotransplantation. Curr Top MicrobiolImmunol.2003; 278:185-216.

Meng X.J., Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk, Vet. Microbiol. (2010) 140:256–265.

Meng XJ. Recent advances in Hepatitis E Virus. Journal of Viral Hepatitis.2010; 17: 153-61.

Munné MS, Vladimirsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, Guarnera E, Molina V, Monfellano M, Schlauder G, González J. Identification of the First Strain of Swine Hepatitis E Virus in South America and Prevalence of Anti-HEV Antibodies in Swine in Argentina. Journal of Medical Virology. 2006; 78:1579–1583

Okamoto H. Genetic variability and evolution of Hepatitis E Virus. Virus research.2007; 127: 216-28.

Olsen B, Axelsson-Olsson D, Thelin A, Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. Scand J InfectDis. 2006; 38:55-8.

Organización Mundial de la Salud. Consejo ejecutivo. 126.ª reunión - EB126.R16 - Punto 4.12 del orden del día 23 de enero de 2010. Hepatitis virales.

Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. Vet. Res. (2010) 41:46

Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. J Hepatol. 2000; 33:826-33.

Pischke S, Wedemeyer H. Chronic hepatitis E in liver transplant recipients: a significant clinical problem?. Minerva GastroenterolDietol. 2010; 56:121-8.

Pischke S, Suneetha PV , Baechlein C , et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients . *Liver Transpl* . 2010; 16:74–82

Previsani N, Lavanchy D. Hepatitis E. Genève: World Health Organization. Department of Communicable Disease Surveillance and Response; 2001.

Purcell RH, Emerson SU. Animal models of hepatitis A and E. ILAR.J.2001; 42:161-77.

Purcell RH , Emerson SU . Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease . *J Hepatol* . 2008;48:494–503

Rendón JC, Navas MC, Hoyos MC, Cortés FM, Correa G, Sepúlveda ME, Yepes N, Jaramillo S, Zuleta JJ, Almanza R. Evidencia serológica y molecular de la circulación del virus de la hepatitis E en Medellín. REVISTA INFECTIO. 2010; 14(S1):34

Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young L M, Fry KE, Bradley DW. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis.Science.1990; 247: 1335-9.

Rodriguez-Arrioja, G.M., Segales, J., Calsamiglia, M., Resendes, A.R., Balasch, M., Plana-Duran, J., Casal, J., Domingo, M., 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Am. J. Vet. Res. 63, 354–357.

Rogeé S, Talbot N, Caperna T, Bouquet J, Barnaud E and Pavio N. New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. Journal of General Virology (2013), 94, 549–558.

Rutjes S.A., Lodder W.J., Bouwknegt M., de Roda Husman A.M., Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR, J. Virol. Methods (2007) 143:112–116.

Seminati C., Mateu E., Peralta B., de Deus N., Martin M., Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain, Vet. J. (2008) 175: 130–132.

Singh S, Mohanty A, Joshi Y, Deka D, Mohanty S and Panda S. Mother-to-Child Transmission of Hepatitis E Virus Infection. Indian Journal of Pediatdcs, 2003

Schlauder G. Viral hepatitis: molecular biology, diagnosis, epidemiology and control. En: Mushahwar A, editor. Perspective in medial virology. Amsterdam: Elsevier; 2004. p. 199-222.

Shrestha MP , Scott RM , Joshi DM , et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine . *N Engl J Med* .2007;356:895–903

Skidmore S. Overview of hepatitis E virus.Curr Infect Dis Rep. 2002; 4:118-23.

Smith JL. A review of hepatitis E virus. J Food Prot. 2001;64: 572-86.

Souto, F.J., Fontes, C.J., Parana, R., Lyra, L.G., 1997. Short report: further evidence for hepatitis E in the Brazilian Amazon. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 57, 149–150.

Takahashi M., Nishizawa T., Tanaka T., Tsatsralt- Od B., Inoue J., Okamoto H., Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan, J. Gen. Virol. (2005) 86: 1807–1813.

Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. Virology.1991; 185:120-31.

Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. Lancet. 2003;362:371-3.

Tosoncin da Silva, Mendes de Oliveira J, Lamarca C, de Almeida K , Alves M, José Dutra F.J. Prevalence of hepatitis e virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 107(3): 338-341, May 2012

Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Govindarajan S, Shapiro M, Gerin JL, et al. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. ProcNatlAcadSci USA. 1994;91:10198-202.

Wedemeyer H, Pischke S, Manns M. Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. Gastroenterology. 2012; 142: 1388–1397

Wedemeyer H , Pischke S . Hepatitis: hepatitis E vaccination—is HEV 239 the breakthrough? . *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* .2011;8:8–10

Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, Meng XJ. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. J.Clin.Microbiol. 2001; 39: 3040-6.

Withers MR, Correa MT, Morrow M, Stebbins ME, Seriwatana J, Webster WD, et al. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. Am J Trop Med Hyg. 2002;66:384-8.

Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. Lancet. 1980;2:876-9.

Worm HC, Schlauder GG, Brandstatter G. Hepatitis E and its emergence in non-endemic areas. Wien KlinWochenschr. 2002;114:663-70.

Word HC, Van der Poel WH, Brandstatter G. Hepatitis E: an overview. Microbes Infect. 2002;4:657-66.

Wu T , Zhu FC , Huang SJ , et al. Safety of the hepatitis E vaccine for pregnant women: a preliminary analysis. *Hepatology* .2011 Dec 13; [Epub ahead of print]

Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, et al. 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. 2003;84:2351-7.

Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. J Virol. 1997;71:9045-53

Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, Panda SK, Jameel S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein.J Virol. 1999;73:4074-82.

Zheng Y, Ge S, Zhang J, Guo Q, Ng MH, Wang F, et al. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. J Infect Dis. 2006;193:1643-9.

Zhu FC , Zhang J , Zhang XF , et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial . *Lancet* . 2010;376:895–902.

Zhu Y, Yu X, Huang F, Yu R, Dong S, Si F, Zhang Y, Li Z. Determination of the full-genome suquence of Hepatitis E Virus (HEV), SAAS-FX17 and use as a reference to identify putative HEV genotype 4 virulence determinants. Virology Journal 2012, 96; 264.

2. Seroprevalencia del VHE en cerdos faenados en Antioquia y clasificación de municipios productores de cerdo según su nivel de seropositividad.

Resumen

El virus de hepatitis E (VHE) es un patógeno importante en salud pública que se transmite principalmente por vía fecal-oral, específicamente a través de agua contaminada. La transmisión directa entre personas es baja; y hay evidencia científica que demuestra el potencial zoonótico del virus y el riesgo de transmisión al humano a través de agua y alimentos. Se conoce que el cerdo es susceptible a la infección, pero se desconoce como este virus afecta esta especie, su circulación, el papel que juegan los cerdos en la epidemiología de la enfermedad, su prevalencia, los genotipos del virus circulantes, su distribución geográfica y finalmente, los factores de riesgo para la transmisión a los humanos. Esta investigación tuvo como objetivo determinar la exposición al VHE en cerdos faenados en Antioquia mediante técnicas serológicas de detección de IgG anti VHE, y clasificar los municipios productores de cerdo según su nivel de seropositividad. Para esto, se tomaron muestras de sangre a una población de 1000 cerdos en etapa de finalización (población infinita, confianza de 95%, error del 3% y una prevalencia del 50%) durante el faenado. Las plantas de faenado muestreadas fueron seleccionadas por el alto número de animales sacrificados por mes, abarcando el sacrificio legal de la mayoría de los cerdos procedentes de las zonas de importancia en producción porcina del departamento; además, se tuvieron en cuenta los municipios de procedencia de los cerdos sacrificados para consumo humano. La seroprevalencia y circulación del VHE se determinó mediante pruebas de Elisa (detección de IgG) que se adaptó para determinar IgG anti VHE de cerdos, a partir de un kit comercial para detección de IgG anti VHE de humanos. Basándose en los resultados serológicos, los municipios se clasificaron en tres niveles de acuerdo al esquema propuesto por Mousing et al., (1997): nivel 1: menor del 10% de seropositividad, nivel 2: Entre 10% y 50% de seropositividad y nivel 3: Mayor al 50% de seropositividad. Se analizó además la positividad a anticuerpos IgG anti-VHE por subregiones de Antioquia. El análisis estadístico fue desarrollado mediante la plataforma R. Los resultados serológicos muestran que el 26.3% de los cerdos evaluados que llegaron a las plantas de beneficio de Antioquia presentaron anticuerpos IgG anti-VHE, lo que sugiere que en algún momento de su vida estuvieron expuestos al virus.

Palabras Clave: Cerdos, Hepatitis E, Plantas de faenado, Seroprevalencia, Zoonosis

Abstract

The hepatitis E virus (HEV) is an important pathogen in public health, is known to be transmitted by fecal-oral route, especially through contaminated water. Direct transmission between individuals is low, but it is known that the pig is susceptible to infection. There is scientific evidence demonstrating the zoonotic potential of the virus and the risk of transmission to humans through food and water. In Colombia HEV has been detected in a human in the city of Medellín, however, several factors are unknown for this virus and its circulation in pigs, the role of this species in the epidemiology of the disease, its prevalence, genotypes circulating virus in these animals, their geographical distribution and finally, the risk factors for transmission to humans. This research aims to demonstrate and determine the presence of hepatitis E virus (HEV) using serological and classify pork producing municipalities by level of seropositivity. In this way determine the risk of transmission and spread to humans even provide methods and analyzes to lay foundation to understand its impact on the country and thus establishing future surveillance and control programs. To accomplish this, we investigated the seroprevalence and circulation of HEV in different mills using ELISA tests that detect IgG to a population of 1,000 pigs being finalized (infinite population, 95% confidence, error of 3% and a prevalence of 50%), by taking blood samples during preparation in the five major mills Antioquia department. Based on the serological results, the municipalities were classified into three levels according to the scheme proposed by Mousing et al., 1997. Level 1: less than 10% seropositivity, level 2: Between 10% and 50% seropositivity and level 3: Greater than 50% seropositivity. Also analyzed positivity to anti-VHE IgG antibodies by region of Antioquia. With the data obtained we calculated the overall prevalence in the population of 1000 pigs and dressing each plant is from. Statistical analysis was developed based on the distribution of the tool finite mixtures platform Mixtools R. Serological results show that the 26.3% of pigs tested that came to Antioquia beneficiation plants, showed anti-HEV IgG antibodies, suggesting that at some point in their lives were exposed to the virus.

Key Words: Pigs, Hepatitis E, Slaughterhouses, Seroprevalence, Zoonoses

2.1 Introducción

La Hepatitis E, es conocida como hepatitis no A, no B de transmisión entérica y donde el Virus de la Hepatitis E (VHE) es el responsable de la infección. Sus características clínicas y epidemiológicas en humanos son las de una hepatitis aguda (Emerson y Purcell, 2003). La infección es transmitida por vía fecal-oral y principalmente ocurre a través de aguas contaminadas con heces, puede manifestarse en forma de casos esporádicos como de brotes epidémicos. Estos casos ocurren con mayor frecuencia en áreas con condiciones sanitarias y suministro de aguas inadecuados, y se presenta como la causa principal de hepatitis aguda (Kabrane-Lazizi et al., 1999). El primer brote documentado de VHE fue registrado en Delhi (India) entre 1955 y 1956, en él se pudieron registrar29.000 casos de hepatitis ictérica, sin embargo, fueron atribuidos a una infección por el virus de la hepatitis A (VHA). Posteriormente, se confirmó que este brote se debía a infección por VHE. Este brote fue causado por aguas contaminadas con heces, de origen residual, vertidas al río que suministraba el agua a las plantas potabilizadoras de la ciudad, lo que confirmó que el tratamiento con cloro aplicado no prevenía la contaminación originada por VHE (Wong et., al 1980).

El Consejo Ejecutivo de la OMS (2010), consideró las hepatitis virales como un problema grave de salud pública mundial, y expresó su preocupación por la falta de progreso en prevención y control en países en desarrollo. Inicialmente, la mayoría de los casos descritos correspondían a pacientes de países no endémicos, que habían viajado recientemente a zonas endémicas,; sin embargo, es cada vez más frecuente que se describan más casos de hepatitis E esporádicas en pacientes que nunca han viajado a dichas zonas (Smith, 2001; Worm et al., 2002). Se han descrito hasta el momento cuatro genotipos de VHE (genotipos 1 a 4) en mamíferos, con distinta distribución geográfica. El genotipo 3 y 4 de VHE además de humanos, también han sido encontrados en animales de granja, lo que apoya la hipótesis de que la hepatitis E sea una zoonosis (Emerson y Purcell, 2003; Schlauder, 2004). Dentro del genotipo 3 se agrupan los aislados de regiones consideradas hasta ahora como no endémicas (Norte y Suramérica, y gran parte de Europa) y representan un grupo de secuencias más diverso (Ahmad, 2011).

El primer reporte de seroprevalencia para VHE en cerdos y la caracterización de VHE porcino se realizaron en los años noventa (Balayan et al., 1990; Meng, 1997). Hay estudios que demuestran que VHE es capaz de atravesar la barrera interespecie, y apuntan a que la infección por VHE constituye un importante problema de salud pública, en el que se ven implicadas las personas que trabajan con cerdos, las cuales presentarían un alto riesgo de padecer la infección por este virus (Tosoncin da Silva et al., 2012). De hecho, se han publicado varios estudios en los que se demuestra una elevada prevalencia de anticuerpos contra VHE (anti-VHE) en personas que tienen exposición ocupacional a cerdos (Emerson y Purcell, 2003; Schlauder, 2004).

