



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E EN
HÍGADOS DESTINADOS PARA CONSUMO HUMANO Y HECES
DE CERDOS EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO

MARCO ANTONIO CANTÚ MARTÍNEZ

TESIS DOCTORAL

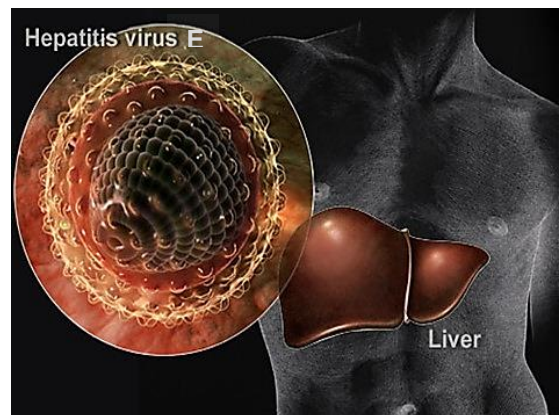
DIRECTORES:

DR. RAMIRO AVALOS RAMÍREZ

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL

DR. ARTUR XAVIER ROIG SAGUÉS

Facultat de Veterinària de la UAB



Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Facultat de Veterinària

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Bellaterra, Julio de 2016



Universitat Autònoma de Barcelona

**DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (HEV)
EN HÍGADOS Y HECES DE CERDOS DESTINADOS PARA CONSUMO
HUMANO EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN**

T E S I S D O C T O R A L

MC. MARCO ANTONIO CANTÚ MARTÍNEZ _____

DIRECTORES:



DR. RAMIRO AVALOS RAMÍREZ _____

Profesor Titular del Departamento
de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia de la UANL



DR. ARTUR XAVIER ROIG SAGUÉS _____

Profesor Titular del Departament
de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat
de Veterinària de la UAB

Programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos
Departament de Ciència Animal i dels Aliments
Facultat de Veterinària
Bellaterra, Julio de 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Don Ramiro Avalos Ramírez, Profesor Titular A y Coordinador del Departamento de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Nuevo León,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada : **“DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE) EN HÍGADOS DESTINADOS PARA CONSUMO HUMANO Y HECES DE CERDOS EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO”** ha sido realizada por D. Marco Antonio Cantú Martínez, bajo mi dirección y cumple los requisitos para su defensa.

Y para que así conste, firmo el presente en el municipio de General Escobedo del estado de Nuevo León, México a 04 de Julio de 2016

Dr. Ramiro Avalos Ramírez
Profesor Titular del Departamento
de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia de la UANL

Dedicatorias

“Una persona usualmente se convierte en aquello que él cree que es. Si yo sigo diciéndome a mí mismo que no puedo hacer algo, es posible que yo termine siendo incapaz de hacerlo. Por el contrario si yo tengo la creencia que sí puedo hacerlo, con seguridad yo adquiriré la capacidad de realizarlo aunque no la haya tenido al principio.”

Mahatma Gandhi

A mi esposa y mi hija

Ma. De Lourdes

y

Martha Catalina

Que con su paciencia, amor y respeto han logrado comprenderme y sobrellevar mi desesperación y mi cansancio y sé que si me necesitan Yo estaré ahí. No importa si estoy durmiendo, si estoy estudiando o si hemos discutido.

Gracias

Agradecimientos

A dios por haberme dado la oportunidad de disfrutar, el conocimiento y la experiencia de este trabajo junto a mi familia y amistades.

Y en segundo me gustaría dedicar las primeras páginas de este trabajo a todas aquellas personas que han colaborado en su realización, y al mismo tiempo agradecerles sinceramente la ayuda inestimable que en alguno u otro momento me han brindado.

En primer lugar agradezco al Dr. Ramiro Avalos Ramírez Profesor Investigador del departamento de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UANL. por haberme acogido en su grupo de investigación como alumno y por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis que aquí se presenta. Gracias por su confianza y amistad, por las horas dedicadas, por la paciencia demostrada frente a mi ritmo de trabajo (a veces demasiado lento), y por animarme en todo momento.

Al Dr. Artur X. Roig Sagués Profesor Titular de Universidad de la Facultad de Veterinaria UAB. Gracias por la oportunidad que me brindo para que yo pudiera llegar al término de este trabajo pero ante todo gracias por brindarme su amistad así como como su paciencia como profesor y amigo.

A la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila Profesora Investigadora del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UANL por brindarme su amistad y así como el apoyo que a teniendo para culminar y para la realización de este trabajo.

A la Dr. Sibilina Cedillo Rosales Profesora Investigadora del departamento de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UANL por el apoyo que a teniendo para poder llevar a cabo la realización de este trabajo.

Debo agradecer sin duda al Dr. Juan José Zarate Ramos Director de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su amistad y el apoyo económico ya que sin el probablemente no hubiera continuado este estudio.

QBP Stephany Castillo por su amistad y consejos que me dieron a cada momento y me alentaron para seguir adelante muchas gracias.

Al mis compañeros Futuros Doctores Betty, Lety, Mina, Terre, Adelita Arnoldo, José Luis, Gustavo, Rodrigo por los momentos que pasamos juntos en las clases, exposiciones, defensas de nuestros trabajos y reuniones además de gran ayuda que me brindo para la realización de este trabajo mil gracias.

INDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice de contenido.....	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tablas.....	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
1. Introducción y justificación y Objetivos.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2.1. Justificación.....	7
1.3.1. Hipótesis.....	9
1.4.1 Objetivo.....	11
1.5.1. General Objetivos.....	12
1.6.1. Objetivo Específicos.....	12
2. Capitulo Segundo Literatura Citada.....	13
2.1. El Agente causal de la Hepatitis E.....	14
2.2. Características moleculares.....	15
2.2.1 Genoma.....	15
2.2.2. El marco de lectura ORF2.....	17
2.2.3. El marco de lectura ORF3.....	17
2.2.4. Cápside.....	19
2.3. Descripción general.....	19
2.3.1. Características físico-químicas y estabilidad.....	19

2.4. Diversidad genética.....	20
2.5. Diversidad serotípica.....	22
2.6. Replicación del Virus de la Hepatitis E.....	22
2.7. Epidemiología de la Hepatitis E.....	24
2.7.1. Zonas endémicas y no endémicas.....	24
2.7.2. Seroprevalencia en la población.....	26
2.7.3. Vías de infección.....	27
2.7.4. El agua como vehículo de transmisión.....	27
2.7.5. Transmisión por alimentos.....	28
2.7.6. Transmisión de persona a persona.....	29
2.7.7. Transmisión por otras vías.....	30
2.7.8. Características epidemiológicas de la hepatitis E.....	31
2.8. Diagnóstico Tradicional para la detección del Virus de la Hepatitis E.....	32
3. Materiales y Métodos.....	35
3.1. Ámbito territorial del estudio.....	36
3.2. Plan de trabajo.....	37
3.3. Toma de muestras y envío al laboratorio.....	38
3.4. Procesamiento de las muestras.....	41
3.5. Extracción del ARN vírico de muestras de tejido hepático.....	42
3.6. Extracción de ARN total de heces de cerdos en suspensión.....	43
3.7. Detección del VHE por RT-PCR.....	44
3.8. PCR Semi-anidado para el VHE.....	45
3.9. Purificación de los productos amplificados de geles de agarosa.....	46
3.10. Secuenciación de los Productos Purificados de ADN del PCR.....	47
3.11. Análisis de los datos de las secuencias.....	48
3.12. Análisis filogenéticos.....	49
4. Resultados.....	51

4.1. Resultados del Objetivo 1.....	52
4.2. Resultados del Objetivo 2.....	55
4.3. Resultado del Objetivo 3.....	57
4.4. Resultados del Objetivo 4.....	59
4.5. Resultados del Objetivo 5.....	60
6. Discusión.....	66
7. Conclusiones.....	74
8. Literatura Citada.....	76
9. Anexos.....	105

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Organización del genoma del Virus de la hepatitis E Tomado y modificada de Santiago Mirazo.....	18
Figura 2 Replicación del Virus de la Hepatitis E dentro de la célula hepática; Tomado y modificada de Santiago Mirazo Hepatic Medicine: Evidence and Research 2014.....	24
Figura 3. Posición geográfica relativa del estado de Nuevo León, México y ubicación de los municipios muestreados y con mayor proporción de granjas de cerdos.....	37
Figura 4 Figura 4. Ubicación geográfica en los Municipios en el Estado de Nuevo León, México de las granjas donde procedían los cerdos para el rastro	39
Figura 5 Localización geográfica de las granjas en el Estado de Nuevo León, México donde se recolectaron las muestras de Hece	40
Figura 6. Localización geográfica de los diferentes municipios en el Estado de Nuevo León, México donde se encuentran los puntos de venta (carnicerías) donde se obtuvieron muestras de hígado destinadas para consumo humano.....	41
Figura 7a Condiciones del termociclador en le técnica de RT-PCR para el VHE.....	53
Figura 7b RT-PCR para el VHE Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de muestras de hígado en rastros de cerdos.....	53
Figura 8a. Condiciones del termociclador para la técnica de PCR para el VHE segunda ronda.....	54
Figura 8b RT-PCR para el VHE Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de muestras de hígado en rastros de cerdos.....	54
Figura 9 a. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de muestras de hígado en rastros de cerdos.....	55

Figura 9 b. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de muestras de hígado en rastros de cerdos.....	56
Figura 10a. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE en heces de granjas porcinas.....	57
Figura 10b. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE en heces de granjas porcinas.....	58
Figura 11a y b. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de hígados de carnicerías.....	59
Figura 12. Mapa del Estado de Nuevo León donde se establece la posición relativa de los Municipios a partir de los cuales se obtuvieron muestras de hígado y heces de cerdos para obtener la secuencia de una parte del genoma del VHE.....	60
Figura 13. Porcentajes de identidad y divergencia de las secuencias sw4NL-Mx-1, sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 con secuencias de cepas representativas de distintas especies y genotipos de Hepeviridae obtenidas del GenBank®.....	62
Figura 14. Árbol filogenético de Unión de Vecinos más cercanos (Neighbor-joining) de un fragmento de 172 nucleótidos del gen ORF-2 de diferentes miembros representativos de Hepevirus con las secuencias de sw4NL-Mx-1, sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1y sw9NL-Mx-1 obtenidas en el presente trabajo.....	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Casos de Hepatitis víricas reportados a nivel Nacional en México en el período 1999-2011.....	5
Tabla 2.- Casos de Hepatitis víricas en el Estado de Nuevo León en el período 2000-2011.....	5
Tabla 3.- Número de cabezas de ganado de las granjas de cerdos del estado de Nuevo León, México, y su localización geográfica.....	37
Tabla 4.- Relación de las granjas de origen de los hígados muestreados en el rastreo TIF del Municipio de Monterrey, N.L. y ubicación geográfica en los municipios en el estado de Nuevo León, México.....	39
Tabla 5.- Relación de las granjas de los diferentes Municipios del estado de Nuevo León de donde se recolectaron muestras de excretas porcina y su localización geográfica en el estado de Nuevo León, México.....	40
Tabla 6.- Relación de los puntos de venta (carnicerías) de los diferentes municipios del estado de Nuevo León de donde se obtuvieron muestras de hígado destinadas a consumo humano y su localización geográfica en el estado de Nuevo León, México.....	41
Tabla 7 Condiciones de gradientes de temperatura y fases de la RT-PCR empleadas para amplificar un fragmento genético (parte del gen ORF-2 del Virus de la Hepatitis E a partir de muestras de porcino.....	45
Tabla 8 Condiciones de gradientes de temperatura y fases del PCR empleadas para amplificar un fragmento genético (parte del gen ORF-2 del Virus de la Hepatitis E a partir de muestras de porcino.....	46
Tabla 9 Datos de las secuencias de las cepas de Hepeviridae1 usados para los análisis de homología genética y filogenia.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: Amino Ácidos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido Ribonucleico

Ct: Ciclo Umbral (Threshole Cycle)

dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfato

HNA: Hepatitis no-A

HNB: Hepatitis no-B

IF: Inmunofluorescencia

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

kDa: Dalton

min : minuto(s)

nt: Nucleótidos

Oligo dT: Ácido Oligodeoxitimidílico

ORF Marco de Lectura Abierto (Open Reading Frame)

ORF1: Marco de Lectura Abierto (Open Reading Frame1)

ORF2: Marco de Lectura Abierto (Open Reading Frame 2)

ORF3: Marco de Lectura Abierto (Open Reading Frame 3)

PCP: Papina cisteína proteasa

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*)

RDRP: Replicacion del genoma y transcripción del ARN polimerasa

TIF: Tipo Inspección Federal

VHA: Virus de la Hepatitis A

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

VHE: Virus de la Hepatitis E

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (del inglés: *Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction*)