Aunque el VHE es la causa principal de hepatitis de transmisión entérica en países con condiciones de aguas inadecuados y considerados como endémicos, en Colombia se desconoce su situación epidemiológica. En Medellín se demostró la infección con el virus de la hepatitis E en una persona con diagnóstico de hepatitis aguda, sin marcadores moleculares para hepatitis A, B y C (Rendón et al., 2010), pero no se conocen evidencias de circulación de éste virus en cerdos en Colombia.

La circulación detectada en el ganado porcino en diferentes países del mundo, sugiere la posibilidad de que esta enfermedad sea una zoonosis transmitida por aguas contaminadas con excretas porcinas o por carne contaminada destinada para el consumo humano (Feagins et al., 2007). Considerando entonces la infección de VHE como un problema de salud pública, es importante tratar de conocer el estatus sanitario para VHE de los municipios productores de cerdo en Antioquia, y luego clasificarlos según su riesgo epidemiológico de diseminar la infección, y de ésta manera proponer un programa de vigilancia y control epidemiológico de la infección.

2.2 Objetivos

General

Determinar serológicamente la exposición de cerdos al Virus de la Hepatitis E (VHE), en cinco plantas de faenado, y clasificar los municipios productores de cerdo en Antioquia según su nivel de seropositividad.

Específicos

1. Determinar la presencia de anticuerpos IgG anti-VHE en suero sanguíneo de 1000 cerdos sacrificados en cinco plantas de faenado de Antioquia.
2. Clasificar los municipios de procedencia de los animales de acuerdo al nivel de seropositividad.

2.3 Metodología

2.3.1 Consideraciones éticas.

Este proyecto no implicó daños al medio ambiente y a la salud humana o animal a corto, mediano o largo plazo. Los protocolos y procedimientos empleados en esta investigación contaron con la aprobación del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (Acta No CEMED-226 del 14 de Octubre de 2010).

2.3.2 Tipo de estudio

Estudio observacional descriptivo.

2.3.3 Toma de muestras de cerdos en plantas de beneficio.

Se tomaron muestras de sangre de 1000 cerdos (población infinita, confianza de 95%, error del 3% y una prevalencia del 50%) sacrificados en las cinco principales plantas de beneficio de cerdos de Antioquia; consideradas así, debido al alto número de animales sacrificados por mes, a los municipios de influencia respecto a la procedencia de los cerdos faenados, y al destino de la carne para consumo humano.

Para la toma de muestras, las plantas de beneficio debían cumplir con los siguientes requisitos: Tener sistemas de identificación de los animales de acuerdo a su municipio de procedencia; Ser certificadas y tener permisos de comercialización.

La selección de los animales se realizó aleatoriamente utilizando un muestreo sistemático en intervalos de 10, esto con el fin de tener animales de diferentes municipios de Antioquia. A los cerdos seleccionados para muestrear, se les asignó un código único de identificación que permitió conocer el municipio de procedencia, la planta donde fue sacrificado y el sexo del animal para caracterizar la población. Los animales muestreados presentaban edades entre 5 y 6 meses, y pesos entre 90 y 100 kg. Estos animales pasaron la inspección sanitaria realizada por el médico veterinario de la respectiva planta de faenado antes de ingresar al lugar. Los animales fueron sacrificados bajo las disposiciones propias del lugar, donde en un principio el animal fue insensibilizado (CO_2 o choque eléctrico), para luego ser izado y realizar la exanguinación de la vena yugular (produciendo la muerte por desangrado), momento en el cual se tomaron las muestras de sangre. Estas muestras se almacenaron en neveras a 4°C y se transportaron al laboratorio, donde se extrajo el suero sanguíneo mediante centrifugación, para luego ser almacenadas a -70 °C hasta su determinación y análisis.

2.3.4 Análisis serológico ELISAS IgG anti-VHE

Las muestras de sangre se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos para obtener el suero sanguíneo. El tamizaje para la presencia de anticuerpos IgG contra VHE de las muestras de cerdo

se realizó mediante el estuche comercial HEV IgG (DIA.PRO Diagnostic Bioprobes) para humanos, con algunas modificaciones que se describen más adelante.

A la par con el muestreo en las plantas de faenado, se procedió a muestrear lechones recién nacidos que no hubieran consumido calostro, esto con el fin de utilizarlos como controles negativos para las pruebas de ELISA, tratando de esta manera de asegurar la ausencia de IgG por parte de los mismos, esto debido al tipo de placentación que tienen los cerdos, el cual no permite un intercambio directo de sangre de la madre a sus lechones. La toma de muestras de sangre en los lechones neonatos se realizó al momento de ligar el ombligo, y se obtuvo una cantidad promedio de 3 ml por animal. La cantidad total de lechones recién nacidos muestreados fue de 6. Estas muestras se tomaron en el Centro de Producción San Pablo, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Las pruebas de ELISA se realizaron mediante un kit comercial HEV IgG (DIA.PRO Diagnostic Bioprobes) específico para la detección de IgG anti VHE en suero de humanos. El kit comercialmente se utiliza para análisis serológicos en humanos, pero en éste caso, se reemplazó el conjugado que contiene anticuerpos policlonales de cabra para IgG humano propio del kit, por un anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo (Thermo scientific). Lo anterior se realizó según la metodología de validación de la técnica descrita por Munné et al., (2006). Para la validación de esta técnica, la autora (Laboratorio Nacional de Referencia Hepatitis Virales y Gastroenteritis en INEI), facilitó muestras de suero y de heces de cerdos, que en investigaciones previas habían demostrado ser positivas tanto para anticuerpos IgG, como para RNA de VHE respectivamente.

Para validar el funcionamiento de la prueba, se empleó en cada plato una columna de controles con el anticuerpo humano (provisto por el kit) utilizando un control negativo (C-) por triplicado, un calibrador (Cal) por duplicado, y un control positivo (C+) en cada plato. En la segunda columna del plato se usaron como control negativo, las muestras de suero sanguíneo de lechones que no consumieron calostro, y nuevamente los controles positivos provistos por el kit, pero se utilizó un anticuerpo secundario específico para cerdos (C+ c) (Munné et al., 2006a). El control positivo (C+ c) se asignó a una muestra de cerdo que en repetidos ensayos estuviera por encima de los valores del C+ provisto por el kit. En el resto del plato se dispusieron las muestras de suero de los cerdos, dispensando 10 µl de muestra para cada pozo, y se evaluó en lector de ELISA (espectrofotómetro) BioTek® a 450nm.

2.3.5 Estimación del valor de corte para la positividad de anticuerpos IgG en sueros de cerdo.

La estimación del punto de corte para la positividad de anticuerpos tipo IgG en suero de cerdos se realizó con base en la distribución de frecuencias de la DO_{450}, aplicando un método estadístico para la resolución de mezclas finitas implementado en la herramienta Mixtools en el paquete estadístico R, tal como lo referencia Rutjes et al., (2010).

2.3.6 Clasificación de municipios según nivel de seroprevalencia

Basados en los resultados serológicos, los municipios se clasificaron en tres niveles de acuerdo al esquema propuesto por Mousing et al., (1997), así:

- **Nivel 1**: (Seropositividad baja): Municipios donde la seroprevalencia de VHE se considera baja o aceptable (< = 10 % de las muestras positivas)

- **Nivel 2**: (Seropositividad media): Municipios donde la seroprevalencia de VHE se considera moderada (>10 % hasta 50%).

- **Nivel 3**: (Seropositividad alta): Municipios donde la seroprevalencia de VHE es considerada alta (> 50%).

2.3.7 Análisis estadístico

La selección de los animales se hizo de manera aleatoria utilizando un muestreo sistemático. El tamaño de muestra se calculó utilizando el programa Epi-Info 2.000 a partir de una población infinita con una confianza de 95%, error del 3% y una prevalencia del 50%. La totalidad de la información recopilada se consignó en una base de datos de Excel para su respectivo análisis estadístico.

El análisis de repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de ELISA se basó en la evaluación estadística de las dispersiones de los resultados, mediante el Coeficiente de Variación (CV), la Desviación Estándar (DE) y el Error Estándar (EE). Para el análisis de positividad de anticuerpo anti-VHE en cerdos en las plantas de beneficio y según la subregión de procedencia, se estimaron las frecuencias de los datos y las diferencias entre proporciones (con una prueba de χ^2 con un nivel de confianza del 95%, considerando significativos valores de $p < 0.01$).

2.4 Resultados

2.4.1 Estandarización de la técnica de ELISA anti-VHE para cerdos

El primer ensayo consistió en la detección de anticuerpos específicos para VHE en muestras de cerdo utilizando el anticuerpo conjugado provisto por el kit y el anticuerpo secundario IgG anti-cerdo (Thermo scientific) adquirido comercialmente. Se realizó un ensayo utilizando el anticuerpo secundario a diferentes concentraciones, con el fin de determinar la concentración ideal que se debía utilizar, ya que el fabricante recomendaba diluciones entre 1:5000 y 1:20000. Además, se comprobaron los controles de calidad del kit utilizando en cada uno de los ensayos el control negativo (C-), control positivo (C+) y el calibrador (Cal). Para validar el uso de muestras porcinas, se trabajó con muestras de suero de lechones recién nacidos que no hubieran consumido calostro para representar el control negativo (C- c), ya que se asegura que la madre no haya transferido anticuerpos por medio del calostro (Dos Santos et al., 2009). La muestra positiva (C+ c), se asignó a una muestra cualquiera de cerdo que en repetidos ensayos se obtuvo una DO (densidad óptica) similar a los valores del C+ provisto por el kit y es una muestra positiva por PCR para el ORF1 de VHE en muestra de hígado, como se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1: Detección de anticuerpos específicos para VHE en cerdos, con anticuerpo conjugado provisto por el kit comercial y el anticuerpo secundario IgG anti cerdo.

	1		2	
A	**Blanco**	**0**	**Cerdo(Ev6)**	**2,358**
B	**C -**	0,003	**C - c**	0,031
C	**C -**	-0,013	**C - c**	0,033
D	**C -**	-0,01	**C - c**	0,026
E	**Cal**	1,455	**Cal**	1,138
F	**Cal**	1,47	**Cal**	1,083
G	**C +**	2,769	**C + c**	2,646
H	**M. pos***	0,012	**M. pos***	1,266

* Muestra de cerdo previamente identificada como positiva por el Laboratorio Nacional de Referencia Hepatitis Virales y Gastroenteritis INEI, gentilmente donada por la Doctora Munné. En las columnas 1 y 2 del plato se ubican los controles para la estandarizar la técnica. En la columna 1 se utilizan los controles y los reactivos propios del kit, mientras que en la columna 2 se cambia el anticuerpo secundario por el anti-VHE de cerdo (dilución 1:5000). Al lado de las columnas se muestra su valor de densidad óptica (D.O 450) como resultado final. Ev6 es una muestra de cerdo cualquiera utilizada al azar.

Como se muestra en la tabla 2.1, Para la columna 1 se utilizó como anticuerpo secundario el anticuerpo anti-IgG humano, mientras que para la columna 2 se cambió el anticuerpo secundario provisto por el kit, por el anticuerpo anti-IgG de porcinos obtenido comercialmente. Los controles negativos tanto provistos por el kit como los elegidos en esta investigación (C-c) se realizaron por triplicado y se tuvieron densidades DO a 450nm muy por debajo de 1; de manera similar, los calibradores, que corresponden a un tercer control para la prueba, se trabajaron por duplicado y fue reconocido tanto por el anticuerpo anti IgG de humano suministrado por el kit (columna 1),

como por el anticuerpo anti IgG de cerdo (columna 2), que es denotado por las DO450nm mayores que 1. Los C+ del kit se incluyeron en un solo pozo como lo recomienda el kit y fueron reconocidos también por ambos anticuerpos.

Se obtuvo también como resultado, el anticuerpo conjugado anti-IgG de humano (provisto por el kit) no reconocía el anticuerpo primario de cerdo (IgG en suero) (columna 1, fila H); sin embargo, el anticuerpo secundario anti- IgG de cerdo fue capaz de reconocer tanto los anticuerpos primarios de cerdo, como los controles positivos y calibrador humano provistos por el kit (columna 2, filas E, F y G) (Tabla 2.1).

Los resultados con los reactivos del kit (columna 2) cumplieron con los controles de calidad recomendados por el kit luego de ser analizados (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Controles de calidad del estuche comercial HEV IgG (DIA.PRO Diagnostic Bioprobes).

Pozo	Requerimiento
En blanco	< 0,100 Densidad óptica (DO) 450 nm
Control negativo (C-)	Media < 0,050 Densidad óptica (DO) 450 nm después de restarle el blanco
Calibrador (Cal)	M/VC > 1
Control positivo (C+)	> 1,000 Densidad óptica (DO) 450 nm

VC: valor de corte
M= muestra

Al comparar los resultados preliminares del primer ensayo, se obtuvo una densidad óptica (DO) relativamente baja de la muestra suministrada por el Laboratorio Nacional de Referencia Hepatitis Virales y Gastroenteritis INEI (tabla 2.1, M.pos, columna 2, fila H), aunque positiva según las indicaciones del kit, en comparación con una muestra de cerdo de Antioquia, incluida en el ensayo (Ev6, Columna 2, fila A) esta tuvo una DO450nm más alta. Por este motivo y por tener baja cantidad del suero suministrado por dicho centro, se realizaron los ensayos posteriores con la muestra denominada C+c (como control positivo de cerdo).

Como se observa en la tabla 2.3, en la columna 1 se muestran las DO450nm de los controles de calibración del kit con el anticuerpo conjugado humano, y en las columna 2 y 3 se presentan las DO de los controles de calibración del kit con el anticuerpo secundario IgG anti cerdo en una dilución 1:5000 y 1:10000 respectivamente.

Tabla 2.3: Ensayo de dilución del anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo

		1 (DO450nm)		2 (DO450nm)		3 (DO450nm)
A	**Blanco**	0	**C-**	0,02377797	**C-**	0,018776179
B	**C -**	-0,0158953	**C +**	3,17218081	**C+**	1,964977728
C	**C -**	-0,00489793	**C +**	3,15670812	**C+**	1,995190388
D	**C +**	3,63382938	**Cal**	1,11494053	**Cal**	1,180409416
E	**C +**	3,49869672	**C + c**	2,68419545	**C + c**	1,539882652
F	**C + c**	0,01727615	**C- c**	0,33074569	**C- c**	0,182227133
G	**C- c**	0,00243026	**Ev2**	1,72695584	**Ev2**	0,655772178
H	**Ev2**	-0,00606631	**Ev3**	2,129290554	**Ev3**	1,41616122
		Conjugado del Kit		**1: 5000 Ab IgG**		**1: 10000 Ab IgG**

Los resultados obtenidos presentaron una disminución a la mitad de las DO450nm, similarmente a las muestras y calibradores cuando se utilizan las diluciones 1:5000 y 1:10000 del anticuerpo anti-IgG de cerdo.

Como resultado, cuando se realizaron diluciones del anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo, este disminuye en proporción a la dilución inicial (muestras C+c, EV2 y EV3 columna2 y 3), indicando que muestras con DO450nm bajas pueden considerarse como negativas, siendo positivas, o sea que serían resultados falsos negativos, cuando se hacen diluciones del anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo. Por esta razón se decidió trabajar los demás experimentos con el anticuerpo anti-IgG de cerdos en la dilución más concentrada correspondiente a 1:5000.

En la tabla 2.4 se muestra la interpretación de los resultados de la prueba, cuando la ELISA se realiza con muestras de humanos. Ésta se utilizó para evaluar la técnica, pues siempre en cada ensayo se dispuso de una fila de controles propios del kit, con los cuales se validaban los resultados del ensayo.

Tabla 2.4. Interpretación de resultados en muestras humanas según su DO dadas por el kit de ELISA.

M/VC	INTERPRETACIÓN
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Indeterminado
>1.1	Positivo

Al utilizar lechones recién nacidos que no hayan consumido calostro como control negativo, se obtuvieron DO450nm muy bajas, o sea verdaderamente negativas como se muestra en la tabla 2.5. Estas muestras de neonatos, se utilizaron en todos los ensayos posteriores como controles negativos de cerdos (C-c) en la columna de controles a la cual se adiciona el anticuerpo secundario IgG anti cerdo.

De esta manera se obtuvieron dos columnas de controles para la validación de la prueba de ELISA. La primera columna corresponde a los controles provistos por el kit, a una muestra de suero de

cerdo con DO450nm alta que fue considerada como positiva (C+c) y al conjugado humano. La segunda columna corresponde al lechón que no consumió calostro (C-c), al calibrador y al control positivo provisto por el kit, y la muestra C+c, y el anticuerpo secundario IgG anti cerdo.

Tabla 2.5: DO450 nm de los controles para validación de la prueba de ELISA

Conjugado del Kit Comercial		**Conjugado Anti-IgG cerdo Dilución 1:5000**	
C -	0,00217998	**C-c**	0,03277218
C -	0,00489078	**C-c**	0,02061772
C -	0,04478945	**C-c**	0,03021638
Cal	1,37212217	**Cal**	0,96049578
Cal	1,34631189	**Cal**	0,98473822
C +	3,52623946	**C +**	3,14126443
C+c	0,56229026	**C+c**	2,61153083

Para todos los experimentos posteriores en los que se cuantifican en los sueros porcinos las IgG de cerdos anti VHE, se tuvieron dos columnas de controles organizados como lo muestra la tabla 2.5 y cada uno debió pasar los estándares de control de calidad, para la columna 1 y 2 según la tabla 2.2. Para la estandarización de la ELISA con los C+c y C-c. Figura 2.1 muestra un ejemplo de las dos columnas de controles, mientras que en la figura 2.2 aparece un ejemplo del ensayo con el plato completo con las dos columnas de controles y el resto del plato con muestras de suero porcino del proyecto.

Figura 2.1: Ensayo de ELISA con solo dos columnas para examinar controles de calidad.

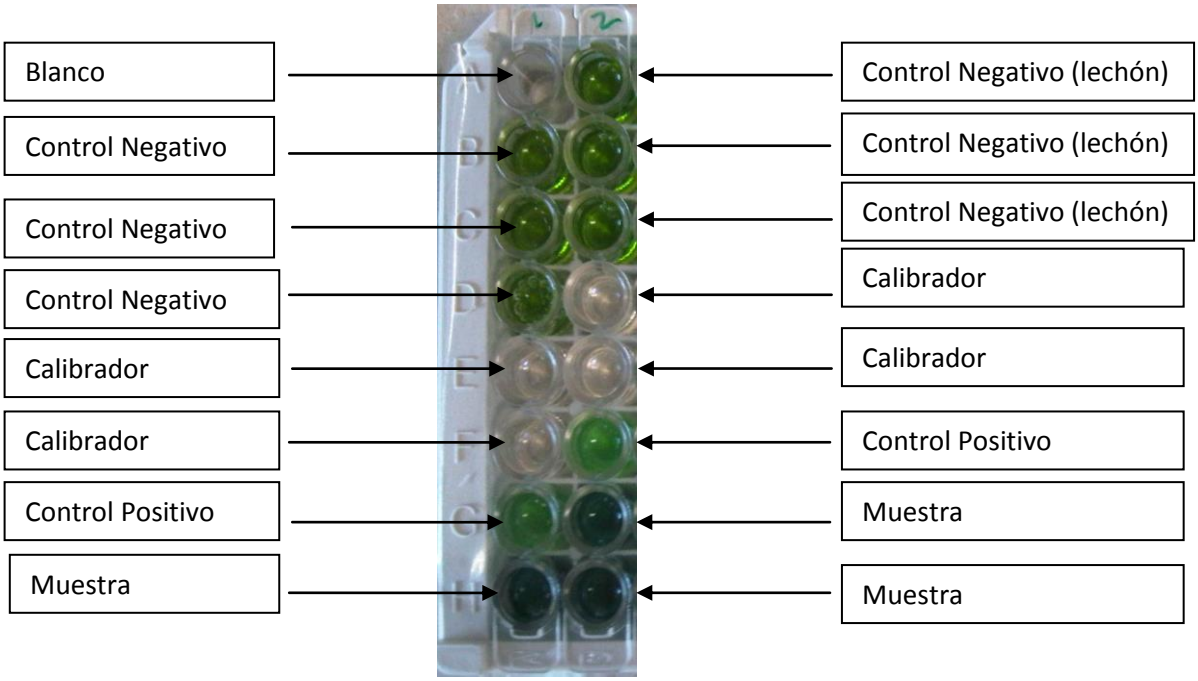
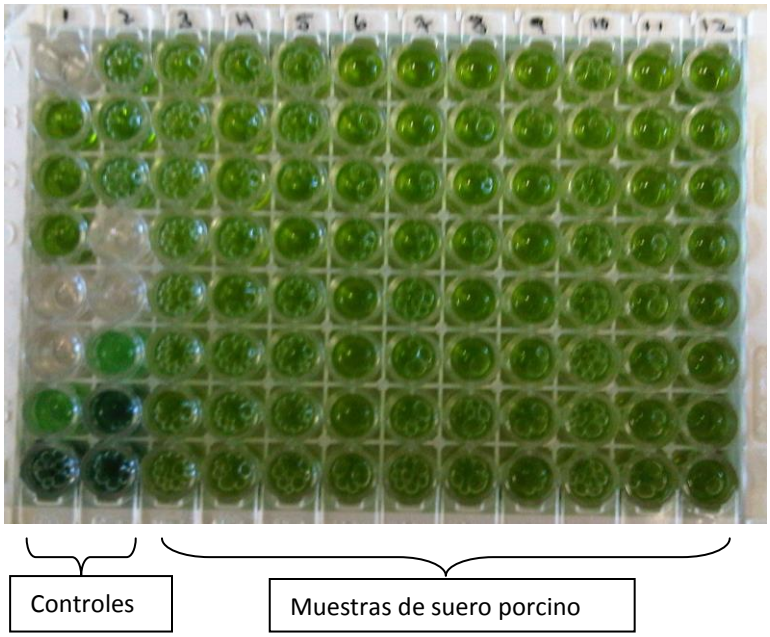


Figura 2.2: Ensayo de ELISA con plato completo con dos columnas de controles y diez columnas de muestras de suero de cerdo.



Luego de obtener los resultados de todos los ensayos anteriores se procedió a examinar las 1000 muestras de suero previstas en total y se examinó la reproducibilidad de la prueba de ELISA.

2.4.2 Reproducibilidad de los ensayos para los controles y reactivos del Kit de ELISA IgG anti-VHE.

Para observar la reproducibilidad de los ensayos se realizaron gráficas de Levey-Jennings para los controles de humanos y los controles de cerdo, donde se determinó que ningún ensayo superará dos desviaciones estándar.

En las figuras 2.3, 2.4, y 2.5 se muestra la representación de los gráficos de Levey-Jennings del control de calidad para los reactivos provistos por el kit, los ensayos se realizaron para el Control Negativo (C-), Calibrador (Cal) y Control Positivo (C+) respectivamente.

Figura 2.3: Gráficos de Levey-Jennings del Control (-)

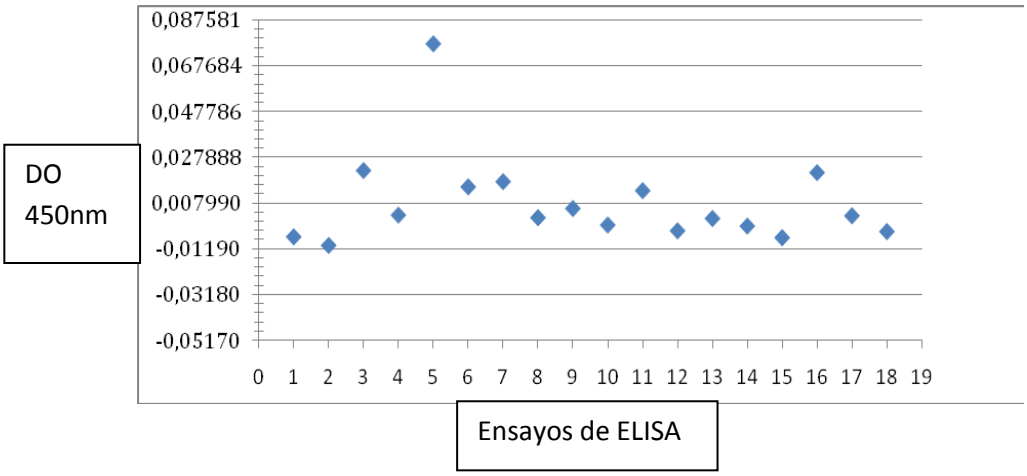


Figura 2.4: Gráficos de Levey-Jennings del Calibrador Kit

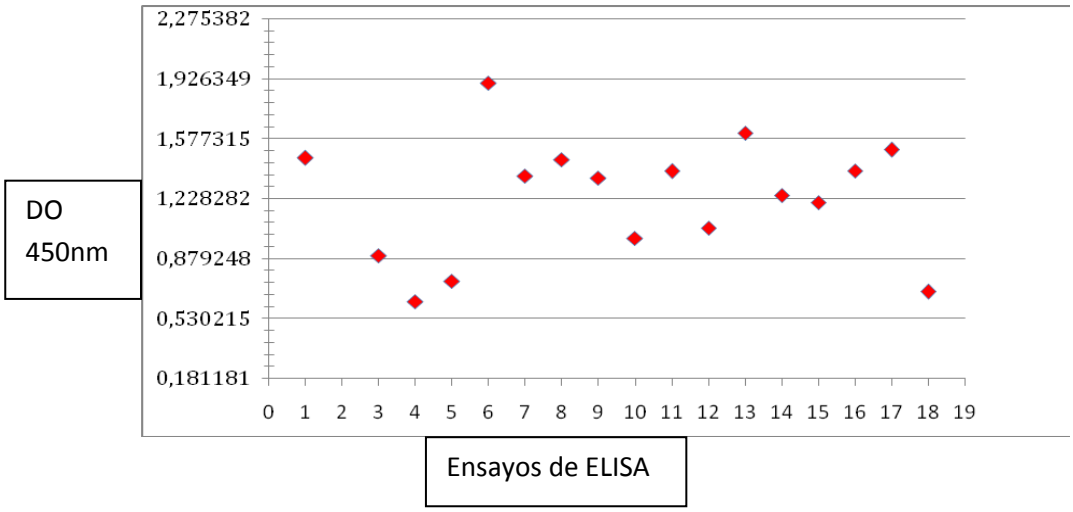
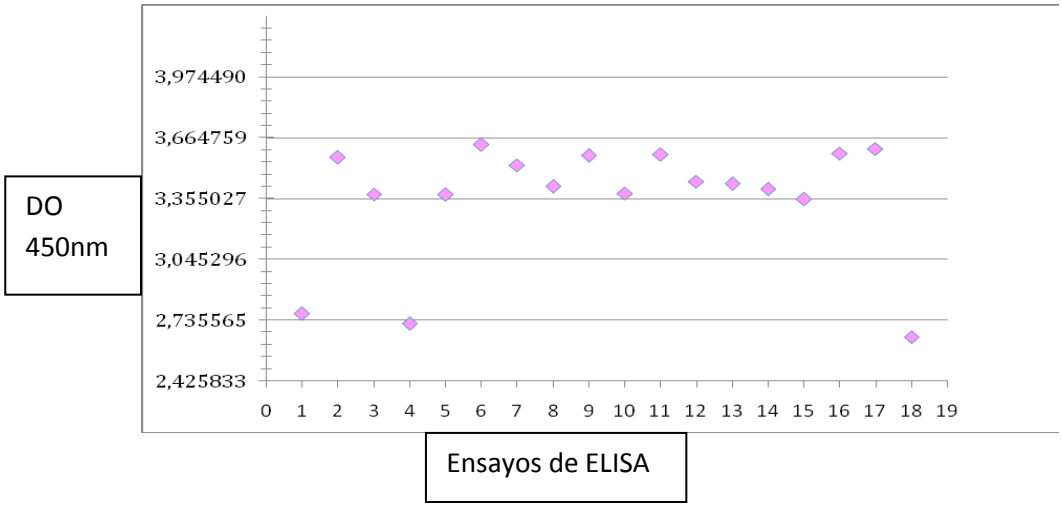


Figura 2.5: Gráficos de Levey-Jennings del Control Positivo Kit



La finalidad de las gráficas mostradas anteriormente, fue evaluar la calidad de la técnica que se está realizando, y poder así validar los resultados que se obtienen. Teniendo así que los valores de DO 450nm de estos controles, generalmente se mantuvieron acordes a lo reportado por el kit utilizado. Hay que aclarar, que en algunos de los 18 ensayos aquí mostrados, se tuvieron valores de DO que no cumplían con los parámetros dados en la tabla 2.4 para su validación. Situación por la cual se repitieron cuando no cumplían.