S: segundo (s)

Tm: Temperatura de Melting

RESUMEN

El virus de Hepatitis E (VHE), es un virus hepatotrópico que se transmite por vía fecal-oral a través de agua y alimentos contaminados. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia y circulación del VHE en hígados de cerdos destinados para consumo humano en el Estado de Nuevo León, México, mediante técnicas moleculares de diagnóstico. Para ello se muestrearon cerdos en sus diferentes etapas de desarrollo de 13 municipios, se tomaron 87 hígados de cerdos sacrificados en rastros TIF y 50 hígados de carnicerías, además se recolectaron 233 muestras fecales de 26 granjas. Para la detección del VHE se utilizó RT-PCR y PCR-semi-anidado; Se amplificó un fragmento de 212 pb del gen ORF2 del VHE. De las 87 muestras de rastros y de los 50 hígados de carnicerías solamente fueron positivos 17(19.54%) y 9(18%) respectivamente, además de 233 muestras fecales solo 41(17.53%) dieron positivas, estas corresponden a 9 granjas de distintas partes del Estado. Se obtuvo la secuencia de 172-174 nucleótidos a partir de 5 muestras positivas al RT-PCR y PCR-semianidado. Las secuencias fueron denominadas sw4NL-Mx-1, sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1; conforme fueron realizándose los análisis de secuenciación. Las relaciones evolutivas de las secuencias con secuencias de referencia de la familia *Hepeviridae* fueron calculadas mediante análisis filogenéticos usando el método de Neighbor-Joining y aplicando 1,000 repeticiones en los análisis de Bootstrap. No obstante, y acorde a la topología del árbol filogenético obtenido, estas secuencias conforman dos grupos de virus evolutivamente relacionados pero segregados en dos subgrupos distintos, el genotipo 3 del VHE y un nuevo genotipo. Este es el primer estudio que aporta evidencia de la presencia del genotipo 3 del VHE en granjas y cerdos sacrificados en el Estado de Nuevo León, concluyendo que el consumo de hígados puede constituir un importante factor de riesgo para la salud humana.

Palabras clave: Hepatitis E, Virus de hepatitis E (VHE), genotipo 3 VHE, Cerdos, Nuevo León, México.

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is a hepatotropic virus transmitted by the fecal-oral route via contaminated water and food. The aim of this study is to determine the presence and circulation of HEV in pig livers intended for human consumption in the state of Nuevo Leon, Mexico, using molecular diagnostic techniques. To do this pigs were sampled at different stages of development of 13 municipalities, 87 livers of pigs slaughtered in TIF slaughterhouses and 50 livers from butchers were taken, plus 233 fecal samples collected from 26 farms. RT-PCR and semi-nested-PCR was used to detect HEV; A fragment of 212 bp of HEV ORF2 gene was amplified. Of the 87 samples of trails and 50 livers from butchers only 17 (19.54%) and 9 (18%) were positive respectively, and of 233 fecal samples only 41 (17.53%) were positive, corresponding to 9 different farms from different parts of the state. The sequences of nucleotides 172-174 from 5 positive samples RT-PCR and PCR-seminested were obtained. Sequences were called sw4NL-Mx-1 sw5NL-Mx-1 sw7NL-Mx-1 sw8NL-Mx-1 and sw9NL-Mx-1; They were carried out under the sequencing analysis. The evolutionary relationships of the sequences with reference sequences of Hepeviridae family were calculated by phylogenetic analysis using the method of Neighbor-Joining and applying 1,000 repetitions in the analysis Bootstrap. Nevertheless, according to the topology of the phylogenetic tree obtained, these sequences form two groups of evolutionarily related viruses but segregated into two distinct subgroups, genotype 3 HEV and a new genotype. This is the first study that provides evidence of the presence of HEV genotype 3 in pigs slaughtered from farms in the State of Nuevo Leon, concluding livers consumption may be an important risk factor for human health.

Keywords: Hepatitis E, hepatitis E virus (HEV) HEV genotype 3, Pigs, Nuevo León, México.

ABSTRACT

El virus d'Hepatitis E (VHE), és un virus hepatotròpic que es transmet per via fecal-oral a través d'aigua i aliments contaminats. L'objectiu d'aquest treball és determinar la presència i circulació del VHE en fetges de porcs destinats per a consum humà en l'Estat de Nuevo León, Mèxic, mitjançant tècniques moleculars de diagnòstic. Per a això es van mostrejar porcs en les seves diferents etapes de desenvolupament de 13 municipis, es van prendre 87 fetges de porcs sacrificats en escorxadors TIF i 50 fetges de carnisseries, a més es van recol·lectar 233 mostres fecals de 26 granges. Per a la detecció del VHE es va utilitzar RT-PCR i PCR-semi-nuat; Es va amplificar un fragment de 212 pb del gen ORF2 del VHE. De les 87 mostres de rastres i dels 50 fetges de carnisseries solament van ser positius 17 (19.54%) i 9 (18%) respectivament, a més de 233 mostres fecal només 41 (17.53%) van donar positives, aquestes corresponen a 9 granges de diferents parts de l'Estat. Es va obtenir la seqüència de 172-174 nucleòtids a partir de 5 mostres positives a RT-PCR i PCR-semi-nuat. Les seqüències van ser denominades sw4NL-Mx-1, sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1 i sw9NL-Mx-1; conforme van ser realitzades les anàlisis de seqüenciació. Les relacions evolutives de les seqüències amb seqüències de referència de la família Hepeviridae van ser calculades mitjançant anàlisis filogenètiques utilitzant el mètode de Neighbor-joining i aplicant 1,000 repeticions en les anàlisis de Bootstrap. No obstant això, i d'acord amb la topologia de l'arbre filogenètic obtingut, aquestes seqüències conformen dos grups de virus evolutivament relacionats però segregats en dos subgrups diferents, el genotip 3 del VHE i un nou genotip. Aquest és el primer estudi que aporta evidència de la presència del genotip 3 del VHE en granges i porcs sacrificats a l'Estat de Nuevo León, conclouent que el consum de fetges pot constituir un important factor de risc per a la salut humana.

Paraules clau: Hepatitis E, Virus d'hepatitis E (VHE), genotip 3 VHE, Porcs, Nou Lleó, Mèxic.

CAPITULO PRIMERO

INTRODUCCIÓN

Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN.

La hepatitis vírica, ya sea aguda o crónica, es una enfermedad transmisible que alcanza especial importancia en todo el mundo. Su morbilidad y mortalidad causa un problema trascendente en la salud pública. Existen siete tipos diferentes de virus hepatotrópicos, capaces de producir hepatitis, los cuales tienen diferencias en su etiología y en sus características epidemiológicas, así como en sus mecanismos de transmisión, además de los aspectos inmunológicos, clínicos y hepatológicos. Se les conoce como Hepatitis A, B, C, D, E, F, G, aunque hay evidencias de la existencia de más virus que pueden causar inflamación y necrosis del hígado (Halabe y Angulo, 2000).

La hepatitis E ha sido considerada desde su primera descripción como una enfermedad con un patrón epidemiológico vinculado al consumo de aguas y alimentos contaminados, de modo similar a la hepatitis A y con una prevalencia superior en zonas geográficas con condiciones socio-sanitarias deficientes. La utilización de técnicas moleculares han aportado los datos necesarios para demostrar que en los países sub-desarrollados y desarrollados la infección por el virus de la hepatitis E es frecuente, y tiene un patrón epidemiológico diferente, asociándose al contacto de animales domésticos, especialmente el cerdo.

Desde mediados de los años 50 se han descrito numerosas epidemias de hepatitis víricas, principalmente en Asia, que inicialmente se atribuyeron al Virus de la Hepatitis A (VHA), ya que la enfermedad cursaba como una hepatitis aguda y era clínicamente indistinguible de la causada por el virus de la Hepatitis E (Emerson y Purcell, 2003). La diferenciación de esta enfermedad se realizó mediante estudios serológicos en el año de 1980, cuando se demostró que 2 brotes de hepatitis aguda ocurridos en Nueva Delhi (India) estaban causadas por un agente etiológico diferente al VHA (Wong y col., 1980), denominándola como hepatitis no-A, no-B epidémica, y estableciendo que se transmitía por vía fecal-oral, por lo que posteriormente pasó a ser denominada hepatitis no-A (HNA), no-B (NB) de transmisión entérica.

Esta nueva hepatitis vírica presentaba algunos rasgos diferentes respecto a la causada por el VHA, como eran una mayor tasa de individuos adultos afectados y una elevada tasa de mortalidad en mujeres embarazadas (Khuroo, 1980).

Khuroo, en 1980, demostró por primera vez que una epidemia de hepatitis viral ocurrida en el valle de Cachemira no era causada por el VHA sino por un agente de HNA y HNB. Ése fue un hito en la historia de la hepatitis E y comenzó una búsqueda activa para la caracterización del agente etiológico. Casi simultáneamente, se demostró que ninguna de las muestras de suero analizadas procedentes de los pacientes de las epidemias de Delhi ocurridas en los años 1955 y 1956, y de Ahmedabad en India en los años 1975 y 1976 fueron positivas para el VHA o el virus de la hepatitis B (VHB) (Wong y col., 1980, Arankalle y col., 1988).

Balayan y col. (1983) identificaron al virus de la hepatitis E, al reproducir la Hepatitis aguda típica en un voluntario humano inmune al VHA tras la administración oral de extractos de heces obtenidos de presuntos casos de hepatitis no-A no-B, generando anticuerpos que reaccionaron con las partículas víricas excretadas por los enfermos durante la fase aguda de su enfermedad. Los mismos autores lograron infectar a monos con el virus, observando que también eran capaces de excretar el virus en sus heces.

Meng y col. (1998) demostraron experimentalmente que el virus de la hepatitis E cruza la barrera de las especies, principalmente el genotipo 3, al ser capaz de infectar a porcinos y a primates, y a la inversa, se ha descrito que el genotipo 3 humano (cepa los-2) ha infectado a cerdos (Meng, 1998; Halbur, 2001).

Por otra parte, se han presentado brotes de hepatitis E tanto en países en desarrollo con una amplia área geográfica y con una inadecuada sanitización, en los que el reservorio del VHE no se ha detectado, como en los Estados Unidos y algunos países de Europa con áreas no endémicas, en donde se han documentado brotes con una prevalencia baja de anti-VHE (<2%) en las poblaciones sanas, y en las que tampoco se ha determinado la fuente de infección para las personas.

Según el National Center for Disease Control and Prevention (CDC 2011), prácticamente todos los casos de hepatitis E aguda reportados en los Estados Unidos habían ocurrido en viajeros que regresaban de países en los que la hepatitis E es endémica, como India. Sin embargo, las pruebas de donantes de sangre saludables en los Estados Unidos mostraban que entre el 1 y el 5% de las muestras de sangre analizadas tenían anticuerpos del VHE, y que la mayoría de las personas con esos anticuerpos pertenecían a áreas urbanas.

El VHE fue clasificado dentro de la familia Caliciviridae, ya que compartía con sus miembros características morfológicas, físico-químicas y estructurales (Bradley y Balagan, 1988). En 1990 fue clonado y caracterizado a partir de bilis de Macacos *Cynomolgus* infectados experimentalmente con heces de pacientes enfermos de un brote epidémico ocurrido en Birmania (Reyes y col., 1990). Tam y col. (1991) secuenciaron el genoma completo de esta cepa birmana, y junto a una segunda cepa aislada durante un brote ocurrido en México (Huang y col., 1992), con la que presentaba una similitud de un 76 %, fueron los 2 primeros genotipos descritos del VHE. Durante los años siguientes, se identificaron un gran número de aislamientos realizados en Pakistán, China, India y Nepal que estaban altamente relacionadas con la cepa Birmana, con más de un 93% de los nucleótidos en común (Clayson, y col 1995, Schlauder y Mushahwar, 2001).

En los seres humanos, el VHE es responsable de grandes brotes de hepatitis viral aguda en los países en desarrollo, y generalmente están asociados con unas malas condiciones sanitarias. Esta enfermedad aparece a menudo como una hepatitis aguda con una tasa de letalidad baja; sin embargo, en las mujeres embarazadas puede causar hasta un 25% de mortalidad debido al desarrollo de una hepatitis aguda fulminante (Kumar y col., 2004, Inoue y col 2009). En cambio, en los países industrializados algunos brotes no son denunciados y los casos son diagnosticados en la mayoría de los individuos sin antecedentes de viajes a países endémicos (Emerson y Purcell, 2003).

Por otro lado, en el año 1997 se detectó en cerdos un virus que está estrechamente relacionado con el virus VHE aislado de los humanos (Meng y col., 1997). Así mismo, en diferentes estudios serológicos se informó que la infección por el VHE es generalizada en los cerdos,

independientemente de si el VHE es endémico en las poblaciones humanas o no (Meng y Halbur, 2005). Un grupo de investigadores infectaron experimentalmente especies porcinas con el VHE de primates infectados y observaron también que los cerdos podían ser infectados con la cepa humana US-2, demostrando que la infección atravesaba la barrera inter-especies (Meng y col., 1998; Halbur y col., 2001; Tei y col., 2003; Li y col., 2005). Al realizar pruebas de laboratorio a pacientes enfermos de hepatitis confirmaron que eran positivos al VHE y asociaron la enfermedad al consumo de productos de jabalí y venados poco cocidos o sin cocinar (Li y col., 2005). En España se ha detectado ARN del VHE en algunos casos de hepatitis humana, y también se ha detectado el VHE en aguas residuales urbanas y en muestras porcinas (Pina y col., 2000; Clemente y col., 2003). Seminati y col. (2008) sugirieron que al menos el 97% de las explotaciones porcinas españolas tenían anticuerpos contra VHE en el año de 1998.

Otros estudios serológicos realizados en Somalia, Tajikistán y Turkmenistán (región endémica) revelaron la presencia de anticuerpos contra el VHE entre el 29% y el 62% de las vacas, y entre el 42% y el 67% de los ovinos y caprinos, respectivamente. También se ha descrito su presencia en alrededor del 12% de las vacas de un área geográfica no endémica en Ucrania (Favorov y col., 1998), así como en 6,3% de muestras de suero de ternera procedentes de diversas regiones de China (Wang y col., 2002). Por otro lado, en Brasil, Vitral y col. (2005) detectaron anticuerpos contra el VHE en un 1,4% de las vacas estudiadas.

La prevalencia de anti-VHE en países donde el diagnóstico de hepatitis E es raro, se considera que es diez veces mayor que la prevalencia de anticuerpos contra el VHC, considerando que en estos mismos países el VHC produce el 20% o más de las hepatitis clínicas. Este hallazgo de anticuerpos anti-VHE en poblaciones donde la hepatitis clínica del tipo E no parece existir, sugiere que la infección subclínica ocurre en estas regiones, o que las pruebas actualmente disponibles producen resultados no específicos en algunos casos.

En México la Secretaría de Salud informa un total de 192,588 casos de hepatitis virales entre 2000 y 2007. De éstos, 79% corresponden aVHA, 3.3% aVHB, 6% a VHC y 11.7% a casos sin agente etiológico descrito. (Panduro y col., 2011) No obstante no existen reportes de la

enfermedad de hepatitis tipo E en humanos. Sin embargo, en una búsqueda de información retrospectiva a nivel Nacional de todas las enfermedades hepáticas ocurridas en la República Mexicana en el período de 1999 a 2011 se encontró un número considerable de casos de hepatitis en humanos debidas a causas desconocidas (Tabla 1). Suponemos que no se cuenta con pruebas suficientes de diagnóstico serológico para saber si dentro de las hepatitis por causas desconocidas se encuentra casos de hepatitis tipo E.

Tabla 1.- Casos de Hepatitis víricas reportados a nivel Nacional en México en el período 1999-2011

FUENTE: Anuarios de información 2012, (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General Adjunta de Epidemiología/SSA)

Año	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
HVA	19199	21231	20251	16807	14967	16913	21386	19199	22954	1541	1545	1265	1345
HVB	902	835	853	776	836	687	626	902	855	444	975	657	678
HVC	--	1012	1223	1345	1382	1361	1558	1211	1779	879	976	786	759
H causa Desconocida	--	3564	2558	2376	2781	3028	3012	2234	2819	2330	2690	2113	2334

Por otro lado, en el estado de Nuevo León (México), al analizar la incidencia de la enfermedad entre los años del 2000 al 2011, se observó que los casos de hepatitis viral por causa desconocida suponían entre el 31.81% y el 50% respecto a los casos de hepatitis tipo A diagnosticados (Tabla 2).

Tabla 2.- Casos de Hepatitis víricas en el Estado de Nuevo León en el período 2000-2011

FUENTE: Elaboración propia en base a anuarios de información 2012, (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General Adjunta de Epidemiología/SSA)

Enfermedad	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Hepatitis viral desconocida	182	164	254	215	123	92	125	117	254	124	103	152
Hepatitis tipo A	572	637	960	564	275	326	441	234	425	231	326	247
%	31.81	25.75	26.45	38.12	44.72	28.22	28.34	50	59.75	53.67	31.59	61.53

En definitiva, la introducción de técnicas moleculares en el diagnóstico de las hepatitis deberían aportar los datos necesarios para demostrar que en los países desarrollados la

infección por el virus de la hepatitis E es más frecuente de lo que se cree, y está asociada al contacto con animales domésticos, especialmente el cerdo. Al considerar que la hepatitis E es una zoonosis en los países desarrollados, se hace necesario revisar esta entidad clínica desde una perspectiva distinta a la que se venía utilizando. El objetivo de este trabajo es detectar, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa semianidado unida a la acción previa de la transcriptasa reversa (RT-PCR), la presencia del VHE en muestras de hígados de cerdos destinados al consumo humano en el estado de Nuevo León, México, y determinar su prevalencia y el riesgo potencial para la población. Es probable que una gran proporción de los casos de hepatitis de causa desconocida ocurridos en México puedan atribuirse al VHE, con lo que las cifras anteriormente descritas pueden reflejar la falta de procedimientos de diagnóstico específicos y epidemiológicos para esta virosis, además de que no se conoce si el VHE circula en granjas de Nuevo León, y su eventual presencia en las distintas fuentes de contaminación para la población humana. Igualmente, no se conoce cuál es el genotipo del VHE que predomina en la entidad.

JUSTIFICACION

JUSTIFICACIÓN:

Los estudios sobre la presencia y circulación del Virus de la Hepatitis E en granjas porcinas de Estado de Nuevo León en el Noreste de México no existen. Dada la capacidad del virus para infectar a los humano y a distintas especies animales, en especial las de consumo humano y en particular el cerdo, es necesario contar con procedimientos de diagnóstico específicos rápidos y confiables, que permitan la detección en las distintas fuentes.

HIPOTESIS

HIPÓTESIS

El virus de la hepatitis E está presente y circula en granjas porcinas y la población de cerdos faenados en rastro, esto conlleva a la probabilidad de transmisión hacia el humano a través del consumo de carne de cerdo contaminada durante el proceso de aprovechamiento. El uso de la Técnica molecular de RT-PCR, nos permitirá la detección e identificación temprana del VHE en diversas fuentes de contaminación y posibilitará el establecimiento de medidas necesarias para evitar su diseminación.

OBJETIVOS

EL OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y circulación del Virus de la Hepatitis E (VHE) en Cerdos y sus derivados cárnicos destinados para consumo humano en el estado de Nuevo León, México, mediante la técnica de diagnóstico molecular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Poner a punto la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR) para amplificar una secuencia del gen ORF2 del VHE a partir de hígado y excretas fecales porcinas.
- 2.- Determinar la presencia del VHE en hígados de cerdos sacrificados en el rastro de Monterrey, Nuevo León, mediante la técnica de RT-PCR.
- 3.- Determinar la presencia y circulación del VHE en granjas de cerdos del Estado de Nuevo León a partir del análisis de muestras de heces mediante la técnica de RT-PCR.
- 4.- Establecer la presencia VHE en hígados frescos de cerdo ofrecidos para consumo humano en puntos de venta en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, mediante la técnica de RT-PCR.
- 5.- Obtención de la secuencia de nucleótidos de una parte del genoma ORF2 de las cepas de VHE que circulan en el Estado de Nuevo León, México. y su caracterización genética y filogenética con cepas de referencias

CAPITULO SEGUNDO

LITERATURA CITADA

2.1. El Agente causal de la Hepatitis E

El virus de la hepatitis E (VHE) se describió originalmente como una partícula no envuelta, esférica de 27 a 30 nm., similar en aspecto a los *Calicivirus* (Tam y col., 1991). Estudios realizados por diferentes investigadores demostraron diferentes dimensiones del tamaño del virión, fluctuando de 27 a 30 nm., de 27 a 34 nm. y de 32 a 34 nm., (Ticehurst 1991, Li y col., 1995, Zanetti y col., 1999). Así mismo se reportó un tamaño promedio de 30 nm. En un estudio acerca del tamaño del virión, a partir de muestras de tres cepas geográficamente diferentes del VHE procedentes de México, Nepal y Pakistán (Ticehurst y col., 1992).

En otros estudios similares de partículas del VHE procedentes de Birmania, México, Somalia y Asia Central, el diámetro promedio de las partículas se estableció en 32 nm, comparado con el diámetro de 28 nm del VHA (Bradely y col., 1987). Se ha expresado que la inconsistencia del diámetro de las partículas del virus, se debe a la digestión proteolítica o desnaturalización parcial del virus durante el paso por el intestino (Bradley 1988). Sobre esta base de la morfología, el VHE no puede ser distinguido confiablemente de otros virus pequeños redondos que se encuentran en las heces (Purcell 1996). El análisis de la microfotografía electrónica de las partículas del VHE por análisis rotacional de Markham (Markham y col., 1963), proporcionó imágenes que sugieren una simetría icosaédrica para los viriones del VHE (Ticehurst 1991).

Este virus hepatotrópico tenía algunas similitudes y diferencias con otras cepas de virus hepatotrópicos, tales como, el virus de la hepatitis A y el virus de la hepatitis C, que tienen una sola cadena de ARN como el virus de la hepatitis E. Sin embargo, el virus de la hepatitis B difiere porque contiene una cadena doble de ADN.

Basándose en la similitud superficial de la morfología y organización del genoma de los *Calicivirus*, el VHE se clasificó originalmente en la familia de los *Caliciviridae* (Tam y col., 1991). Además, la secuencia del VHE no tiene una relación cercana con ninguno de los *Calicivirus* conocidos (Koonin y col., 1992). En un principio, y basándose en la similitud morfológica con el agente de *Norwalk*, se incluyó en la familia *Caliciviridae* como un género

separado. Sin embargo, los genomas de ambos virus son diferentes. El análisis de las regiones de la ARN helicasa (Hel), de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y de otros virus ARN de polaridad positiva, muestra que el VHE forma un grupo distinto filogenéticamente, y es más parecido al virus de la rubéola de la familia *Togaviridae* que a los miembros de la familia *Caliciviridae* (Berke y Matson., 2000; Green y col., 2000). Según las últimas recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía Viral, el virus de la hepatitis E (VHE) se clasifica en una familia *Hepeviridae*, dentro del género *Hepevirus*, único miembro de la familia (Emerson y col., 2004a).

Se han propuesto varias clasificaciones en tipos y subtipos de los aislamientos del VHE (Schlauder y Mushahwar 2001). Se han realizado comparaciones filogenéticas y análisis de las secuencias nucleotídicas de las regiones estructurales y no estructurales que definen al menos 9 grupos diferentes a partir de cepas que se utilizan como referencia, al haber sido parcial o totalmente secuenciadas. El grupo 1 está representado por el prototipo aislado en Burma y las cepas relacionadas de Asia y África. El grupo 2 incluye el prototipo Mexicano y varias cepas aisladas en Nigeria. En el grupo 3 se engloban cepas aisladas en EE.UU. a partir de humanos que se relacionan con aislamientos porcinos. El grupo 4 está formado por cepas aisladas en Italia, similares a cepas porcinas obtenidas en Nueva Zelanda. El grupo 5 lo forman cepas aisladas en Grecia y España, estas últimas a partir de humanos y de aguas fecales de mataderos, presumiblemente de origen porcino. El grupo 6 contiene otras cepas aisladas en Grecia, mientras que el grupo 7 lo constituyen cepas procedentes de Argentina y Austria. Los aislamientos de China, Ct-1 y Cs-15, representan los grupos 8 y 9, respectivamente (Wang y col., 2002).

2.2. Características moleculares

2.2.1 Genoma

El genoma del Virus de la Hepatitis E tiene una única cadena de ARN con 7200 pares de bases de sentido positivo, es decir, que codifica para el ARN mensajero y proteína, de una longitud

que varía entre 7,2 y 7,5 Kb. La molécula de ARN está poliadenilada en el extremo 3' carboxiterminal y presenta hacia el extremo 5' un aminoterminal, con una 7-metilguanosina (Kabrane y col., 1999). Además, el VHE tiene 3 genes diferentes expresados llamados marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés de Open Reading Frame), denominados ORF1, ORF2, y ORF3 (Engle y col., 2002).

ARN

ORF1: tiene 1693 codones, y codifica proteínas no estructurales necesarias para la replicación viral.

ORF2: tiene 660 codones, y codifica proteínas estructurales.

ORF3: tiene 123 codones, y codifica una proteína de función desconocida.

Los tres ORF se expresan durante la infección viral, ya que se han encontrado anticuerpos tanto en humanos y en animales infectados.