2.4.3 Reproducibilidad de los ensayos para los controles de cerdos, con anticuerpo secundario Anti-IgG de cerdo.

En las figuras 2.6, 2.7, 2.8 y 2.9, se muestran los gráficos de Levey-Jennings para los controles positivos: C+c, (C+) del kit y Calibrador del kit con anticuerpo secundario anti-IgG porcino, y finalmente el control negativo (C-) de los lechones sin consumir calostro.

Figura 2.6: Gráficos de Levey-Jennings del C+c

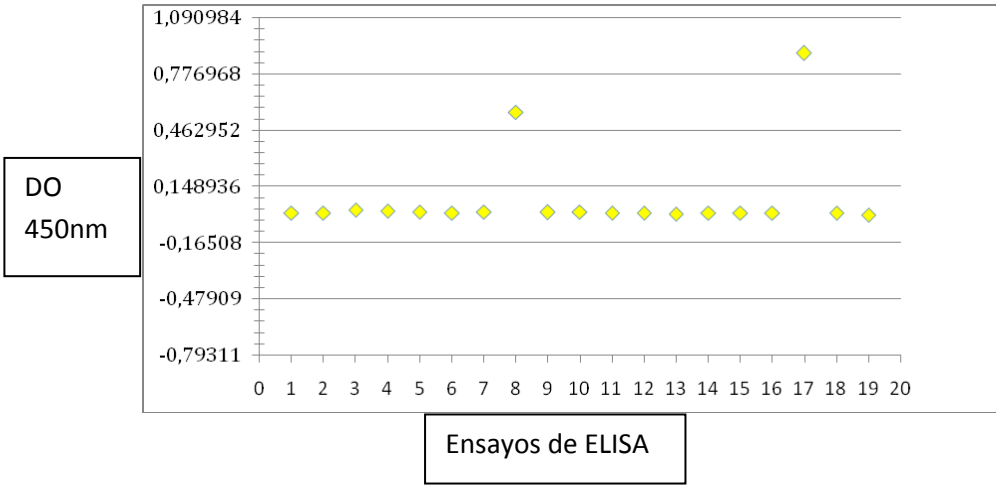


Figura 2.7: Gráficos de Levey-Jennings del c+ del kit

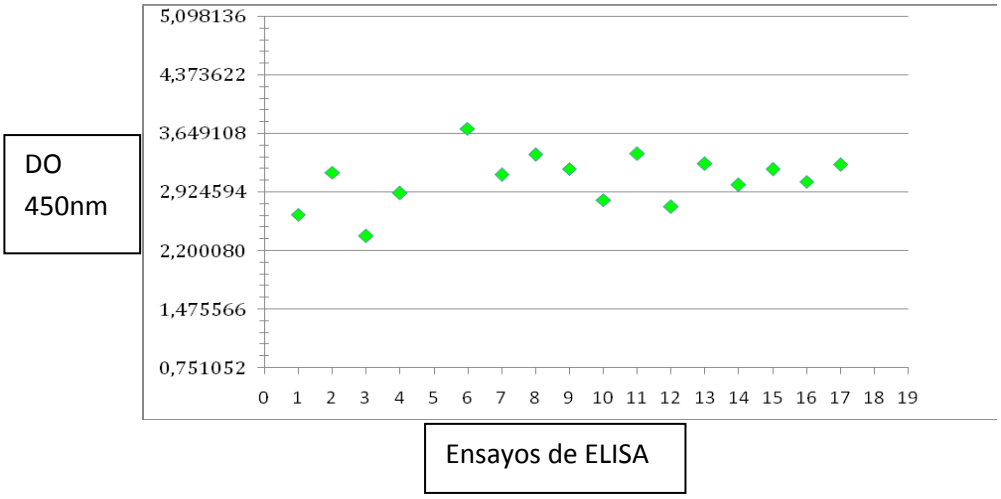


Figura 2.8: Gráficos de Levey-Jennings del Calibrador kit con anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo

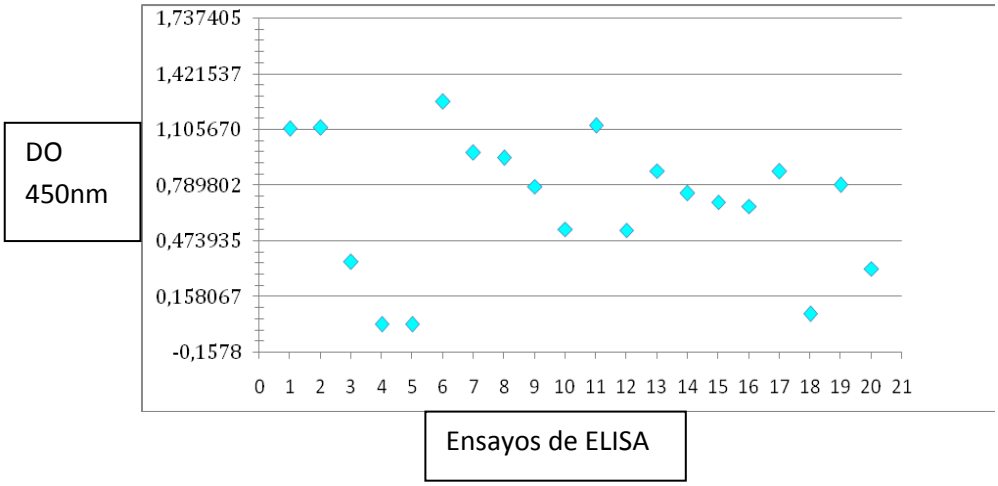
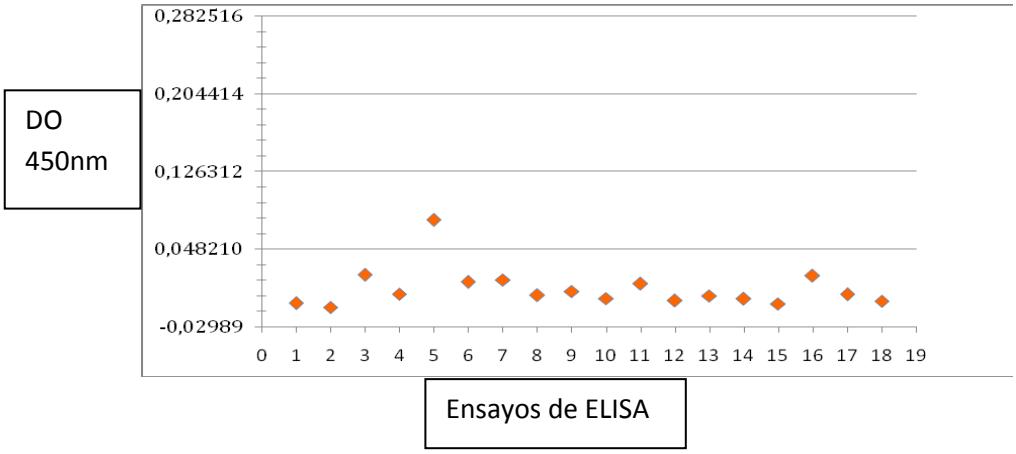


Figura 2.9: Gráficos de Levey-Jennings del C-c



En estas gráficas se puede observar, como posterior a los ensayos realizados para validar la prueba con cada uno de los controles y calibrador utilizando el anticuerpo secundario anti-VHE de cerdo, éste cumple con los parámetros de calidad dados en la tabla 2.6 para los controles de la prueba

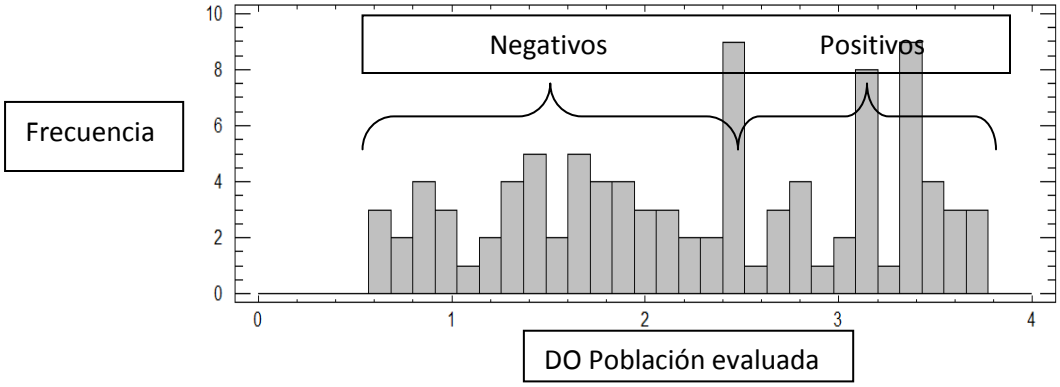
Tabla 2.6: control de calidad interno para los controles de la prueba ELISA anti-VHE.

Parámetro	**Exigencia**
Pocillo Blanco	Valor < 0.100 DO 450nm
Control Negativo (C-)	Valor medio < 0.050 DO 450nm después de leer el blanco
Calibrador	M/Co > 1
Control Positivo	Valor > 1.000 DO 450nm

2.4.4 Determinación de seroprevalencia para VHE en cerdos faenados en Antioquia.

Se analizó el comportamiento de las DO en la población de las 1000 muestras de suero de cerdos faenados en cinco plantas de beneficio de Antioquia, y se observó que la población no tuvo un comportamiento normal y presentaba dos subpoblaciones (Figura 2.10), lo que dificultó observar animales verdaderamente negativos y positivos.

Figura 2.10: Distribución de la población de muestras de 1000 cerdos tomados en plantas de beneficio.



Basados en los resultados obtenidos por Rutjes et al., (2010), quienes partieron de dos subpoblaciones de valores positivos y negativos de anticuerpos IgG, IgM e IgA, de sueros porcinos evaluados con *double-antigen sándwich* ELISA dasELISA , las cuales se encontraban mezcladas dando lugar a lo que se denominó un modelo de mezclas finitas, y basados en la distribución muestral de los 1000 animales (fig 2.10), se estimó el punto de corte para determinar una muestra de suero de cerdo positiva a anticuerpos IgG contra VHE en la DO450nm de 3.31, y se determinó la seroprevalencia para VHE en suero de cerdos faenados en Antioquia utilizando este mismo modelo. Para separar los componentes de la muestra (Componente 1 sueros Negativos y Componente 2 sueros positivos), la distribución de mezclas finitas fue corrida con el paquete para

R denominado Mixtools sobre la variable DO (tabla 2.7). La estimación de la seropositividad total arrojó como resultado que el 73.7% de la población total evaluada pertenece a la subpoblación de seronegativos con una densidad óptica (DO) promedio de 1.87 y una desviación estándar de 0.73. Por otro lado, el 26.3% de la población pertenece a la subpoblación de los seropositivos, con una DO promedio de 3.37 y una desviación estándar de 0.18 para el VHE.

Tabla 2.7: Seropositividad de 1000 muestras de suero porcino, discriminado por Componente 1 sueros Negativos y Componente 2 sueros positivos.

	Componente 1	**Componente 2**
Observación	0.737361	0.262639
DO promedio	1.879271	3.379786
Desviación estándar	0.733514	0.188317

En la tabla 2.8 se muestran los resultados de la estimación de los porcentajes de cerdos positivos y negativos para anticuerpos IgG anti-VHE en los sueros de cerdo, esta vez realizando la distribución por cada una de las plantas de beneficio evaluadas. Por situaciones éticas no se dicen los nombres de las plantas y estas se numeran de 1 a 5

Tabla 2.8: Proporciones de positivos y negativos ante IgG anti-VHE en cada una de las plantas de beneficio.

	Planta 1		**Planta 2**		**Planta 3**		**Planta 4**		**Planta 5**	
	Negativo	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**	**Negativo**	**Positivo**
Proporción	0.268308	0.731692	0.750566	0.249434	0.704540	0.295460	0.565099	0.434901	0.646739	0.353261
Media	0.819099	2.202203	2.076107	3.746896	1.772252	3.559160	1.661735	3.466158	1.696893	3.459488
DS	0.202427	0.880350	0.923951	0.203245	0.773029	0.257938	0.718478	0.299101	0.564445	0.386017

En la tabla anterior se puede observar como en todas las plantas de beneficio se tomaron muestras de cerdos que resultaron positivas para IgG anti-VHE, aunque la proporción de positividad variara de 0.73 hasta 0.24.