El marco de lectura 1 (ORF1) comienza en el extremo 5' del genoma viral, que ocupa dos tercios del mismo. Este gen se compone de 5,079 nucleótidos y codifica para una proteína no estructural (poliproteína) con una longitud de 1,693 aminoácidos. Esta poliproteína participa en la replicación de las partículas víricas y en la transformación de la proteína estructural (Worm y col, 2002, Emerson y Purcell, 2003).

De acuerdo con Koonin y col. (1992) al realizar un análisis del ORF1 se reveló que tiene unos pocos aminoácidos funcionales llamados dominios putativa, involucrados en la replicación y procesamiento de partículas víricas, como la metiltransferasa que participa en la disposición del Cap en el extremo 5' del genoma viral, así como el dominio Y que es la cisteína-proteasa análoga de la papaína (PCP), y el dominio X conocida como la helicasa y que es esencial para desarrollar la replicación del genoma y la transcripción de la ARN polimerasa (RDRP), además de ser esencial para la infectividad. Es posible que la RNA-polimerasa viral sintetice toda la longitud de las cadenas del ARN de cadena positiva así como por lo menos dos ARNm subgenómicos. Se sabe muy poco acerca del ensamblaje y el transporte del virus fuera de la célula (Kabrane y col, 1999, Zhang y col., 2001). El límite de la actividad de la enzima podría

estar presente en los sitios de la proteasa putativa, confirmado por la expresión de 979 aminoácidos en el ORF1 (Magden y col., 2001). La abundante hipervariabilidad de la prolina se observa en el dominio de bisagra que se encuentra entre el dominio X e Y así como el dominio de la papain-proteasa. Por otro lado Worm y col. (2002) mencionan que existe una similitud muy baja de nucleótidos y de aminoácidos entre cepas de diferentes regiones geográficas.

2.2.2. El marco de lectura ORF2

El marco de lectura ORF2 del genoma del VHE, que alcanza 1,980 nucleótidos, comienza en los nucleótidos (nt) 5,147, y se extiende hasta los nucleótidos 7,127. ORF2 está formado por 30 proteínas (de entre 112 a 660 aminoácidos) que codifica la proteína de la cápside en forma de homodímeros icosaedros (Xing y col., 1999). Está separado del ORF1 por 38 pb en sentido 3'. Este gen codifica la principal estructura proteica de la cápside del virión y una glicoproteína de 71-88 kDa de 660 aminoácidos, con una región que contiene una alta concentraciones de arginina y de lisina para el retículo endoplásmico y se expresa tanto a nivel intracelular como en la membrana celular, esta proteína se sintetiza como un precursor de la secuencia de señal, y está glicosilada en tres posibles sitios: el dominio S que forma la cápside, el dominio M un pequeño dominio hidrofóbico formado por 20-27 aminoácidos que atraviesa la capa lipídica y ancla la glicoproteína a la membrana, y el P que se relacionan con la interacción virus-célula huésped (Zafrullah y col., 1999 Xing y col. 2010). Algunos autores resaltan que el tamaño de las partículas y la modificación de las proteínas virales infecciosas no se han determinado todavía. Existe una afinidad filogenética del VHE con el virus de la rubéola (género Alfavirus), en el que es característica la protuberancia de la glicoproteína (Emerson y col., 2001

2.2.3. El marco de lectura ORF3

El ORF3 es el último marco de lectura abierta y el más pequeño. Se encuentra entre ORF1 y ORF2. El ORF3 se superpone el segmento del ORF1 en un nucleótido cerca de su extremo 5' y en el extremo 3' de ORF2 se superpone por 328 nucleótidos (Wang y col., 2000). En el

genotipo IV está formado por una proteína de 114 aminoácidos, mientras que el tamaño de la proteína en otros genotipos del VHE es de 123 aminoácidos. El genotipo del grupo IV carece de los primeros 9 a 32 aminoácidos, estos codifican para el dominio hidrófobo asociado con la unión del citoesqueleto. La función de esta proteína aún no se sabe con exactitud y se mantiene oscura (Emerson y Purcell, 2003). No se sabe si la proteína del ORF3 es una parte de un virión, o si se trata de una proteína no estructural, pero algunos estudios han postulado su papel como un elemento de anclaje de las partículas víricas con el citoesqueleto de las células hepáticas, actuando como elemento importante en el proceso de ensamblaje de las partículas víricas (Zafrullah y col., 1997) (Ver figura1).

Genoma VHE

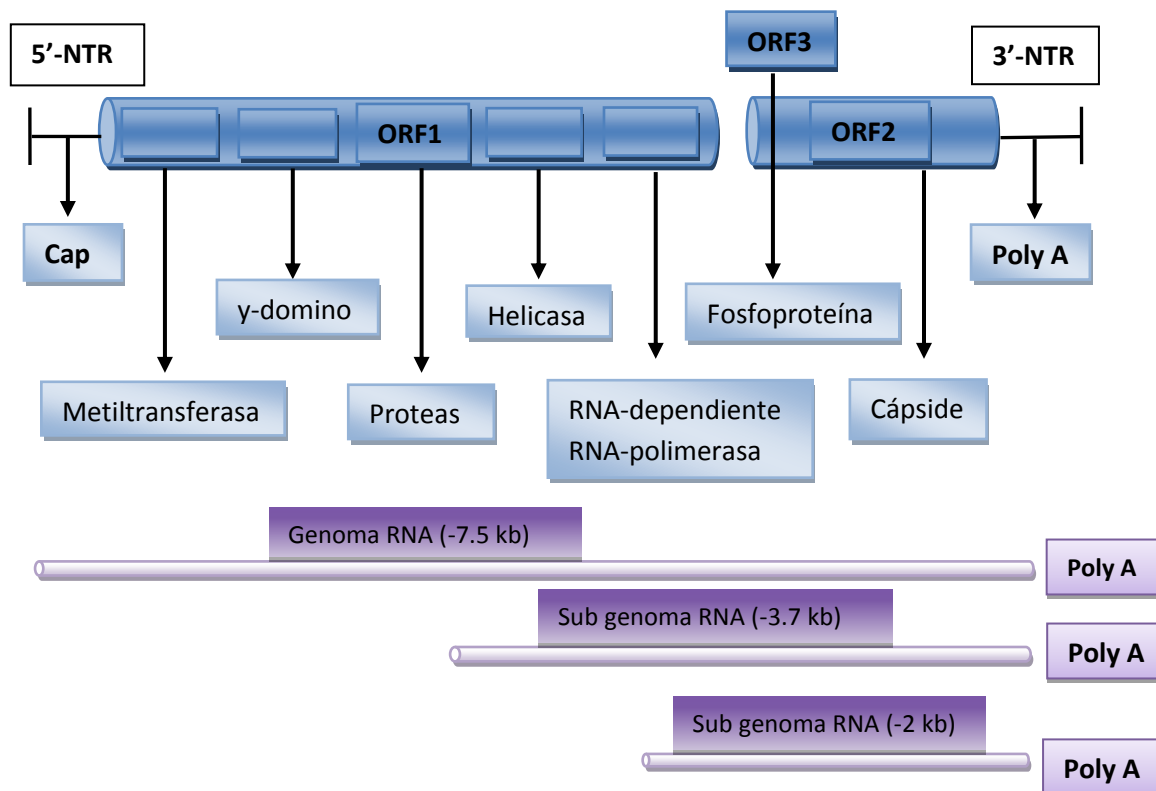


Figura 1 Organización del genoma del Virus de la hepatitis E. Tomado y modificado de Mirazo, (2014)

Por lo tanto, ORF2 y ORF3 se traduce en una sola bicistrónico de RNAm y se superponen entre sí, pero no se superpone con el ORF1. Por otra parte el ARN genómico viral es

contagiosa en algunas células cultivadas y en los primates, la transfección con grandes cantidades de genomas recombinantes pueden generar viriones infecciosos (Emerson y col., 2004b). Ahora se sabe que los cerdos y los pollos son reservorios del VHE y son causantes de una zoonosis (Meng 2010). Otros estudio revelan el papel de la región hipervariable del ORF1 en la replicación y la patogénesis del VHE en el pollo y cerdos (Pudupakam y col., 2009).

La secuencia del genoma del VHE es relativamente estable. La identidad nucleotídica entre aislados de un mismo brote es alta y al realizar pasos seriados en monos *cynomolgus* no existieron en los resultados una deriva genética (Arankalle y col., 1999). La mayoría de las sustituciones nucleotídicas son silenciosas, especialmente en las regiones del ORF2 y ORF3 y únicamente la secuencia hipervariable del ORF1 presenta una considerable diversidad de aminoácidos (Yarborough y col., 1991, Worm y col., 2002).

2.2.4. Cápside

El VHE posee una cápside icosaédrica sin envoltura de unos 27 a 34 nm. de diámetro. El VHE tiene propiedades similares a muchos otros virus, por lo que es complejo clasificarlo. Durante un tiempo el VHE se clasificó en la familia *Caliciviridae*, debido a que compartía características físico-químicas con los miembros de esta familia. Estos se caracterizaron por presentar 32 depresiones con forma de copa en su superficie. Al compararlo con los miembros de esta familia, la partícula viral del VHE era ligeramente más pequeña así como las características de su superficie además de que las espículas y las depresiones eran más suaves (Worm y col., 2002).

2.3. Descripción general

2.3.1. Características físico-químicas y estabilidad

El virión del VHE presenta un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 183s. Así mismo se han detectado partículas del virus que sedimentan en 165s, pero se cree que son defectuosos. La densidad en gradiente del tartrato de potasio y glicerol es 1,29 g / ml (Purcell, 1996). En condiciones de laboratorio el VHE es bastante lábil. Se observa la desintegración

del virus durante la centrifugación para la obtención de los gradientes con cloruro de cesio (CsCl), ya que es extremadamente sensible a las altas concentraciones salinas utilizadas (Tam y col., 1997). Es necesario el mantenimiento a temperaturas tan bajas como sea posible, aunque se degrada fácilmente durante la congelación y descongelación (Balayan 1997, Yarbough 1999). También es sensible a los enzimas proteolíticos (Bradley 1992, Bradley 1994, Ticehurst 1999). Los desinfectantes yodados y el autoclave destruyen el virus (Ticehurst 1999). Por otra parte, se ha observado que los viriones se mantienen inalterables después de la exposición a trifluoro-tricloroetano (Purcell y Emerson 2001). Su vía de transmisión (fecal-oral) hace pensar que también es relativamente estable a pH ácidos y medios básicos (Harrison 1999, Purcell 1996) y la detección del virus en agua residual sugiere que el virus sobrevive relativamente bien al ambiente (Harrison 1999). En un estudio realizado por Pina y col. (1998) para establecer la supervivencia de una cepa del VHE con una concentración conocida y a una temperatura de 20° C en aguas residuales observaron una T₉₀ (tiempo requerido para el decaimiento del 90% del virus) a los 20 días y una T₉₉ a los 39 días, que en estas condiciones era inferior a las encontradas en los estudios realizados en poliovirus tipo-1.

2.4. Diversidad genética

Exceptuando la Región hipervariable contenida dentro del ORF1, El genoma del VHE es relativamente estable (Arankalle y col., 1999). La mayoría de la variación que se observa a este nivel, son sustituciones del ARN que no provocan cambios en la secuencia de los aminoácidos. Mientras que en el ORF2 y ORF3 son especialmente conservadoras (Yarbough y col., 1991). Se ha observado que existe una elevada similitud nucleotídica de las secuencias aisladas de los brotes durante las epidemias, a pesar que las mutaciones que se han encontrado son exactas entre las cepas del VHE obtenidas de diferentes pacientes en los brotes de algunos países. Esto sugiere la existencia de numerosas cepas relacionadas, cada una con cambios propios, que circulan simultáneamente en el mismo brote. En general, estas cepas presentan características genéticas propias que las distinguen de las cepas causantes de otros brotes (Aggarwal y col., 1999). También se han observado diferencias de las secuencias en diferentes zonas geográficas presentando más variaciones entre ellas que las secuencias de cepas de una

misma zona. Estas diferencias representan sustituciones silenciosas y son únicamente Secuenciasshipervariables del ORF1 donde se presentan diversidades importantes de aminoácidos (Worm y col., 2002).

Durante muchos años, el VHE ha sido considerado un virus limitado a zonas tropicales y subtropicales calificadas como endémicas. Se describieron cepas causantes de epidemias y de casos esporádicos en India, Birmania, China, y Pakistán, donde la mayoría de los aislados presentaban secuencias similares a la secuencia de la cepa prototipo birmana, conformando el genotipo 1.