2.4.5 Clasificación de municipios según nivel de seroprevalencia de VHE.

De los 125 municipios del departamento de Antioquia en las 1000 muestras de sueros tomadas se obtuvieron muestras provenientes de 37 de ellos en diferentes proporciones, las cuales dependian de la planta de beneficio en la que se tomaron las muestras y la influencia porcícola que tiene cada municipio. En cada planta de beneficio se evaluaron diferentes municipios, y en estos a su vez, se tomaron muestras de cerdos de diferentes granjas. En todos los municipios evaluados se encontraron muestras postivas (al menos 1). Los valores de seroprevalencia en los cerdos evaluados varió desde un 5% a un 100%. En la tabla 2.9, se muestran los resultados obtenidos al

hacer la clasificación porpuesta por Mousing et al., (2007), en la cual se han clasificado en tres niveles dependiendo de los porcentajes de positividad para el total de animales en todos municipios evaluados.

Tabla 2.9: Clasificación de los 37 municipios en tres niveles de seroprevalencia en cerdos dependiendo del porcentaje de positividad para IgG anti-VHE en muestras de suero porcino.

	Nivel 1 (≤ 10 %)	**Nivel 2 (> 10% < 50%)**	**Nivel 3 (≥ 50%)**
Municipios Positivos %	8.6	71.4	20

Se puede observar como el Nivel 2 de la clasificación, en la cual se ubicaban los municipios con una seropositividad de anticuerpos IgG anti-VHE entre 10% y 50%, se encuentra la mayor proporción de municipios positivos, en todos los niveles de la clasificación se determinó positividad, y por tanto, exposición de los cerdos al VHE en alguna etapa de su vida.

Al obtener los resultados de los análisis serológicos, de los 1000 cerdos evaluados en plantas de beneficio de estos 37 municipios, se eligieron los 10 municipios que presentaron niveles de seropositividad altos, esto con el fin de hacer un seguimieto de los municipios y las subregiones con mayor prevalencia de VHE en el Departamento. Es necesario aclarar que se tuvo un sesgo a la hora de la elección de los municipios, debido que se tuvieron en cuenta los municipios que presntarona niveles altos de positividad, además que tuvieran la mayor producción porcicola de Antioquia. En la tabla 2.10, se muestran los resultados de seropositividad para estos 10 municipios seleccionados, no obstante, no se mencionan los nombres de los municipios por condiciones éticas.

Tabla 2.10: Resultados de seropositividad para 10 municipios representativos de antioquia, tanto por su porcentaje de positividad para IgG anti-VHE, como por su producción porcícola.

Municipio	**Seropositividad (%)**
1	44.8
2	37.5
3	44.4
4	40.3
5	36.5
6	25.0
7	15.3
8	71.4
9	25.0
10	37.7

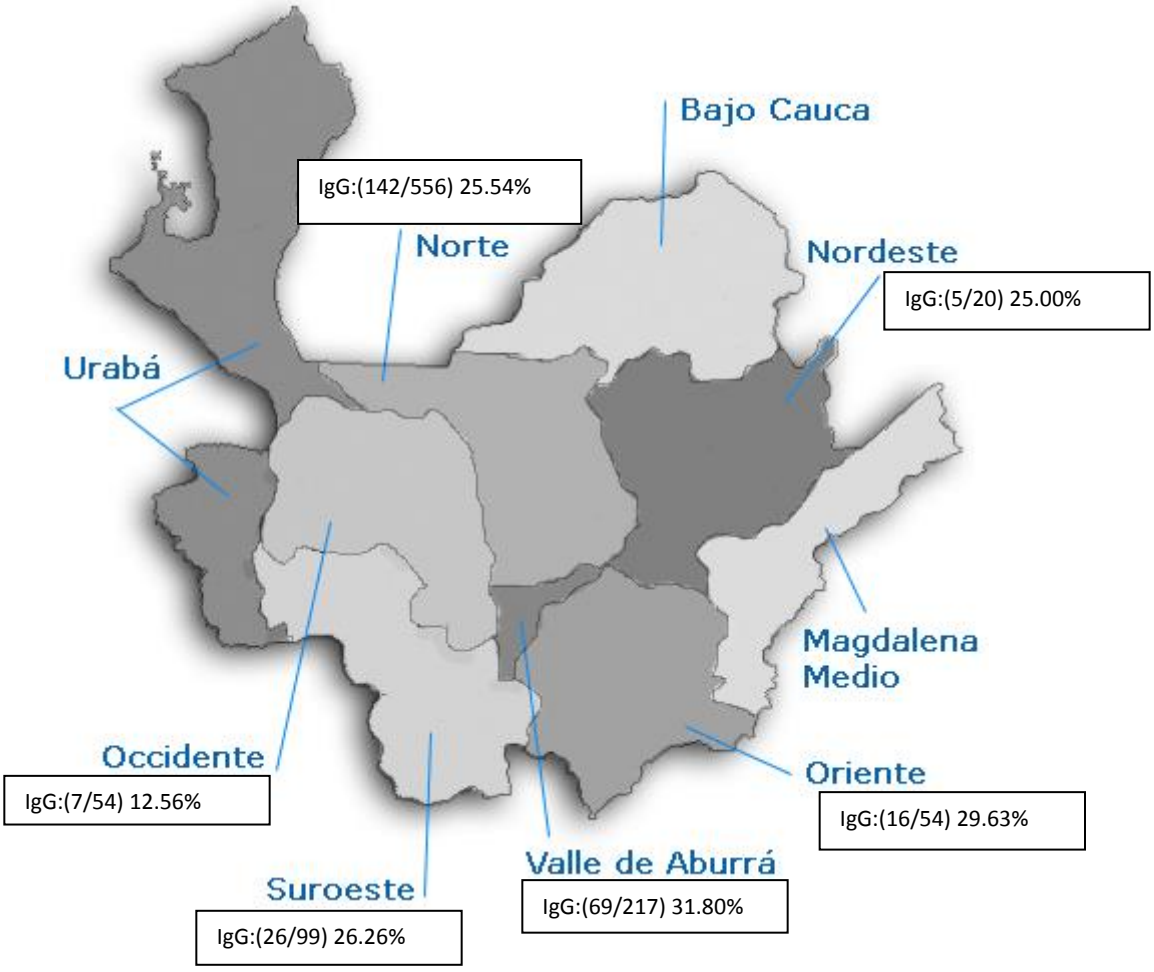
Esta tabla muestra como en los 10 municipios seleccionados por la seroprevalencia para IgG anti-VHE, los porcentajes de positividad variaron de 15.3% a 71.4%. indicando que se tuvieron en cuenta solo los de niveles 2 y 3 de la clasificación, teniendo 9 para el nivel 2 y 1 para el nivel 3,

estos, como ya se mencionó, se eigieron por su positividad y por la representatividad en la producción porcícola de Antioquia. La secuencia en la que se disponen los municipios no tienen ningún orden.

2.4.6 Resultados de seroprevalencia por subregiones de procedencia de los cerdos en el departemento de Antioquia.

Con los resultados obtenidos, se realizó un agrupamiento de los análisis serológicos de positividad a anticuerpos IgG en anti-VHE para VHE, por las diferentes subreiones de Antioquia (figura 2.11).

Figura 2.11: Subregiones de procedencia de los cerdos muestreados en cinco plantas de beneficio de Antioquia. Resultados de positividad para cada tipo de anticuerpo: (número de positivos/número de muestras) porcentaje%.



Se puede observar como de 6 de las 9 subregiones de Antioquia, se pudo obtener muestras de animales en las plantas de beneficio muestreadas. Además se ve como los porcentajes variaron de 12.5% a 31.8% siendo e Valle de Aburrá la subregión con la mayor cantidad de positivos para anticuerpos IgG-anti VHE.

2.5 Discusión

Aunque el kit de ELISA utilizado en esta investigación es comercializado para detección de anticuerpos anti VHE en suero de humanos, se logró la estandarización de éste para determinar IgG de cerdo anti VHE remplazando el anticuerpo secundario por un anti-IgG de cerdo (Munné et al., 2006b). Lo anterior, ha sido recomendado por Rutjes et al., (2010) con otros kit de ELISA para VHE en otra especie animal. La reproducibilidad de la técnica se demostró por medio de las gráficas de Levey-Jennings, ya que el Valor de Corte (VC) del kit se basa en el uso de sueros humanos negativos como control no reactivo, se puede sobre o sub-estimar el VC para otras especies, en este caso los cerdos. Fue necesario entonces, realizar la estandarización de la técnica de ELISA para el estuche comercial adaptándola para la realización de las pruebas, utilizando controles negativos y positivos de sueros de cerdos y así evaluar la presencia de anticuerpos anti-VHE en sueros de cerdos obtenidas de las plantas de beneficio de Antioquia.

Debido a que no existen investigaciones en las que se ha evaluado serológicamente la presencia del VHE en muestras de sangre de cerdos que llegan a plantas de beneficio en Colombia, esta información podría ser considerada como una evidencia serológica pionera del VHE en porcinos de este país. Reportes de seroprevalencia de anticuerpos anti-VHE han sido descritos en varias especies animales además de humanos alrededor del mundo (Schlauder et al., 1998; Pina et al., 2000; Munné et al., 2006). Entre estas especies, los cerdos han presentado niveles altos de anticuerpos contra VHE, sugiriéndose esta especie como uno de los reservorios principales para este virus (Bradley et al., 1995, Meng, 2010, Wang, 2012). Geng et al., (2011) reportaron porcentajes de seropositividad del 81.17% en cerdos adultos destinados para sacrificio y posterior consumo humano en China, siendo este valor mucho más alto al hallado en esta investigación. Por su parte en España, Jiménez de Oya et al., (2011), detectaron un 20.4% de positividad (de 1441 cerdos) para IgG anti-VHE en porcinos de este país. En Alemania Wacheck et al., 2012 hallaron mediante ELISA, una positividad del 68.6% (en 516 muestras) de positividad para IgG anti-VHE en cerdos que llegaban a plantas de beneficio. Según estas investigaciones, los resultados hallados en este estudio, son o similares, o menores a los reportados en diferentes lugares del mundo.

En América Latina han sido varias las experiencias al estudiar la detección de anticuerpos anti-VHE en porcinos. Ibarra et al., (2007), realizaron una investigación para determinar la seropositividad anti-VHE en porcinos de diferentes etapas de vida en Chile. Al igual que en esta investigación, Ibarra et al., (2007) reemplazaron el conjugado anti-humano propio del kit por un conjugado anti-porcino, detectando un 7% de anticuerpos anti-VHE en un total de 200 muestras sanguíneas.

En la presente investigación, se determinó que el 26.3% de los porcinos evaluados que llegan a las plantas de faenado presentan anticuerpos tipo IgG anti-VHE, lo que sugiere que en alguna etapa de su vida estuvieron en contacto con el virus. Estos resultados al ser comparados con los resultados obtenidos en España son altos, mas no para los resultados de Europa y América Latina. Se sabe además que los anticuerpos IgG anti-VHE pueden presentar un comportamiento variable

durante las diferentes etapas de la vida de los cerdos, al ser trasmitidos de madres a hijos mediante calostro, o al estar expuestos al patógeno en algún momento de su vida (Dos Santos et al., 2009).

Los cerdos en Colombia para consumo humano presentan edades entre los 5 y 6 meses de vida, por lo cual es de especial importancia profundizar en el conocimiento del comportamiento de este virus en los cerdos, y su posible transmisión a los humanos con y sin contacto.

Un estudio en 357 cerdos en el sur de Brasil (Vitral et al., 2005), reportó una prevalencia de anticuerpos del 95% en cerdos de más de 5 meses de edad, que es la edad promedio de comercialización de cerdos en Colombia. En Brasil, Dos Santos et al., (2011), determinaron la presencia de VHE en el líquido biliar de cerdos comerciales (en un 9,6% de 115) que llegan a plantas de faenado, lo que hace pensar que no solo se pueden encontrar anticuerpos anti-VHE en cerdos a los 5 meses, sino que además puede estar replicándose en estos animales, siendo esto bastante importante para las condiciones de nuestro país donde el sacrificio de los cerdos es a edades similares. En Argentina, Munné et al., (2006b) realizaron análisis con ELISA comercial, similares a los realizados en esta investigación, aunque ellos reemplazaron el conjugado propio del kit, por anti-inmunoglobulina de cerdo (Dako) en una dilución 1/6600.Los animales evaluados en este estudio, se clasificaron como verdaderos positivos o como verdaderos negativos, basado en las densidades ópticas obtenidas mediante los ensayos de ELISA y usando la distribución de mezclas finitas, como se mostró previamente en la figura 2.10. Las muestras aparecen como una mezcla de valores positivos y negativos por los valores de la prevalencia estimada. Situación similar se mostró en la investigación realizada por Rutjes et al., (2010) en Holanda, pero en ese estudio se utilizaron cerdos en plantas de beneficio, jabalíes, ciervos y corzos salvajes para determinar su seropositividad a VHE.

Basados en la clasificación que se planteó para agrupar las procedencias de los sueros de los cerdos evaluados, esta mostró que en el nivel 2 se encontraba el mayor porcentaje de municipios con animales positivos para IgG anti-VHE (71.4%), en donde el riesgo de contacto con el virus es medio (entre 10 y 50%).
Sin embargo, en investigaciones realizadas alrededor del mundo sobre el VHE, se han encontrado diferencias en los resultados de seropositividad para los cerdos, estas diferencias podrían ser debidas, al menos parcialmente, a la diferente estructura de la producción porcícola, las rutinas de manejo con los animales y las prácticas de higiene aplicada en estas granjas.

Nuestros resultados sugieren que a la edad de sacrificio de los cerdos en Colombia (5 meses aproximadamente), éstos pueden presentar niveles considerables de anticuerpos IgG anti-VHE circulando, lo cual indica que en alguna etapa de su vida tuvieron contacto con el virus, situación por la cual es necesario plantear estrategias de prevención y control de esta infección en cerdos, que puedan asegurar no contaminar fuentes de agua con heces que contengan el virus y la inocuidad de los productos alimenticios derivados de éstos cerdos; y de esta manera proteger la salud del consumidor final.

Con esta investigación se logró demostrar la presencia de anticuerpos IgG anti-VHE en cerdos que llegan a las principales plantas de beneficio de Antioquia desde diferentes municipios productores en este departamento, sugiriendo esto, que en alguna etapa de su vida éstos animales tuvieron contacto con el virus.

Además, en esta investigación se pudieron clasificar 10 municipios que presentaban mayores porcentajes de seropositividad ante el VHE, además de ser representativos productores de cerdo en Antioquia. Esta clasificación basada en las 1000 muestras de cerdos tomadas en plantas de beneficio de Antioquia da una idea de cómo es la dispersión del virus en este departamento, y es una referencia a nivel nacional dado que Antioquia es el principal productor de cerdos del país.

Al analizar la procedencia de los cerdos muestreados en las cinco plantas de beneficio, se identificó que los animales muestreados provenían de 6 de las 9 subregiones del departamento de Antioquia. Se pudo observar como en las diferentes subregiones del departamento donde se agruparon los municipios de procedencia de los cerdos, en todos se presentaba positividad. En el Occidente se encontró la menor positividad 12.56%, mientras que en el Valle de Aburrá se presentaron los animales con el mayor porcentaje de positividad (31.80%). Cabe anotar que en la subregión Norte que es donde se produce la mayor cantidad de porcinos de Antioquia, se presenta un valor relativamente bajo (25.54%) de animales positivos. La proporción de cerdos positivos para la detección de anticuerpos IgG en la subregión Occidente fue significativamente menor que en las regiones del Valle de Aburrá ($p=0.0058$), Norte ($p=0.0399$) y Oriente ($p=0.0363$).

La obtención de esta información, aportará en el conocimiento acerca del Virus de la Hepatitis E en Colombia, además sentará las bases para futuros programas de prevención y control de este agente viral con potencial zoonótico.

2.6 Conclusiones

Se concluye que el Virus de la Hepatitis E (VHE) está circulando en varias poblaciones porcinas del departamento de Antioquia. Además, basados en los análisis, los animales que llegan a plantas de beneficio de Antioquia presentan anticuerpos IgG anti-VHE en edades entre 5 y 6 meses, edad en la cual éstos son comercializados para el consumo humano.

La información obtenida en esta investigación, beneficiará de manera indirecta a los porcicultores, comerciantes y a las plantas de beneficio que se dedican a la venta de cerdos y sus productos derivados, ya que al determinar la presencia de este, se pueden establecer medidas de bioseguridad en toda la cadena de producción y comercialización de cerdos y sus productos, lo cual lleva a que se mantengan estándares de calidad e inocuidad en la cadena.

Es importante continuar desarrollando investigaciones sobre el VHE en Colombia, y su influencia en la cadena porcícola, esperando impactar de manera positiva desarrollando herramientas para el control y erradicación del VHE, que lleven a disminuir la incidencia del virus en cerdos, generando productos de mejor calidad e inocuos y por tanto beneficiando a la población humana en general.

La aplicación de medidas higiénicas y de control para la contaminación con agentes zoonóticos, generarán un valor agregado al producto final, que favorecen la comercialización de los mismos y su apertura a nuevos mercados nacionales e internacionales.

Bibliografia

Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. Virus Research. 2011; 161: 47-58.

Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. J Med Virol. 1990; 32:58-9.

Bradley D. Hepatitis E virus: a brief review of the biology, molecular virology, and immunology of a novel virus. J.Hepatol. 1995; 22:140-5.

Dos Santos D, Salete de Paula V, Mendes de Oliveira J, Marchevsky R, Pinto M. hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. Veterinary Microbiology. 149 (2011), 236-241

Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus.Rev Med Virol. 2003; 13: 145-54.

Feagins A, Opriessnig T, Guenette D, Halbur P, Meng X. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. Journal of General Virology. 2007; 88: 912–917.

Geng J, Wang L, Wang X, Fu H, Bu Q, Liu P, Zhu Y, Wang M, Sui Y and Zhuang H. Potential risk of zoonotic transmission from young swine to human: seroepidemiological and genetic characterization of hepatitis E virus in human and various animals in Beijing, China. Journal of Viral Hepatitis, 2011. 18, 583–590

Ibarra H, Riedemann S, Reinhardt G, Calvo M. Presencia de anti-VHE en un estudio de cohorte de porcinos ¿reservorio animal de hepatitis E en Chile? Rev Méd Chile 2007; 135: 997-1001

Jiménez de Oya N, de Blas I, Blázquez A, Martín-Acebes M, Halaihel N, Gironés O, Saiz J and Escribano-Romero E. Widespread distribution of hepatitis E virus in Spanish pig herds. BMC Research Notes 2011, 4:412

Kabrane-Lazizi Y, Fine JB, Elm J, Glass GE, Higa H, Diwan A, et al. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. Am J Trop Med Hyg. 1999a;61:331-5.

Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:9860-5.

Meng XJ. 2010. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. Vet. Microbiol. 140:256–265

Mousing, J., Jensen, P. T., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B., Nielsen, J. P., Bech-Nielsen, S., 1997. Nation-wide VHE enterica surveillance and control in Danish slaughter swine herds. Prev.Vet.Med. 29, 247-261.

Munné MS, Vladimirsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, Guarnera E, Molina V, Monfellano M, Schlauder G, González J. Identification of the First Strain of Swine Hepatitis E Virus in South America and Prevalence of Anti-HEV Antibodies in Swine in Argentina. Journal of Medical Virology. 2006a; 78:1579–1583

Munné MS, Vladimirsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, et al. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. Journal of Medical Virology. 2006b; 78: 1579–1583.

Organización Mundial de la Salud. Consejo ejecutivo. 126.ª reunión - EB126.R16 - Punto 4.12 del orden del día 23 de enero de 2010. Hepatitis virales.

Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. J Hepatol. 2000; 33:826-33.

Rendón J, Navas M, Hoyos M, Cortés F, Correa G, Sepúlveda M, Yepes N, Jaramillo S, Zuleta J, Almanza R. Evidencia serológica y molecular de la circulación del virus de la hepatitis E en Medellín. REVISTA INFECTIO. 2010; 14(S1):34

Rutjes S, Lodder-Verschoor F, Lodder W, van der Giessen J, Reesink H, Bouwknegt M, RodaHusman A. Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. Journal of Virological Methods. 2010.

Tosoncin da Silva, Mendes de Oliveira J, Lamarca C, de Almeida K , Alves M, José Dutra F.J. Prevalence of hepatitis e virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 107(3): 338-341, May 2012

Wacheck S, Werres C, Mohn U, Dorn S, Soutschek E, Fredriksson-Ahomaa M, and Märtlbauer E. Detection of IgM and IgG Against Hepatitis E Virus in Serum and Meat Juice Samples from Pigs at Slaughter in Bavaria, Germany. Foodborne Pathog Dis. 2012 Jul;9(7):655-60

Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, Kwo PY, Knigge MF, Smalley DL, et al. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. Journal of General Virology. 1998; 79: 447–456.

Schlauder G. Viral hepatitis: molecular biology, diagnosis, epidemiology and control. En: Mushahwar A, editor. Perspective in medial virology. Amsterdam: Elsevier; 2004. p. 199-222.

Smith JL. A review of hepatitis E virus. J Food Prot. 2001;64: 572-86.

Vitral C, Pinto M, Lewis-Ximenez L, Khudyakov Y, dos Santos D, Gaspar A. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Apr;100(2):117-22.

Wang H, He Y, Shen Q, Wang X, Yang S, Cui L, Ren L, Sun G, Hua X, Shao S, and Zhanga W. Complete Genome Sequence of the Genotype 4 Hepatitis E Virus Strain Prevalent in Swine in Jiangsu Province, China, Reveals a Close Relationship with That from the Human Population in This Area. Journal of Virology. 2012 p. 8334 – 8335

Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. Lancet. 1980;2:876-9.

Worm HC, Schlauder GG, Brandstatter G. Hepatitis E and its emergence in non-endemic areas. Wien KlinWochenschr. 2002;114:663-70.

3. Determinación de la excreción del Virus de la Hepatitis E (VHE) mediante técnicas moleculares en heces de cerdo en plantas de beneficio en Antioquia.

Resumen

La hepatitis E es una forma de hepatitis aguda endémica en muchos países del mundo causada por el virus de la hepatitis E (VHE). El VHE es un patógeno importante en la salud pública, y se conoce que se transmite principalmente por vía fecal-oral, especialmente a través de agua contaminada con heces de infectados (humanos o cerdos) que están excretando el virus. La detección de este virus en diferentes especies animales, incluyendo los cerdos, sugiere que éstos podrían ser reservorios del virus y que esta enfermedad es una zoonosis. Esta investigación pretende determinar la presencia de VHE mediante técnicas moleculares en muestras de heces de cerdo tomadas en animales que llegan para beneficio en las principales plantas de faenado de Antioquia. Para determinar la presencia del RNA de VHE, se evaluaron 1000 muestras de suero porcino mediante análisis de ELISA, y de éstos se eligieron 150 muestras de heces de cerdos en etapa de finalización (confianza del 95%, error del 5% y una prevalencia del 11%,). Para determinar la presencia de RNA del VHE en las heces evaluadas, se extrajo RNA y se amplificó una porción de la región ORF-1 del virus mediante la técnica de RT-PCR. El análisis estadístico se desarrolló mediante el software R. La RT-PCR mostró que el 27.3% de las muestras evaluadas fueron positivas para la detección de RNA de VHE, variando desde un 7% a un 66% al agrupar las muestras por las diferentes subregiones del departamento. Los resultados de esta investigación demuestran la presencia del genoma de VHE en heces de cerdo sacrificados para su comercialización en Antioquia, región del país donde más carne de cerdo se produce y consume, poniendo de manifiesto la necesidad de seguir investigando sobre este virus y de esta manera establecer futuros programas de vigilancia y control para VHE.

Palabras Clave: Cerdos, Hepatitis E, Plantas de beneficio, RT-PCR, Zoonosis

Abstract

Hepatitis E is a form of acute hepatitis is endemic in many countries, due to the hepatitis E virus (HEV). HEV is an important pathogen in public health, is known to be transmitted by fecal-oral route, especially through contaminated water. The detection of this virus in different animal species including pigs, suggests that they could be reservoirs of the virus and that this disease is a zoonosis. This research aims to demonstrate and determine the presence of HEV using molecular techniques in pig feces samples taken in animals arriving for slaughter plants in the main benefit of Antioquia. To determine the presence of HEV RNA, 1000 samples were evaluated using analysis of porcine serum ELISA and of these 150 samples were selected pig feces nearing completion (95% confidence, error of 5% and a prevalence of 11%), so that one third of this population had a low percentage of anti-HEV IgG antibodies, the second and third average percentage the last third is a high percentage of immunoglobulins. To determine the presence of HEV RNA in the feces evaluated RNA was extracted and amplified a portion of the ORF-1 region of the virus by RT-PCR technique to the 150 samples. The statistical analysis software developed by R. RT-PCR showed that 27.3% of the samples tested were positive for detection of HEV RNA. The results of this study demonstrate the presence of the genome of HEV in feces of slaughtered pigs for marketing in Antioquia, part of the country where more pork is produced and consumed, highlighting the need for further research on this virus and thus establishing future surveillance and control programs for the HEV.

Keywords: Pigs, Hepatitis E, Slaughterhouses, RT-PCR, Zoonoses

3.1 Introducción

El virus de la hepatitis E (VHE), conocido previamente como hepatitis no A, no B de transmisión entérica, es una infección causada por el virus de la hepatitis E (VHE), cuyas características clínicas y epidemiológicas en humanos son las de una hepatitis aguda. La infección se transmite principalmente por vía fecal-oral a través de aguas contaminadas con heces, y se manifiesta tanto en forma de casos esporádicos como de brotes epidémicos, especialmente en áreas con condiciones sanitarias y suministro de aguas inadecuados, donde es la causa principal de hepatitis agudas (Kabrane-Lazizi et al., 1999). El Consejo Ejecutivo de la OMS (2010), consideró las hepatitis virales como un problema grave de salud pública mundial, y expresó su preocupación por el subdesarrollo en la prevención y control de este virus en países en desarrollo. Por lo anterior, se pretende implementar sistemas de vigilancia epidemiológica para obtener información confiable y orientar las medidas de prevención y control respectivas.

Recientemente en los países considerados no endémicos, la mayoría de los casos descritos como positivos para VHE correspondían a pacientes que habían viajado recientemente a zonas endémicas; sin embargo, en los últimos años cada vez se describen más casos de hepatitis E esporádicas en pacientes que nunca han viajado a dichas zonas (Smith, 2001; Worm et al., 2002). Se han descrito hasta el momento en humanos cuatro genotipos para VHE (genotipos 1 al 4) con distinta distribución geográfica. Los genotipos 3 y 4 de VHE también han sido encontrados en animales de granja, lo que apoya la hipótesis de que la hepatitis E sea una zoonosis. (Emerson y Purcell 2003, Schlauder 2004). Dentro del genotipo 3 se agrupan los aislados de regiones consideradas hasta ahora como no endémicas (Norte y Suramérica y gran parte de Europa) y representan un grupo de secuencias más diverso (Emerson y Purcell 2003, Schlauder 2004).