El único aislado genéticamente diferente identificado inicialmente fue el proveniente de un brote de hepatitis E en México (Huang y col., 1992). Era el único miembro del genotipo 2. La aparición de nuevas secuencias aisladas a partir de muestras de pacientes con hepatitis agudas en regiones industrializadas consideradas no endémicas por el VHE (E.U., Italia, Grecia, España) (Kwo y col., 1997; Zanetti y col., 1999; Schlauder y col., 1999; Pina y col., 2000), aportaron nuevos datos que indicaban una mayor diversidad genética de la que se creía. Estas cepas presentaban secuencias significativamente diferentes de las encontradas en regiones endémicas y eran bastante similares entre ellas. La secuenciación del genoma completo de las cepas de los EE.UU. mostraron la existencia de un tercer genotipo, el 3. Las secuencias estudiadas de las cepas europeas corresponden a fragmentos muy pequeños del genoma imposibilitando una clasificación genotípica definitiva. Estos datos disponibles indican que forman parte del genotipo 3, junto con las cepas de EE.UU. y Japón (Schlauder y col., 1999). Durante los últimos años se han descrito cepas procedentes principalmente de China y Japón, que son distinguibles de todas las anteriores, y que forman parte de un cuarto genotipo, el 4 (Hsieh y col., 1998, Wang y col., 1999, Wang y col., 2000. Worm y col (2002) definen un genotipo como un conjunto de virus con una divergencia nucleotídica inferior al 20% en la región ORF2. Según este criterio, las distintas cepas se clasifican en los 4 grandes genotipos descritos anteriormente. El genotipo 1 cepas Africanas y Asiáticas presentando una diversidad muy baja. El genotipo 2, formado por la cepa Mexicana y algunos aislados de Nigeria. El genotipo 3, formado por las cepas Estadounidenses, Europeas, Japonesas y Argentinas. El

genotipo 4, formado por aislados chinos y Japoneses detectados recientemente. Se ha observado que las secuencias de las cepas de origen porcino aisladas en una determinada región son más similares a las secuencias de las cepas aisladas a partir de muestras clínicas de pacientes humanos con hepatitis agudas en esta misma región que en las cepas porcinas de otras regiones (Hsieh y col., 1999, Pina y col., 2000, Meng y col., 1997, Okamoto y col., 2001). Hasta el momento, únicamente se han identificado cepas del VHE de origen porcino pertenecientes a los genotipos 3 y 4.

2.5. Diversidad serotípica

Las diferencias entre cepas del VHE se limitan a la secuencia de nucleótidos. Las secuencias aminoacídicas de las cepas de diferentes genotipos están altamente conservadas, apoyando la teoría más generalizada de la existencia de un único serotipo (Tsarevo y col., 1999). Únicamente se observan ciertas diferencias serológicas expresando antígenos del ORF3 (Yarborough y col., 1991, Khudyakov y col., 1993, Khudyakov y col., 1994). Durante un tiempo, se consideró que la cepa mexicana era el único miembro de un segundo serotipo minoritario (Bradley y col., 1991), pero las partículas víricas de un genotipo determinado reaccionan con los anticuerpos generados durante la infección producida por cualquiera de los otros genotipos descritos (Yarborough, 1999). Experimentos cruzados con varias cepas del VHE en primates han mostrado protección cruzada a la infección (Bradley y col., 1988, Tsarevo y col., 1993, Worm y Wirnsberger, 2004). Sólo se ha descrito un agente similar al VHE causante de una epidemia de hepatitis no-A, no-B en Siberia que no reaccionaba con sueros de pacientes con hepatitis E de otras regiones. Este agente, indistinguible del VHE cuando es observado por inmunomicroscopia electrónica, podría corresponder a un nuevo serotipo o bien a otro agente totalmente diferente (Purcell, 1996).

2.6. Replicación del Virus de la Hepatitis E

El virus de la hepatitis E entra al hospedador por vía oral. El sitio primario de replicación es el tracto digestivo, alcanzando al hígado por la vena porta, y finalmente se replica en el

citoplasma de los hepatocitos. No se conocen ni los receptores celulares para este virus ni el motivo de la cápside que reconoce estos receptores.

Los hepatocitos son las células diana por excelencia del VHE, pero estudios en ratas inoculadas experimentalmente con una cepa del VHE de origen humano han permitido identificar otros posibles centros de replicación, como los monocitos de sangre periférica, el bazo, los nódulos linfáticos y las células del intestino delgado (Maneerat y col., 1996). Reyes y col., (1993) propusieron un modelo para el ciclo replicativo basado en motivos conservados de dominios no estructurales y analogías entre el VHE y otros virus con genomas formados por ARN de cadena positiva. El modelo de replicación del VHE está representado en la Figura 2:

- a) El virión se une a un receptor de la superficie de la célula permisiva y es internalizado al citoplasma y, por mecanismos desconocidos, pierde la cápside proteica.
- b) La molécula de ARN genómico es traducida a una primera poliproteína no estructural (NSP) codificada por el ORF1 y que es procesada para generar las proteínas no estructurales con las diferentes funciones de metiltransferasa, proteasa, helicasa y replicasa.
- c) La replicasa que se ha formado puede utilizar el genoma vírico como molde para sintetizar las moléculas de ARN negativas que actuarán como intermediarios de replicación.
- d) Debido a la homología de secuencia con Alfavirus, se ha propuesto que a partir de estas moléculas de ARN negativas se forman dos clases de moléculas de ARN de sentido positivo: genómico y subgenómico.
- e) Las moléculas de ARN subgenómico se traducen para dar las proteínas estructurales codificadas por el ORF2, y posiblemente también la proteína codificada por el ORF3.
- f) Una vez generadas las proteínas estructurales, estas se ensamblan formando la cápside e incluyendo una molécula de ARN positivo genómica. La cápside viral empaqueta el genoma viral, en cuya superficie se unirá el proORF3 junto a una capa lipídica (eliminada en los viriones circulantes por un mecanismo desconocido). Finalmente, los nuevos viriones saldrán de la célula a través de un camino no bien definido, con la posible intervención del proORF3.

Esto da lugar a la progenie viral. Estos nuevos viriones pueden infectar otras células o ser liberados en la bilis y la sangre como partículas víricas infecciosas, pudiendo estar presentes en la bilis y las heces de la persona infectada desde el principio de la infección hasta 2 o 3 semanas tras la incubación de la enfermedad (Nanda col. 1995). ARN

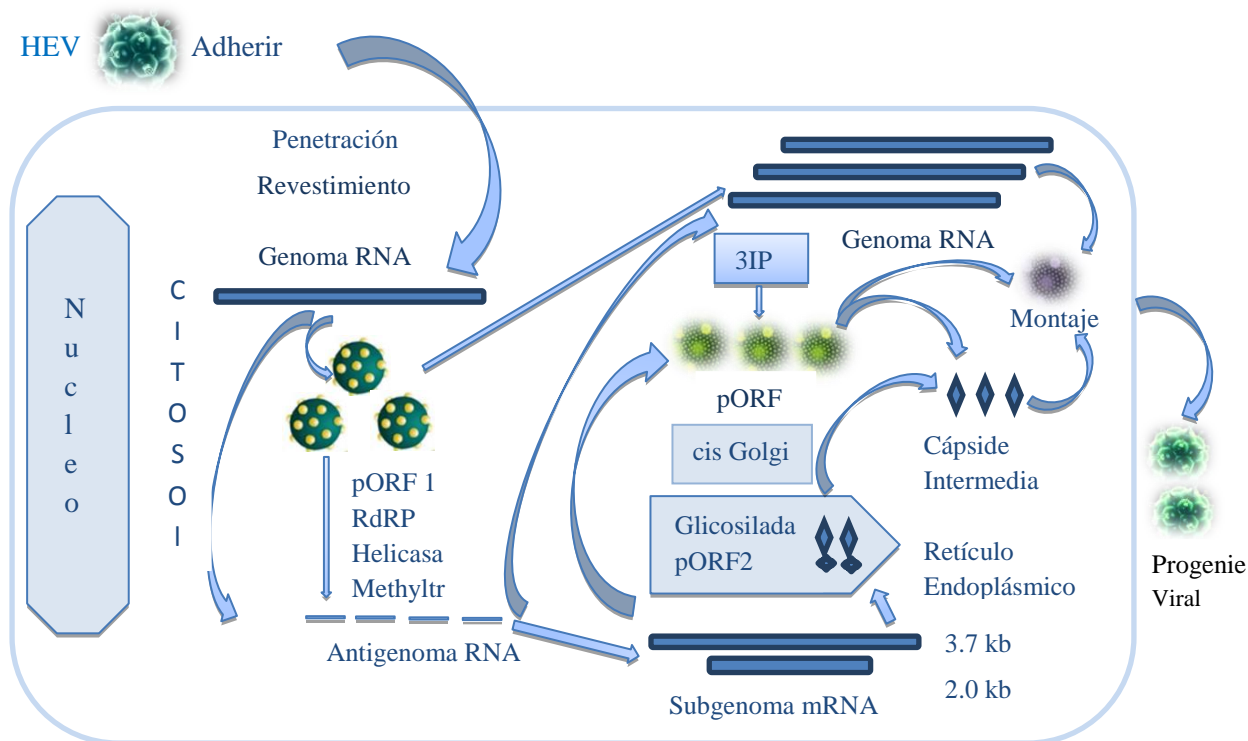


Figura 2 Replicación del Virus de la Hepatitis E dentro de la célula hepática; Tomado y modificada de Mirazo (2014)

2.7. Epidemiología de la Hepatitis E

2.7.1. Zonas endémicas y no endémicas

El virus de la Hepatitis E causa grandes epidemias principalmente en regiones tropicales y subtropicales de Asia, África y América Central (Mast y Alter, 1993). Así como en otros países. La seroprevalencia en Estados Unidos y Europa varía entre 1 al 5%, en pacientes de las áreas urbanas (Hillis y col. 1973).

La infección por el virus de la hepatitis E ha sido implicada en alrededor del 50% de los casos esporádicos de hepatitis viral aguda en países en desarrollo (Yarborough 1999, Clemente y col.,

2003). Estudios basados en el análisis del virus excretado en los desagües de zonas urbanas de España, así como en otros países como Estados Unidos, Grecia, Francia y Suecia, sugieren que las cepas de hepatitis E están más difundidas de lo esperado en los países industrializados (Buisson y col. 1994), regiones que son consideradas tradicionalmente como regiones no endémicas y donde el VHE causa únicamente casos esporádicos. Hasta hace poco estos casos se atribuían a cepas importadas de regiones endémicas (Balayan 1997, Aggarwal y Krawczynski 2000, Tagle 2007). Con la detección en los países industrializados de cepas del VHE en muestras clínicas de pacientes sin historial de viajes a zonas de riesgo, se ha planteado la posibilidad de la existencia de cepas autóctonas propias de estas regiones en donde la prevalencia de infecciones por el VHE podría ser superior a la considerada tradicionalmente (Jameel 1999). Algunos de los países europeos donde se han descrito casos de este tipo son: Austria (Worm y col., 2000), Holanda (Widdowson y col., 2003), Italia y Grecia (Zanneti y col., 1999; Schlauder y col., 1999), Francia (Mansuy y col., 2011), Reino Unido (Wang y col., 2001). En España también se han identificado cepas del VHE causantes de hepatitis agudas (Pina y col., 2000).

En América Latina, la hepatitis E fue detectada por primera vez en dos pueblos rurales ubicados en el sur de Ciudad de México en 1986 (Velázquez y col., 1990). En América del Sur, se reportaron casos esporádicos, siendo los tres primeros encontrados en Brasil (en Salvador de Bahía), país de la región con el mayor registro de infección por VHE (Paraná y col., 1997, Trinta y col., 2001, Lyra y col., 2005). En otro estudio se sugiere que la hepatitis E es endémica en el sur de Chile, específicamente en grupos étnicos de bajo nivel sociocultural (Hurtado y col., 2005). En Venezuela, se evidenciaron anticuerpos anti-VHE en el 1,6% de mujeres embarazadas provenientes de Caracas, en el 3,9% en poblaciones rurales y en el 5,4% en amerindios. Los autores del estudio sugirieron que Venezuela no parece ser un país altamente endémico para hepatitis E (Pujol y col., 1994). De igual manera, en 3 comunidades de la población indígena Yukpa, en el estado Zulia, se registró una prevalencia del 4,1 al 7,8 % de hepatitis E (Blitz-Dorfman y col., 1996).