El primer reporte de seroprevalencia para VHE y su caracterización en cerdos fue en los años noventa (Balayan et al., 1990; Meng, 1997). Varios estudios han demostrado que el VHE es capaz de atravesar la barrera interespecie, y apuntan a que la infección por VHE constituye un importante problema de salud pública, en el que se ven implicadas las personas que trabajan con cerdos, las cuales presentarían un riesgo alto de padecer la infección por VHE (Tosoncin da Silva et al., 2012). De hecho, se han publicado varios estudios en los que se demuestra una elevada prevalencia de anticuerpos anti-VHE en personas que tenían una exposición ocupacional a cerdos (Emerson y Purcell 2003, Schlauder 2004).

Aunque el VHE es la causa principal de hepatitis de transmisión entérica en países con condiciones de aguas inadecuados y considerados como endémicos, en Colombia se desconoce su situación epidemiológica. En la ciudad de Medellín se demostró la circulación de virus de hepatitis E en una persona con diagnóstico de hepatitis aguda, sin marcadores moleculares para hepatitis A, B y C (Rendón et al., 2010); sin embargo, no se conocen evidencias de circulación de VHE en Cerdos en Colombia.

La circulación detectada en el ganado porcino en diferentes países del mundo, sugiere la posibilidad de que esta enfermedad sea una zoonosis transmitida por aguas contaminadas con excretas porcinas o por carne contaminada destinada para el consumo humano (Feagins et al., 2007). Considerando entonces la infección de VHE como un problema de salud pública, es importante tratar de conocer el estado sanitario de los municipios productores de cerdo en

Antioquia y clasificarlos según su nivel de seropositividad y posible foco para diseminar la infección, y de esta manera proponer un programa de vigilancia y control epidemiológico de la infección.

3.2 Objetivos

General

Determinar la presencia del genoma del virus de la hepatitis E (VHE) mediante técnicas moleculares en heces de cerdos en plantas de beneficio de Antioquia.

Específicos

1. Determinar molecularmente la excreción de VHE en heces de cerdos sacrificados en 5 plantas de beneficio del departamento de Antioquia.
2. Detectar mediante RT-PCR un fragmento de la región ORF-1 del VHE en heces de cerdo.
3. Correlacionar la excreción viral de VHE en heces y la seropositividad de cerdos sacrificados en plantas de beneficio de Antioquia.

3.3 Metodología

3.3.1 Consideraciones éticas.

Este proyecto no implicó daños al medio ambiente y a la salud humana o animal a corto, mediano o largo plazo. Los protocolos y procedimientos empleados en esta investigación contaron con la aprobación del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (Acta No CEMED-226 del 14 de Octubre de 2010).

3.3.2 Tipo de estudio.

Estudio observacional descriptivo.

3.3.3 Toma de muestras de cerdos en plantas de beneficio.

Se tomaron 1000 muestras de suero y heces correspondientes a los mismos animales sacrificados en las cinco principales plantas de beneficio de cerdos de Antioquia. De esta totalidad de muestras, se eligieron 150 cerdos que fueran representativos de los municipios más productores de cerdo de Antioquia, los cuales presentaban edades entre los 5 y 6 meses de edad, y pesos entre los 90 y 100 kg. Estos animales pasaron la inspección sanitaria por el médico veterinario de la respectiva planta de faenado antes de ingresar al lugar.

Para la toma de muestras, las plantas de beneficio cumplieron con los siguientes requisitos:

- ✓ Tener sistemas de identificación de los animales de acuerdo a su municipio de procedencia.
- ✓ Plantas certificadas y con permisos de comercialización.

La selección de los animales se realizó aleatoriamente utilizando un muestreo sistemático; a los cerdos seleccionados para muestrear, se les asignó un código único de identificación que permitió conocer el municipio de procedencia, la planta donde fue sacrificado y el sexo del animal para caracterizar la población.

Los cerdos se eligieron de manera aleatoria en intervalos de 10, esto con el fin de tener animales de diferentes municipios productores de cerdo de Antioquia. Esta aleatorización se hizo en la línea de ingreso para el faenado, cada animal se marcaba y se le tomaba aproximadamente 5 gramos de materia fecal directamente del recto. La marcación era con el fin de que las muestras de heces y de sangre fueran del mismo cerdo. Las heces recolectadas se almacenaron en neveras a 4°C, y se transportaron al laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín para luego ser almacenadas a -70 °C hasta su análisis.

3.3.4 Detección molecular de VHE a partir de muestras de heces porcinas.

3.3.4.1 Preparación de las muestras

Aproximadamente un gramo de heces fue resuspendido en 10 ml de PBS (suspensión al 10%). Después de homogenizar mediante vortex las heces se centrifugaron a 4.500 rpm durante 10 minutos (Forgách et al., 2010). A partir de este sobrenadante, se realizó la extracción de RNA.

3.3.4.2 Extracción de RNA

Para la extracción del RNA total se utilizaron 280 µl del sobrenadante, mediante el estuche comercial QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen Germany), siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante y apoyados en el protocolo reportado por Forgách *et al.,* (2010). La calidad y concentración del RNA se evaluó midiendo las densidades ópticas (DO260 y DO280) en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se verificó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%.

3.3.4.3 Transcripción reversa asociada a PCR (RT-PCR)

El RNA total obtenido de cada una de las muestras se sometió a una transcripción reversa para la obtención de cDNA, mediante la transcriptasa reversa (RevertAid™ Enzyme Mix) de Fermentas® siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó RevertAid Enzyme Mix (0.1U/µl) (Fermentas), 4µl de RT buffer 5X, 2 µl de dNTPs 10mM, 1 µl de hexámeros de primers 100 µM, RNA 5 µl y agua desinonizada hasta completar un volumen final de 25 µl. Se utilizó el siguiente perfil de temperaturas: un periodo inicial de 10 minutos a 25 °C, 60 minutos a 43.5 °C, y un periodo final de 5 minutos a 72 °C.

Al momento de la detección del genoma viral, ésta se realizó partir del cDNA usando una PCR anidada, empleando primers capaces de amplificar una región del ORF-1 genotipo 3 del VHE (Fogeda et al., 2009) (Tabla 3.1). Para la primera ronda de PCR, se empleó un volumen final de 25 µl, que contenía: 2.5 µl de Buffer 10X (Bioline), 2 µl de $MgCl_2$ 50mM, 1 µl de dNTPs (10µM) de cada dNTP, 2 µl de cada uno de los primers (ORF-1 F ORF-1 R), 0,2 µl de Taq DNA polimerasa (5U/µl), 3 µl de cDNA y agua desionizada hasta completar los 25 µl. El perfil de temperatura para esta PCR constó de una desnaturalización inicial a 94 °C por 4 minutos y para cada ciclo una desnaturalización a 94 °C por 38 segundos, annealing 45 segundos a 51 °C, extensión de 60 segundos a 72 °C, con una repetición de 39 ciclos. Esta primera PCR amplificó un fragmento de 634 pares de bases.

Tabla 3.1: Primers usados para la amplificación de una región del ORF-1 del VHE.

Primer	Sentido	Secuencia (5´- 3´)	Posición en el genoma
ORF1 F	Forward primera ronda	CCAYCAGTTYATHAAGGCTCC	9 – 29
ORF1 R	Reverse primera ronda	TACCAVCGCTGRACRTC	627 – 643
ORF1 FN	Forward nested	CTCCTGGCRTYACWACTGC	26 – 44
ORF1 RN	Reverse nested	GGRTGRTTCCAIARVACYTC	178 – 197

Tomado de Fogeda et al., (2009)

3.3.4.4 PCR anidada

La detección del genoma viral se realizó a partir del producto de PCR obtenido de las muestras de la primera ronda de PCR, usando una técnica de amplificación anidada la cual emplea cebadores degenerados capaces de amplificar el genotipo 3 del VHE (Fogeda et al., 2009)(Tabla 3.1). Esta PCR anidada se realizó utilizando 3 µl de producto de la PCR 1, 2.5 µl de Buffer 10X (Bioline), 2 µl de $MgCl_2$ 50mM, 1 µl de dNTPs (10µM) de cada dNTP, 2 µl de cada uno de los primers (ORF-1 FN y ORF-1 RN), 0.2 µl de Taq DNA polimerasa (5U/µl) y agua destilada hasta completar un volumen final de 25 µl. El perfil de temperatura para la segunda ronda de la PCR anidada fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos y para cada ciclo una desnaturalización a 94 °C por 35 segundos, annealing 48 segundos a 48 °C, extensión de 60 segundos a 72 °C, repitiéndose este ciclo por 35 veces. Estos cebadores amplifican fragmentos presentes en el ORF1 del genoma viral para obtener un producto final de amplificación de 171 pares de bases. Los fragmentos amplificados fueron verificados en gel de agarosa al 2.5% (70V por 40 min) usando EZ-Vision como agente intercalante. Para los ensayos siempre se utilizó un control positivo (muestras amplificadas previamente) y un control negativo (sin cDNA).

3.3.5 Análisis estadístico.

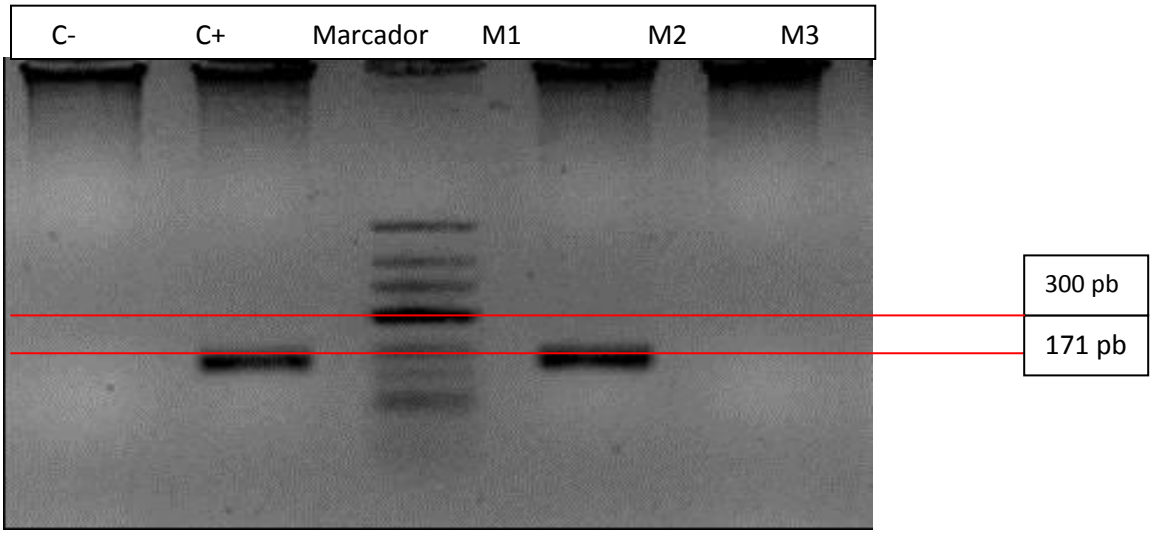
La selección de los animales se hizo de manera aleatoria utilizando un muestreo sistemático. El tamaño de muestra se calculó a partir de una población infinita con una confianza de 95%, error del 5% y una prevalencia del 11%, utilizando el programa Epi-Info 2.000. La totalidad de la información recopilada se consignó en una base de datos de Excel para su respectivo análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software R, al momento de hacer el análisis descriptivo de las variables consideradas en el estudio, éstas se expresaron por medio de frecuencias y porcentajes, y se discriminaron tanto por planta de beneficio como por subregión del departamento evaluada.

3.4 Resultados.

Se logró observar la banda de 171 pares de bases (pb) (Figura 3.1) en las muestras positivas y ausencia de ésta en las muestras de heces negativas.

Figura 3.1: Amplicón de 171 pb de la región OFR-1 de VHE en heces de plantas de beneficio.



En la tabla 3.2, se muestran los resultados obtenidos al realizar la técnica RT-PCR en las 150 muestras de heces de cerdo recolectadas en plantas de beneficio de Antioquia. Al analizar los datos se encontró diferencia significativa ($P<0.05$) entre las muestras de heces positivas y negativas de las 5 plantas de beneficio.

Tabla 3.2: Frecuencia y porcentaje de cerdo positivos y negativos a VHE por RT-PCR en heces.

RT-PCR en Heces de cerdo	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	109	72.7
Positivo	41	27.3

Al reunir los resultados obtenidos para RNA de VHE, y agruparlos por subregiones de Antioquia, se obtuvieron muestras de cinco de éstas (tabla 3.3), siendo representativas de las zonas de mayor producción porcícola en el departamento.

Tabla 3.3: Resultados de RT-PCR discriminados por subregión de Antioquia.

	Norte	**Occidente**	**Oriente**	**Valle de Aburrá**	**Suroeste**
Positivos (%)	7	33.3	66.6	37.2	35
Negativos (%)	93	66.7	33.4	62.8	65

Al agrupar las muestras de heces evaluadas por subregiones del departamento, se hallaron muestras positivas para la detección del genoma viral de VHE, indicando que el virus está circulando en los cerdos de Antioquia.

Correlación entre excreción de VHE en heces y la seropositividad de los cerdos.