En otra investigación se encontraron IgM anti-VHE en 2 muestras de 317 (0,63%) sueros de individuos con sintomatología de entre 15 y 16 años de edad y IgG anti-VHE en 20 muestras de 317 (6,3%) sueros de los individuos evaluados, de los cuales 9 correspondían a 20 pacientes con serología positiva para el VHA (45%), evidenciando la existencia de coinfección hepatitis A/E (Gutiérrez y col., 1999). En Uruguay, se detectó una prevalencia de anticuerpos anti-VHE del 1,2%, mientras que en Nicaragua ésta variaba entre el 4,6% y el 8% (Pérez y col. 1996, Cruells y col. 1997). En Cuba se ha reportado una prevalencia de 5,3% de hepatitis E en la Habana (Quintana y col. 2005) y en Bolivia se han reportado prevalencias de anticuerpos anti-VHE más altas que en otros países latinoamericanos (2-15%) y más significativas en zonas urbanas (48,7% en Cochabamba) que en áreas rurales del altiplano y la Amazonía (19-20%) (León y col, 1999). En estas regiones aparecen casos esporádicos de hepatitis y brotes epidémicos que se asocian mayoritariamente al consumo de agua contaminada con heces (Schlauder y Mushahwar 2001, Van del Poel y col., 2001). La mayoría de estos brotes aparecen en zonas rurales y se limitan a pocos individuos afectados (Worm y Wirnsberger, 2004), siendo responsable de más del 50% de las hepatitis agudas virales en muchos países subdesarrollados (Yarborough 1999).

Sin embargo, la enfermedad también puede aparecer en forma de brotes epidémicos, principalmente en regiones o situaciones donde la contaminación fecal de las fuentes de suministro de agua para el consumo es frecuente, o después de desastres naturales u operaciones militares, cuando grupos de refugiados se ven obligados a consumir el agua de fuentes incontroladas (Jameel 1999, Worm y Wirnsberger, 2004).

2.7.2. Seroprevalencia en la población

En todas partes se encuentran anticuerpos contra el virus de la hepatitis E pero las regiones de Asia y África son consideradas áreas endémicas, siendo la seroprevalencia entre individuos sanos más alta que en los individuos sanos de las regiones industrializadas. No obstante se observa que los valores de seroprevalencia en estas zonas endémicas son más bajos de lo que se podría esperar, situándose entre un 3% y un 26% (Purcell, 1996). En menores de 10 años la

presencia de la inmunoglobulinas IgG anti-VHE es rara, mientras que los niveles aumentan hasta un 10-40% entre adultos mayores de 25 años (Arankalle y col., 1995). Pero, en Egipto y en ciertas áreas de la India se ha descrito que los niveles de IgG anti-VHE en niños menores de 5 años eran superiores al 60% (Aggarwal y col., 1997). En países industrializados como EEUU y algunos de Europa los valores de IgG anti-VHE oscilan entre 1 y 5% (Paul y col., 1994), estos valores son altos si se acepta que los casos de hepatitis E son todos importados. En España, en un estudio de seroprevalencia donde se estudiaron 76 individuos sanos, fue del 5,5% (Buti y col., 1995), mientras que en individuos donadores de sangre fue de un 2,8% (Mateos y col., 1999). En Carolina del Norte, en los Estados Unidos de América, la seroprevalencia entre donantes de sangre oscilaba entre el 1,2 y el 1,4% (Mast y col., 1998), mientras que en la ciudad de Baltimore los valores llegaban al 21% (Thomas y col., 1997). En Japón se han encontrado niveles que varían entre un 1,9% y un 14,1% dependiendo de la localización geográfica (Li y col., 2000). Estos niveles podrían reflejar infecciones subclínicas para el virus, o bien tratarse de reacciones cruzada con otros agentes (Aggarwal y Krawczynski, 2000).

2.7.3. Vías de infección

La ruta fecal-oral es la vía de transmisión predominante del VHE (Mast y Krawczynski 1996, Khuroo 2003). Esto se ha demostrado en experimentos con voluntarios humanos que desarrollaron hepatitis tras ingerir filtrados procedentes de heces de pacientes con hepatitis E (Balayan y col., 1983, Chauhan y col., 1993).

2.7.4. El agua como vehículo de transmisión

La vía principal de transmisión del VHE es el agua contaminada con heces. Muchas epidemias se han presentado durante inundaciones, monzones o temporadas de lluvias, en donde el agua residual se ha mezclado con las reservas de aguas potables (Smith 2001). Estas epidemias también se ven favorecidas por circunstancias que impliquen acumulación de una gran cantidad de personas (campos de refugiados, barrios pobres de grandes ciudades) y una inadecuada disposición de las aguas fecales (Balayan 1997). En Vietnam e Indonesia algunos

brotos de hepatitis E se han dado en comunidades que viven junto a ríos, donde no existen infraestructuras sanitarias o estas son inadecuadas. Corwin y col. (1999) relacionaron los altos niveles de seropositividad del VHE en algunas de estas comunidades observando que usaban el agua del río para beber, cocinar y para la higiene personal; además la eliminación de los excrementos humanos se hacía en el río.

Además algunos brotes epidémicos se han dado en los meses más calurosos, cuando la reducción del caudal de los ríos incrementa el riesgo de infección por el VHE. Así mismo, se observó una disminución de la prevalencia de IgG anti-VHE en aquellas áreas donde el agua de río era hervida antes de usarla para beber o cocinar (Worm y col., 2002).

Algunos estudios han descrito la presencia de partículas virales o ARN del virus en aguas residuales de ciudades y de mataderos de ganado porcino de países industrializados, incluida España (Pina y col. 1998., Clemente y col. 2003). Sin embargo, estudios posteriores no han confirmado que haya un riesgo de infección a través de este tipo de aguas contaminadas por este virus en países industrializados. En un estudio realizado en los Estados Unidos, no se detectó el VHE en aguas de consumo ni en aguas superficiales recogidas de granjas de cerdos que estaban afectados por el VHE (Kasorndorkbua y col., 2005). Esta discrepancia de resultados puede reflejar la dificultad que entraña la detección de patógenos en muestras de aguas, donde normalmente se encuentran muy diluidos, y pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo estudios sistemáticos que permitan determinar con claridad el riesgo que pueden representar estas aguas contaminadas en los países no endémicos.

2.7.5. Transmisión por alimentos

Los alimentos mal lavados o la preparación de la comida con agua contaminada o manipulada por individuos infectados con el virus de la hepatitis E, pueden convertirse en una vía de transmisión de la infección, llevando a la aparición de brotes de hepatitis E, especialmente si la comida se consume sin cocinar y si además no se guardan las medidas higiénicas apropiadas. De cualquier modo, los casos de hepatitis E agudas asociados al consumo de alimentos son escasos. Algunos autores (Cacopardo y col., 1997, Tei y col., 2003) describen

casos de infección por VHE causados por el consumo de alimentos contaminados, como moluscos o carne cruda de posibles reservorios animales. También se ha descrito un caso de hepatitis E posiblemente asociado a la ingestión de una hierba medicinal de origen chino (Ishikawa y col., 1995).

Otro brote ocurrido en Sicilia (Italia), se atribuyó al consumo de marisco contaminado (Cacopardo y col., 1997). Más recientemente, algunos casos de hepatitis esporádica aguda o fulminante, ocurridos en Japón han sido relacionados con el consumo de hígado de cerdo y carne de jabalí crudas (Yazaki y col., 2003, Li y col., 2005).

La demostración definitiva del riesgo de infección que puede representar la comida fue aportado por el estudio realizado por Tei y col. (2003), donde se describen varios casos de hepatitis E aguda tras el consumo de carne cruda de ciervo infectado por el VHE. En este estudio, 4 de los 5 individuos que consumieron la carne infectada presentaron hepatitis, mientras que los 3 miembros restantes de la familia, que no la habían consumido, no se llegaron a infectar. Además, el único niño que no se infectó a pesar de haber comido carne de ciervo declaró haber ingerido una porción muy pequeña, lo que apoya la teoría de que la infección por el VHE es dependiente de la dosis. Los análisis de la secuencia del VHE obtenidas de los pacientes y de la carne de ciervo que sobró y que se guardó congelada mostraron, en la mayoría de los casos, un 100% de homología genómica.

2.7.6. Transmisión de persona a persona

La incidencia de transmisión horizontal de persona a persona es baja (Aggarwal y Naik 1994., Bile y col., 1994). Los casos documentados de pacientes con VHE entre miembros de una misma familia suponen entre el 1 y el 2% del total de casos descritos (Aggarwal y Naik 1994).

En casos epidémicos por contaminación de agua el papel de la vía persona-persona no es muy relevante, ya que la exposición de la población al patógeno es generalizada (Rab y col., 1997; Khuroo y col., 2004), pero en infecciones esporádicas esta vía de transmisión sí es importante. Khuroo y Dar (1992) observaron que el índice de afectados por el contacto doméstico con un enfermo de hepatitis E era de un 29%. En cuanto a la transmisión de persona a persona en

hospitales, los datos disponibles son contradictorios, tanto sobre la incidencia de la infección por el VHE en pacientes hospitalizados como en la población con riesgo de infección a través de sangre contaminada (Smith 2001). En Sudáfrica, 3 miembros del personal sanitario de un hospital desarrollaron hepatitis E tras atender a un paciente con fallo hepático fulminante por el VHE (Robson y col., 1992). En España, los datos obtenidos en varios estudios no han encontrado diferencias significativas entre los pacientes sanos y los pacientes con riesgo de adquisición de infecciones por vía sanguínea (Buti y col., 1995, Mateos y col., 1999).

2.7.7. Transmisión por otras vías

La transmisión del VHE por vía parenteral no está clara. Psychogiou y col. (1996) describieron una mayor seroprevalencia por el VHE en enfermos que necesitan hemodiálisis respecto a los donantes, aunque otros estudios no encuentran ninguna diferencia entre los dos grupos. Mientras que Arankalle y Chobe (1999) detectaron el genoma del VHE mediante RT-PCR en el suero de donantes sin evidencias de que los receptores desarrollaran la enfermedad. Khuroo y col. (2004), en un estudio retrospectivo en la India, encontraron marcadores de infección aguda por el VHE (IgM y ARN) en un 43,3% de los pacientes que habían recibido transfusiones sanguíneas 3 meses antes del análisis, en comparación con el 2% encontrado en individuos sanos que nunca habían recibido transfusiones de sangre. Hay evidencias de la transmisión vertical del VHE. Los datos de la tasa de transmisión del VHE de madre a hijo, aunque variables, son en general elevados (del 30- 100%) (Aggarwal y Naik, 1994, Kumar y col., 2004), y se ha descrito que hasta dos tercios de las mujeres embarazadas infectadas podrían sufrir partos prematuros, con una elevada mortalidad neonatal (Previsani y Lavanchy., 2001). Khuroo y col. (1995). La detectaron ARN del VHE en muestras de sangre de recién nacidos una vez que la viremia materna había resuelto. Kumar y col. (2001) observaron que el 100% de los neonatos de madres a las que se les había detectado ARN del VHE presentaban infección y síntomas clínicos.

Montella y col. (1994) Observaron que los hombres homosexuales con el virus de la inmunodeficiencia humana presentaban una mayor probabilidad de ser también positivos a las

infecciones por VHE que los hombres homosexuales sin el Virus de Inmunodeficiencia Humana. Otros estudios no encontraron ningún incremento del riesgo de padecer la infección por el VHE en grupos de pacientes afectados por el VIH (Bissuel y col., 1996).

2.7.8. Características epidemiológicas de la hepatitis E

Existen dos rasgos de la epidemiología de la hepatitis E únicos: la alta incidencia de la infección en adultos y la elevada incidencia de hepatitis fulminante con muerte subsecuente en las mujeres gestantes afectadas. La enfermedad puede variar de un rango de severidad subclínica a fulminante en el 0,5-3%. Estos antecedentes se emplearon como instrumento para el reconocimiento de la hepatitis E como una enfermedad nueva (Nanda y col., 1994).

El resumen de las características epidemiológicas básicas de la infección por VHE es (Worm y col., 2002, Mast y Krawczynski, 1996):

- Transmisión fecal-oral.
- Brotes epidémicos asociados a agua contaminada en áreas con condiciones sanitarias deficientes.
- Mayor tasa de afectados entre jóvenes y adultos, de entre 15 y 40 años.
- Mayor tasa de mortalidad en mujeres embarazadas (especialmente durante el 3er trimestre).
- Baja seroprevalencia (IgG anti-VHE) en zonas con brotes y casos esporádicos de hepatitis E.
- Baja tasa de transmisión por contacto persona-persona, falta de secuelas o cronicidad.

El virus es comúnmente detectado en personas entre 15 y 40 años de edad y en los niños, la infección por VHE es poco frecuente y a menudo no presenta síntomas (Moraes y Dutra 2002., Acharya y Panda., 2006).

La severidad de las infecciones por el VHE es moderada y se considera mayor que la de las infecciones por VHA. La mortalidad de la hepatitis E varía ampliamente, en una proporción de 0,4 a 4%, considerablemente alta en comparación con el 0,2% de la hepatitis A (Yayli y col., 2002).