Al relacionar la excreción del VHE en heces porcinas con la seropositividad hallada en las muestras de suero, se pudo determinar que de 72 muestras que fueron positivas para anticuerpos IgG por ELISA, solo 8 fueron positivas para la excreción viral en heces (Tabla 3.4), lo cual podría suponer algunos cerdos evaluados tuvieron contacto con el VHE en alguna etapa de su vida, generando anticuerpos IgG anti-VHE, pero que al momento de evaluarlos no presentaban excreción viral.

Tabla 3.4: comparación de análisis de ELISA (IgG) y pruebas moleculares (RT-PCR).

RT-PCR			ELISA (IgG)		
Positivo	Negativo	Porcentaje	Positivo	Negativo	Porcentaje
8	142	5.33%	72	78	48%

3.5 Discusión

Debido a que son pocas las investigaciones en las que se ha evaluado serológicamente la presencia de VHE, al igual que el genoma viral en muestras de sangre y heces de cerdos que llegan a plantas de beneficio en Colombia, esta información podría ser considerada como una evidencia molecular pionera del VHE en porcinos de este país

Geng et al., (2011) hallaron un porcentaje de positividad de 47.9% (194 muestras) para VHE en muestras de heces de cerdos, donde todos estos aislados fueron agrupados en el genotipo 4 de VHE, el cual infecta tanto cerdos como humanos.

Leblanc et al., (2010) han informado de la detección de RNA de VHE en heces y muestras de varios órganos de cerdos sacrificados en plantas de beneficio (ganglios linfáticos 25.5%, hígados 20.9%, bilis 18.6%, heces 13.9%). Además, en un estudio prospectivo realizado en Canadá por Leblanc et al., (2007), el l RNA de VHE se detectó en el 11.8% de las muestras de suero y en el 41.2% de las heces de animales en edad de sacrificio para su comercialización, reforzando además, la observación de que las técnicas moleculares son precisas en la evaluación de VHE (Leblanc *et al.,* 2007).

Se ha informado de la presencia de RNA de VHE en los tejidos, órganos y excretas de cerdos infectados experimentalmente (Meng et al., 1998; Williams et al., 2001; Banks et al., 2004; Kasorndorkbua et al., 2004) y en muestras procedentes de cerdos infectados de forma natural (de Deus et al., 2007; Vasickova et al., 2009). Sin embargo, la mayor sensibilidad de la detección de genoma viral se logra con muestras no accesibles cuando el animal está vivo, tales como hígado, ganglios linfáticos mesentéricos y bilis (de Deus et al., 2007).

Es necesario aclarar que a pesar de que se detectó un fragmento de la región ORF-1 del genoma del VHE en las muestras de heces de cerdo, esto no indica que el virus sea viable en el momento de la detección y pueda infectar a humanos u otros animales. Debido a lo anterior, se deben realizar más investigaciones que lleven a determinar la viabilidad de VHE en muestras de heces.

Como se observa en la tabla 3.2, el 27.3% de las muestras de heces evaluadas en esta investigación, fueron positivas para RNA de VHE. En 2012 Berto et al., hallaron un 32% de positividad para VHE en heces de cerdos en etapa de engorde, momento en el cual se evaluaron animales en esta investigación. Por su parte en España de Deus eta la., (2007), hallaron un 12.3% de positividad para RNA de VHE en heces de 65 cerdos evaluados. En 2008 Forgach et al., determinaron que el 21% (de 248) de muestras de heces porcinas presentaban RNA de VHE. En América Latina, Munné et al., (2006), hallaron 85.7% de heces de cerdo positivas para RNA de VHE, lo cual difiere del porcentaje encontrado en esta investigación. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación, son similares a los hallados en Bolivia por Dell´Amico et al., (2006), donde el porcentaje de muestras fecales porcinas positivas para VHE fue 31.8%.

Al agrupar las muestras por subregiones de Antioquia, se notó que se tenía representación de las zonas con mayor producción porcícola en el departamento, y que curiosamente la zona Norte que es en la que produce mayor volumen de cerdos en Antioquia y el país, presenta el menor porcentaje de animales positivos a la detección de RNA del VHE en muestras de heces. Gutiérrez et al., (2012, datos no publicados), demostraron la presencia de RNA de VHE en muestras de

hígados de cerdo en plantas de beneficio de Antioquia, y que en esta misma subregión se presentaban los menores porcentajes de positividad para el RNA de VHE en hígado, coincidiendo esta información con la hallada en nuestra investigación.

Con este trabajo de investigación, se pudo demostrar la presencia de RNA de VHE en heces de cerdos que llegan a plantas de beneficio para la comercialización de las partes y productos de éstos animales y posterior consumo por los humanos. Se ha informado que algunos sitios extrahepáticos de replicación de VHE, incluidos el intestino delgado y el colon, también podrían estar implicados en la exposición del virus a humanos, debido al consumo de salchichas o embutidos hechos con estos intestinos (Williams *et al.,* 2001). Situación por la cual se hay alto riesgo de contraer este virus por el personal que trabaja con estos animales tanto en las granjas productoras, como en las plantas de beneficio, siempre y cuando las condiciones sanitarias de estos lugares sean deficientes (Bouwknegt et al., 2008). La información obtenida en este estudio, puede sentar las bases, para desarrollar programas de prevención y control de este virus tanto en producciones porcícolas, como en plantas de beneficio de animales.

Según Chang et al., (2009), alrededor de la semana 20 de edad, más del 70% de los cerdos presentan inmunidad contra VHE, sin tener historia de signos clínicos o anormalidades asociadas con la infección producidas por este virus, resultados similares podrían asumirse en esta investigación. Aunque muchos animales ya son inmunes a la edad de beneficio, algunos estudios han demostrado viremia o excreción en heces de VHE.

La positividad de las muestras de heces en cerdo sacrificados por región de procedencia varió entre 7% para el norte de Antioquia y 66.6% para el Oriente. Se debe resaltar que los municipios del norte de Antioquia que son los mayores productores de cerdos en el departamento son los de más baja positividad para el genoma de VHE en los heces porcinas, al igual que lo reportado por Gutiérrez et al., (2012), en hígados de cerdos de Antioquia.

La dispersión geográfica de los animales evaluados, hace pensar que se puede hallar este tipo de virus en gran parte de este departamento y posiblemente en sus zonas de influencia a nivel nacional. Por lo anterior, es de suma importancia investigar a profundidad sobre esta hipótesis, para implementar las respectivas medidas de seguridad.

Se podría suponer que si la excreción fecal de VHE comienza alrededor de una semana antes del inicio de los síntomas (no hay una sintomatología clara en cerdos) de la enfermedad y continúa durante 2 o 3 semanas, se esperaría que al momento del sacrificio de los cerdos, se detectara RNA del VHE mínimo una semana antes de llegar a la planta de beneficio (5-6 meses); siendo esta, una fuente importante de contaminación para otros cerdos de la piara, fuentes de agua u operarios de la granja.

Comparando la información obtenida en esta investigación (27.3%), con los resultados hallados por Leblanc et al., 2007 (41%), el porcentaje de positividad para VHE en heces es menor. Por lo anterior, podría esperarse que cerdos con edades menores a las del sacrificio, presentarían mayor excreción viral (Fernandez-Barredo et al., 2006; McCreary et al., 2008). Se pudo determinar como el porcentaje de positivos para VHE por ELISA (IgG) en 150 muestras fue 48%, y el de positivos en excreción viral en heces fue 5.33%. Estos resultados sugieren que alrededor de la mitad de los cerdos evaluados han estado en exposición al agente viral en alguna etapa de su vida, pero que

solo una pequeña proporción de éstos, excretaban VHE en heces a la hora del sacrificio, lo cual sigue respaldando la hipótesis antes expuesta.

3.6 Conclusiones

Con la información que se obtuvo en este estudio, se demostró que el VHE se encuentra circulando en la población de cerdos del departamento de Antioquia.

El hecho de determinar la presencia de una región del genoma viral de VHE en las muestras de heces evaluadas, no indica que el virus sea viable y pueda infectar a humanos u otros animales si estas heces contaminan aguas de consumo. Es entonces necesario, realizar más investigaciones que lleven a identificar la viabilidad de VHE en muestras de heces.

A la edad del sacrificio entre 5 y 6 meses de edad, los cerdos evaluados que llegan a plantas de beneficio excretaban VHE en sus heces (27.3%), lo cual podría constituirse en un factor de riesgo para contraer la infección por este virus por parte operarios de granjas o de plantas de faenado, situación que se debe estudiar a profundidad.

Es importante continuar desarrollando investigaciones sobre el VHE en Colombia, y su influencia en la cadena porcícola, desarrollando herramientas para el control y erradicación de VHE que lleven a disminuir la incidencia del virus en cerdos, generando productos inocuos y de mejor calidad, beneficiando a la población humana en general.

Con los datos obtenidos en este trabajo se refuerza la hipótesis de que el cerdo es un reservorio para el VHE.

Bibliografia

Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. J Med Virol. 1990;32:58-9.

Banks M, Heath GS, Grierson SS, King DP, Gresham A, Girones R, et al. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. Veterinary Record. 2004; 154: 223–227.

Berto A, Mesquita J, Hakze-van der Honing R, Nascimento M and van der Poel W. Detection and Characterization of Hepatitis E Virus in Domestic Pigs of Different Ages in Portugal. 2012 Blackwell Verlag GmbH Zoonoses and Public Health, 2012, 59, 477–481

Bouwknegt M, Engel B3, Herremans M, Widdowson M, Worm H, Koopmans M, Frankena K, Husman A, De Jong M And Van Der Poel W. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. Epidemiol. Infect. (2008), 136, 567–576.

Chang Y, Wang L, Geng J, Zhu Y, Fu H, Ren F, et al. Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): a study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. Hepatol Res. 2009; 39: 1153–1158.

de Deus N, Seminati C, Pina S, Mateu E, Martin M, Segales J. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. Veterinary Microbiology. 2007; 119: 105–114.

Dell'Amico, M.C., Cavallo, A., Gonzales, J.L., Bonelli, S.I., Valda, Y., Pieri, A., Segund, H., Ibañez, R., Mantella, A., Bartalesi, F., Tolari, F., Bartolini, A., 2011. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Humans and Swine, Bolivia. Emerg. Infect. Dis. 17, 1488-1490**.**

Dos Santos D, Lamarca C, Salete de Paula V, Marchevsky R, Freitas J, Coimbra A, Michella T, De MesquitaJúnior M, Rezende F, GarciaJ, Lewis L, Dutra F, Alves P. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. The Veterinary Journal. 2009

Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. Rev Med Virol. 2003; 13: 145-54.

Fogeda M, Avello A, Cilla CG, Echevarría JM. Imported and Autochthonous Hepatitis E Virus Strains in Spain. Journal of Medical Virology. 2009; 81:1743–1749.

Forgách P, Nowontny N, Erdélyi K, Boncz A, Zentai J, Szucs G, Reuter G, Bakonyi T. Detection of Hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. Veterinary Microbiology 2010; 143: 106-116

Geng J, Wang L, Wang X, Fu H, Bu Q, Liu P, Zhu Y, Wang M, Sui Y and Zhuang H. Potential risk of zoonotic transmission from young swine to human: seroepidemiological and genetic characterization of hepatitis E virus in human and various animals in Beijing, China. Journal of Viral Hepatitis, 2011. 18, 583–590

Kabrane-Lazizi Y, Meng XJ, Purcell RH, Emerson SU. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped.J Virol. 1999;73:8848-50.

Kasorndorkbua C, Guenette DK, Huang FF, Thomas PJ, Meng XJ, Halbur PG. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. J.Clin.Microbiol. 2004; 42: 5047-52.

Leblanc D, Ward P, Gagne MJ, Poitras E, Muller P, Trottier YL, et al. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. Int J Food Microbiol. 2007; 117: 160–166.

Leblanc D, Poitras E, Gagné MJ, Ward P, Houde A: Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. International Journal of Food Microbiology. 2010; 139: 206–209.

Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:9860-5.

Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, et al. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. Arch Virol. 1998;143:1405-15.

Organización Mundial de la Salud. Consejo ejecutivo. 126.ª reunión - EB126.R16 - Punto 4.12 del orden del día 23 de enero de 2010. Hepatitis virales.

Rendón J, Navas M, Hoyos M, Cortés F, Correa G, Sepúlveda M, Yepes N, Jaramillo S, Zuleta J, Almanza R. Evidencia serológica y molecular de la circulación del virus de la hepatitis E en Medellín. REVISTA INFECTIO. 2010; 14(S1):34

Schlauder G. Viral hepatitis: molecular biology, diagnosis, epidemiology and control. En: Mushahwar A, editor. Perspective in medial virology. Amsterdam: Elsevier; 2004. p. 199-222.

Smith JL. A review of hepatitis E virus. J Food Prot. 2001;64: 572-86.

Tosoncin da Silva, Mendes de Oliveira J, Lamarca C, de Almeida K , Alves M, José Dutra F.J. Prevalence of hepatitis e virus antibodies in individuals exposed to swine in Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 107(3): 338-341, May 2012

Vasickova P, Psikal I, Widen F, Smitalova R, Bendova J, Pavlik I, et al. Detection and genetic characterisation of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. Research in Veterinary Science. 2009; 87: 143–148.

Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, Meng XJ. Evidence ofextrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. J.Clin.Microbiol. 2001; 39: 3040-6.

Worm HC, Schlauder GG, Brandstatter G. Hepatitis E and its emergence in non-endemic areas. Wien KlinWochenschr. 2002;114:663-70.

RECOMENDACIONES GENERALES

La aplicación de medidas higiénicas y de control para la contaminación con agentes zoonóticos, generarán un valor agregado al producto final, que favorecen la comercialización de los mismos y su apertura a nuevos mercados nacionales e internacionales