El virus de la hepatitis E causa grandes brotes de hepatitis viral (Nanda y col., 1994), los cuales son más comunes en aquellas partes del mundo con climas calientes y escasos en regiones con climas templados (Berke y Matson 2000), cómo en el caso de México (Tavera y Richheimer 2008), donde el agua contaminada es la vía de transmisión, infectando principalmente a adultos jóvenes.

Por lo general, las epidemias de hepatitis E ocurren cuando se espera que la contaminación sea máxima, es decir, durante los meses de invierno y los periodos de fuertes lluvias.

El VHE produce una infección de amplia distribución mundial, especialmente en países en vías de desarrollo, presentándose en cualquiera de sus tres formas: epidémica, brotes aislados ó infecciones esporádicas (Tanno y Hay 2005).

Aproximadamente, un 20% de la población mundial proveniente de áreas endémicas se ha infectado con el virus de la hepatitis E (VHE) (CDC, 2011). Entre estas regiones se encuentran: el sudeste Asiático, Asia Central, África del Norte, Este y Occidental, América del Norte (México) y algunas regiones de Centroamérica. Las epidemias de la mayoría de estas regiones han sido confirmadas serológicamente como hepatitis E. La primera epidemia de esta infección, ocurrió en la India (Nueva Delhi) en 1955, cuando 29.000 casos de hepatitis se identificaron después de la contaminación fecal, diseminada ampliamente en el agua de consumo de la ciudad. Entre 1955 y 1956, se observaron presuntas epidemias de hepatitis E en la Unión Soviética y el sudeste Asiático incluyendo Birmania y Nepal (Myint y col., 1985; Hillis y col., 1973).

2.7.8. Diagnóstico Tradicional para la detección del Virus de la Hepatitis E

El diagnóstico de la infección se realiza normalmente mediante la determinación de anticuerpos específicos anti-VHE (isotipos IgM e IgG) en el suero del paciente.

Las pruebas serológicas de inmunoensayo enzimático (ELISA) son las técnicas más desarrolladas que actualmente se utilizan. Estas pruebas utilizan proteínas estructurales del

ORF2 y ORF3 de las cepas virales recombinantes del VHE de los prototipos birmano y mexicano. Ghabrah y col. (1998), en un estudio comparativo de pruebas diagnósticas, observaron que aquellas que utilizaban antígenos recombinantes derivados de la ORF2 eran más sensibles para detectar inmunoglobulinas IgG e IgM anti-VHE que los que utilizaban proteínas derivadas de la ORF3. Además, cuanto más larga era la proteína, tanto del ORF2 como del ORF3, más sensible era la prueba.

La presencia de anticuerpos anti-VHE isotipo IgM evidencia una infección aguda por el VHE, mientras que los anticuerpos anti-VHE isotipo IgG son un marcador de infección presente o pasada por el VHE.

Se ha sugerido que debido a que la fase aguda de la hepatitis E es de corta duración, se investigue sólo los anticuerpos IgG anti-VHE a nivel diagnóstico por ser este marcador de aparición precoz y mantenido en el tiempo (Ke y col., 1996).

En otros estudios comparativos de los diferentes tests ELISA y Western Blot utilizados habitualmente por los laboratorios en muestras de suero, mostraron que la sensibilidad variaba entre un 17% y un 100%, y que la concordancia entre las pruebas variaba entre el 0 y el 89% (Mast y col., 1998). Este estudio sugiere que las diferentes pruebas disponibles actualmente para la detección de anticuerpos contra el VHE son útiles cuando se aplican en pacientes con hepatitis agudas, sobre todo en las zonas consideradas endémicas, pero la interpretación de los resultados obtenidos en estudios de seroprevalencia es cuestionable (Aggarwal y Krawczynski 2000).

El diagnóstico en las infecciones por el Virus de la Hepatitis E se ha realizado también por visualización de las partículas víricas, presentes en el suero o en las heces de pacientes infectados, por medio de la microscopía inmunoelectrónica. Este es un método muy específico, pero caro y poco sensible, que requiere de un operador altamente entrenado además de utilizar mucho tiempo y cantidades considerables de antígeno y anticuerpo, por lo que actualmente ya no se utiliza para el diagnóstico (Quintana y González 2003).

El desarrollo de las técnicas de detección molecular permitió la aparición de una nueva técnica de diagnóstico, la amplificación por RT-PCR del genoma del VHE, que permite determinar su presencia o ausencia en muestras de suero, alimentos, agua o heces. Esta es una técnica cara, pero muy sensible, que se puede utilizar como prueba confirmativa, aunque requiere especial atención en el transporte, manipulación y conservación de las muestras. (Aggarwal y Krawczynski 2000).

CAPITULO TRES

MATERIALES

Y METODOS

METODOLOGÍA:

3.1. **Ámbito territorial del estudio y características de la población porcina.**

Todas las muestras incluidas en el estudio fueron obtenidas dentro del Estado de Nuevo León, México.

El Estado de Nuevo León, se localiza en la región Noreste de México, cuya capital es la ciudad de Monterrey, N.L., está situado en el extremo Noreste de la República Mexicana. Se localiza entre los paralelos 23°10'00" y 27°47'30" de latitud Norte y entre los 0°42'16" al Oriente y 2°5'5" al poniente del meridiano los 98°24'38" y 101°12'9" de longitud Oeste del meridiano de Greenwich. Limita al Norte con la parte Noreste del estado de Coahuila, la parte Sur del Estado de Texas de los Estados Unidos de América, en la zona fronteriza del municipio de Anáhuac en la congregación Colombia y con el Estado de Tamaulipas; hacia el Oeste limita con Coahuila, San Luis Potosí y con Zacatecas; al Sur comparte todo su límite oriental con San Luis Potosí y Tamaulipas. La superficie de Nuevo León es de 64,555 km²; mide 509 km en su parte más larga de Norte a Sur y 269 km en su parte más ancha de Este a Oeste.

Tiene la forma de un polígono irregular y alargado y su extensión ocupa el décimo tercer lugar en México. En Nuevo León se tienen registradas un total de 86 granjas de cerdos, con alrededor de 231,407 cerdos en total y distribuidos en entre las diferentes fases de desarrollo (iniciación, crecimiento, finalización, vientres, lactancia y verracos). Las granjas porcícolas del Estado se caracterizan por la mediana tecnificación de sus procesos productivos y se distribuyen en total en 20 municipios del estado (Tabla 3 y figura 3). Cerca de 30 granjas se encuentran en municipios ubicados dentro o alrededor del área metropolitana de Monterrey, N.L. y la mayoría de la faenización se realiza en rastros Tipo Inspección Federal (TIF) localizados dentro de la zona metropolitana.

Tabla 3 Número de cabezas de ganado de las granjas de cerdos del Estado de Nuevo León, México, y su localización geográfica

Municipio	Numero de Granjas	Total de animales
Allende	7	19177
Apodaca	2	5800
Cadereyta	16	71092
Cerralvo	2	717
Ciénega de Flores	1	4506
Dr. Coss	1	2710
Dr. González	8	34711
El Carmen	1	1128
García	1	4320
General Terán	2	2804
General. Zuazua	10	24899
Juárez	3	3697
Los Ramones	4	4043
Marín	3	1573
Mina	1	773
Montemorelos	7	14114
Pesquería	5	12693
Sabinas Hidalgo	4	6595
Salinas Victoria	7	13074
Santa Catarina	1	2573
Total de Granjas	86	
Total de animales cerdos		231,407

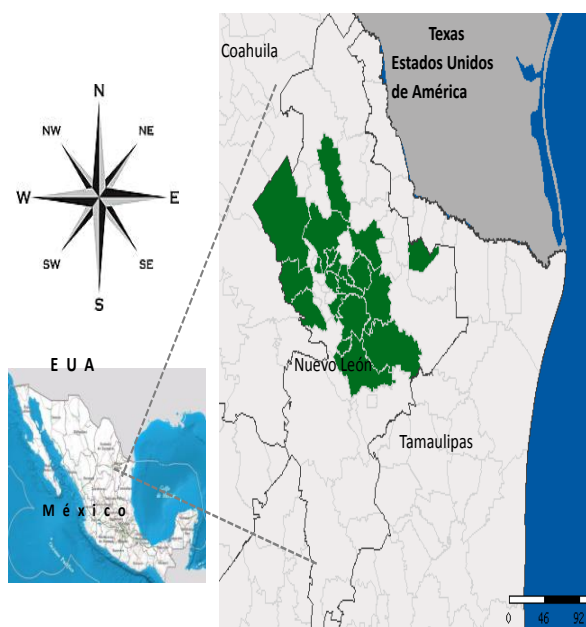


Figura 3. Posición geográfica relativa del Estado de Nuevo León, México y ubicación de los municipios muestreados y con mayor proporción de granjas de cerdos. Fuente: Corporación para el Desarrollo Agropecuario con datos de la Dirección Pecuaria de la CDANL y de la Unión Regional de Porcicultores de Nuevo León

<http://www.camponl.gob.mx/oeidrus/direcgranjasporni.htm>

En el estado de Nuevo León también ocurre una población no cuantificada de jabalí (*Sus scrofa scrofa*) y cerdo (*Sus scrofa domesticus*) silvestre o feral ya sea deambulando libremente o ubicados en ranchos cinegéticos. En las zonas rurales de Nuevo León y zona Noreste del país es común la presencia de cerdos de traspatio, que son alimentados en la mayoría de los casos con desperdicios de cocina y criados con baja tecnificación.

3.2. Plan de trabajo.

El desarrollo del presente estudio fue llevado a cabo en cinco fases.

- La Primera fase consistió en desarrollar los experimentos necesarios para poner a punto la técnica RT-PCR para la detección del VHE. Esta fase fue realizada en el Laboratorio de

Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

- La Segunda fase fue llevada a cabo para determinar la presencia del VHE en el rastro municipal de Monterrey, N.L. mediante la detección molecular a través de la técnica de RT-PCR semi-anidado a partir de muestras de hígado y excretas de cerdos faenados.
- La Tercera fase consistió en el análisis de excretas fecales porcinas obtenidas a partir de granjas de cerdos de Nuevo León que resultaron positivas en la segunda fase del estudio, para determinar la presencia del HEV mediante la técnica de RT-PCR semi-anidado.
- La Cuarta fase consistió en un muestreo aleatorio y análisis posterior de tejido de hígados frescos comercializados en carnicerías y centros de venta de diferentes municipios para determinar la dispersión del HEV en estos productos en el Estado de Nuevo León.
- La Quinta fase consistió en la caracterización de las cepas aisladas/detectadas selectas del virus mediante el análisis de su secuencia genética y su filogenia para determinar los genotipos circulantes del VHE en el Estado de Nuevo León, México.

3.3. Toma de muestras y envío al laboratorio

En la segunda fase del estudio se recolectaron un total de 87 muestras tomadas al azar, de cerdos de entre 5 y 6 meses de edad procedentes de las diferentes granjas porcinas y faenados en el rastro municipal de Monterrey, N. L., especializado en cerdos con la categoría de “Tipo Inspección Federal” (TIF). Estas muestras procedieron de 25 granjas porcícolas de 12 municipios del Estado de Nuevo León (Tabla y Figura 4). Las muestras se tomaron aleatoriamente siguiendo el sistema de números aleatorios indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994 (www.senasica.gob.mx). De los animales seleccionados se tomaron los siguientes tipos de muestras: hígado y heces. Una vez que se obtuvieron las muestras, estas se colocaron en bolsas de polietileno que fueron selladas y depositadas en hieleras comunes de poliestireno, conteniendo gel refrigerante, para ser transportadas al laboratorio de Virología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Tabla 4. Relación de las granjas de origen de los hígados muestreados en el rastreo TIF del Municipio de Monterrey, N.L.

	Municipio	Granja	No. de Animales	Total
1	Allende	Perseverancia	80	80
2	Cadereyta	La Esperanza	46	556
		Santa Mónica	60	
		Ericka	180	
		La Prieta	240	
		Granja ABC	30	
3	Ciénega de Flores	El Puente	40	40
4	Dr. González	El Tropezón	240	672
		Las Tres G	432	
5	Escobedo	La Paz	11	22
		Gran (S/Nombre)	11	
6	Juárez	Carmen	20	20
7	Montemorelos	El Arco	17	37
		Los 3 Cochinitos	20	
8	Pesquería,	Grupo 83	90	175
		Cochinitos	20	
		El Aguacate	65	
9	Salinas Victoria	Picachos	70	95
		Granja "AL"	25	
10	Santa Catarina	El Palmar,	47	47
11	Los Ramones	Terca	40	40
12	Zuazua	El Machaco	39	199
		1 ^o de Marzo	70	
		Santa Teresita	50	
		Los Caballos	40	
			Total	1983

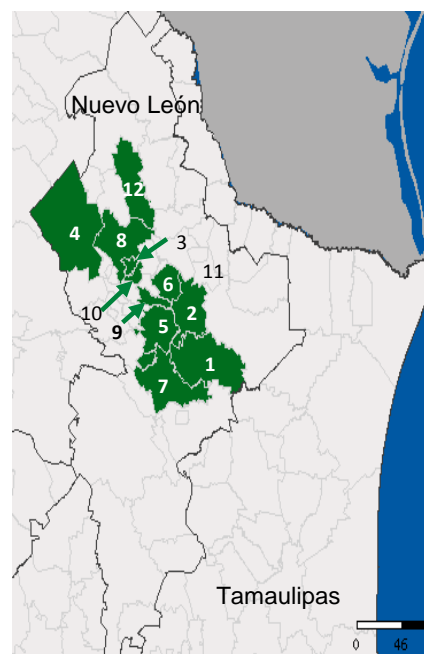


Figura 4. Ubicación geográfica en los Municipios en el Estado de Nuevo León, México de las granjas donde procedían los cerdos para el rastreo.

En la tercera fase del estudio se muestreo la población de cerdos reconocida como la fuente primaria de contaminación. En esta etapa se recolectaron 233 muestras de materia fecal de cerdos de distintas etapas de desarrollo (iniciación, crecimiento, finalización, gestación y lactancia). Las muestras fueron obtenidas de 26 granjas porcinas localizadas en 13 municipios del estado de Nuevo León, México (Tabla y Figura 5). Las muestras se tomaron azar a partir de 5-10 animales de un corral de la granja siguiendo el sistema de números aleatorios indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994 (www.senasica.gob.mx) como fue

señalado previamente. Las muestras obtenidas se enviaron en condiciones de refrigeración al laboratorio en un plazo no mayor de 12 horas posteriores a la colecta.

Una vez obtenidas las muestras, se colocaron individualmente en una bolsa de polietileno transparente (plástico). Cada bolsa fue identificada con los siguientes datos: Tipo de producto, Número de lote, Fecha de colecta, nombre de la granja, ubicación e iniciales de quien obtuvo la muestra. Una vez realizado lo anterior, todas las bolsas se colocaron en otra bolsa de plástico transparente, de la que se extrajo el aire residual sellándola con cinta adhesiva. La bolsa se depositó en una caja de unicel acompañadas de refrigerantes o hielo seco manteniendo las muestras a temperatura de congelación ($\pm 20^{\circ}\text{C}$). La caja, se selló con cinta adhesiva en la superficie de la caja y se adhirió una etiqueta con los datos del remitente: Granja y Dirección con código postal. Las muestras después de colectarse y empacarse, se enviaron al laboratorio de Virología Veterinaria de la FMVZ UANL para su análisis.

Tabla 5. Relación de las granjas de los diferentes Municipios del Estado de Nuevo León de donde se recolectaron muestras de excretas porcina

Numero	Municipio
1	Allende
2	Cadereyta Jiménez
3	Ciénega de Flores
4	García
5	General Terán
6	Juárez
7	Linares
8	Mina
9	Montemorelos
10	Los Ramones
11	Salinas Victorias
12	Hidalgo
13	Vallecillo

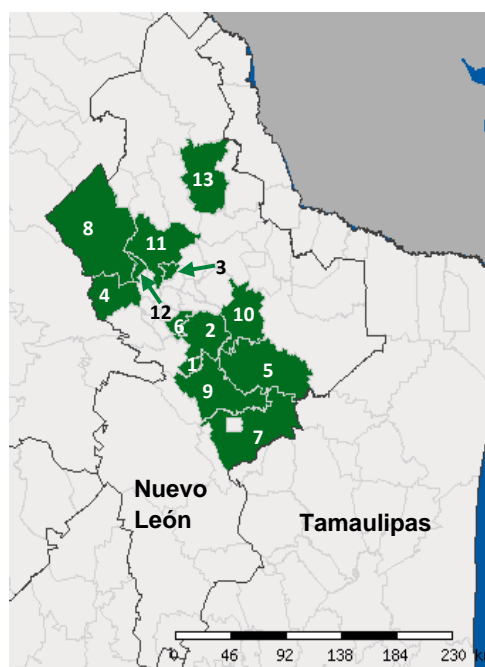


Figura 5 Localización geográfica de las granjas en el Estado de Nuevo León, México donde se recolectaron las muestras de Heces.

En la cuarta fase del trabajo se obtuvieron un total de 50 hígados de cerdo obtenidos de 20 carnicerías distintas localizadas en 10 municipios cercanos al área metropolitana de Monterrey

(Tabla y Figura 6). Cada una de estas muestras consistió en ± 500 gr de hígado de cerdo proporcionado directamente por el carnicero en cada establecimiento. Las muestras se enviaron en condiciones de refrigeración como fue señalado previamente en la fase 2.

Tabla 6. Relación de los puntos de venta (carnicerías) de los diferentes municipios del estado de Nuevo León de donde se obtuvieron muestras de hígado destinadas a consumo humano y su localización geográfica en el estado de Nuevo León, México.

Numero	Municipio	Carnicerías
1	Cadereyta Jiménez	3
2	Cerralvo	2
3	Ciénega de Flores	3
4	García	1
5	General Treviño	2
6	Montemorelos	3
7	Los Ramones	1
8	Sabinas Hidalgo	1
9	Salinas Victoria	2
10	Vallecillo	2

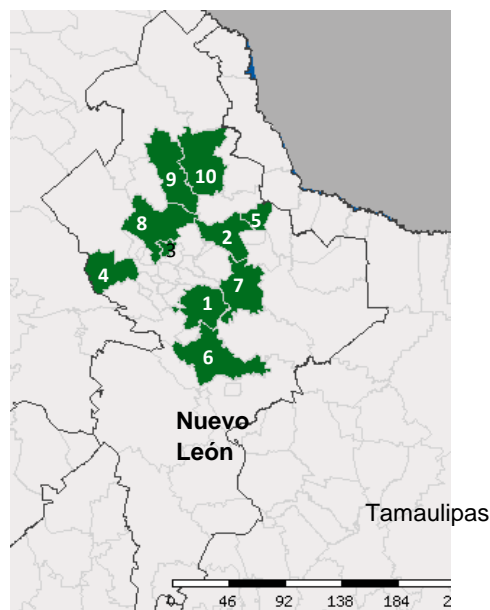


Figura 6. Localización geográfica de los diferentes municipios en el Estado de Nuevo León, México donde se encuentran los puntos de venta (carnicerías) donde se obtuvieron muestras de hígado destinadas para consumo humano.

3.4. Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Virología Veterinaria de la FMVZ-UANL. El manejo de las muestras en todas y cada una de las etapas del proceso de diagnóstico fue llevado a cabo bajo campana de seguridad biológica (Termo Scientific 1300 series A2, EEUU) con el propósito de evitar contaminaciones entre muestras y al personal de trabajo del laboratorio. Una parte del tejido hepático de alrededor de 500 mg fue separado y colocado en tubos de plástico tipo Eppendorf de 2 ml para su posterior uso en la técnica de RT-PCR. Otra parte del tejido de cerca de 20 gramos distribuidos en partes de cerca de 1 cm² fue conservado en formol amortiguado (Bio Basic Inc., Canadá) al 10% para su eventual uso en estudios de histopatológicos en caso necesario.

3.5. Extracción del ARN vírico de muestras de tejido hepático.

Para la extracción del ARN viral del tejido hepático se colocaron en un mortero limpio y estéril, aproximadamente 150 mg de tejido y se maceraron manualmente en presencia de nitrógeno líquido por 2 minutos. Se obtuvo el ARN total de la muestra con la ayuda del estuche comercial TRIzol[®] Reagent, siguiendo las recomendaciones del fabricante (www.lifetechnologies.com) y basado en el método descrito por Chomczynski (1993).

Al tejido macerado se le adicionó 1 ml de TRIzol[®] Reagent sobre el mortero y se incubó por un espacio de 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se transfirió la mezcla a un tubo de polipropileno y se le adicionaron 200 µl de cloroformo (Bio Basic Inc.). La suspensión fue mezclada mediante agitación suave, seguido de una etapa de incubación por 15 segundos a una temperatura de 30° C. Enseguida los tubos con la mezcla fueron centrifugados a 15.680 g durante 15 minutos a 4° C (Lambet Z300K International inc., Alemania). La fase superior o sobrenadante fue transferida con sumo cuidado a un tubo de polipropileno de 2 ml, a la que se le adicionó 500 µl de isopropanol (Bio Basic Inc.) y fue mezclado mediante agitación suave. Los tubos se incubaron durante 15 min a 25° C y transcurrido ese tiempo, se volvieron a centrifugar a 15,680 g a 4° C. Después de ésta última centrifugación se eliminó el sobrenadante y el precipitado restante se lavó con 1ml de etanol (Bio Basic Inc.) al 75%. Se repitió la centrifugación por espacio de 5 minutos a 4° C. Después de este tiempo se extrajo el sobrenadante y se retiró el exceso del etanol por inversión del tubo sobre una toalla de papel absorbente durante algunos minutos.

Posteriormente el ARN del precipitado se resuspendió en un volumen final de 30µl de agua tratada con dietil pirocarbonato grado de biología molecular (UltraPure[™] DEPC-Treated Water Invitrogen[™], EEUU). De cada muestra se tomó una alícuota de un µl para determinar la cantidad y pureza del ARN total mediante espectrofotometría a un rango de absorbancia de A_{260}/A_{280} (Epoch[™] Microplate Spectrophotometer, Biotek; EEUU, www.biotek.com). Las muestras cuantificadas fueron conservadas a -70° C hasta su uso en las reacciones de RT-PCR.

3.6. Extracción de ARN total de heces de cerdos en suspensión

La extracción del ARN total de las heces de cerdos fue llevada a cabo de manera similar a la extracción a partir del hígado porcino usando el estuche comercial TRIzol[®] Reagent (www.lifetechnologies.com). Previo a este proceso se preparó una suspensión de heces al 10% al mezclar un gramo de materia fecal con 9 ml de solución salina de tampón fosfato (PBS) (Bio Basic Inc.) estéril. La mezcla fue homogenizada en un tubo de polipropileno cónico de 15 ml con la ayuda de un agitador mecánico. Después de esta fase de homogenización la mezcla fue sujeta a centrifugación a 3,000 g durante 15 minutos a 4° C. El sobrenadante clarificado fue obtenido cuidadosamente y filtrado a través de una membrana de Polietersulfona (PES) con diámetro de poro de 0.45 µm (Millipore Bedford, MA, EEUU). Posteriormente, el filtrado se concentró alrededor de 10 veces usando una membrana Céntrico No. 10 (Filtrer Amicon, Alemania). El retenido fue conservado a -70° C hasta su posterior análisis.

Para la extracción del ARN total se mezclaron 750 µl de reactivo de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) y 250 µl del extracto filtrado y concentrado de las heces de cerdos a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se añadió a la mezcla 200 µl de un mix que contenía fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (Invitrogen) en una proporción (25:24:1 v/v) y a continuación se centrifugó a 15,680 g durante 15 min a 4° C (Lambet Z300K). Posteriormente, la fase acuosa incolora superior se transfirió a otro tubo y la misma se le adicionaron 500 µl de alcohol isopropanol (Bio Basic Inc.). Se mezcló manualmente e inmediatamente los tubos fueron centrifugados a 15,680 g durante 10 minutos a 4° C. El precipitado resultante fue lavado secuencialmente primero con 1 ml de etanol al 75% (Bio Basic Inc.) y luego con 500 µl de etanol al 100% con una etapa intermedia de centrifugación a 15,680 g durante 2 min y desechando el sobrenadante en cada etapa. Al final, se descartó el alcohol sobrenadante y los tubos fueron colocados en un ángulo de 90° sobre un papel absorbente y se permitió que se secase al aire. El pellet resultante fue resuspendido en 6 µl de agua estéril destilada libre de RNasa y DNasa (MQ agua desionizada Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) (Ver anexo 2).

La concentración y pureza del ARN fue determinado como se señala en la sección precedente con el uso de un espectrofotómetro a un rango de absorbancia de A_{260}/A_{280} (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, www.biotek.com). Todas las muestras fueron inmediatamente conservadas a -70°C hasta su uso posterior en las reacciones de RT-PCR.

3.7. Detección del VHE por RT-PCR

Para determinar la presencia de secuencias genéticas del VHE en las muestras, se realizó la técnica de RT-PCR semi-anidada descrita por Martin y col (2007) con ligeras modificaciones. Los oligonucleótidos y su secuencia fueron VHE-F1= TTVGGGCTYCTYGA CTTTGC, VHE-R1= CCRCCRAGAAGYGTATCAGC y VHE-R2= CCRCGRCCCACCTCACCAAC (Donde: V = A o C o G; Y = C o T; R = A o G). Los oligonucleótidos se unen a regiones altamente conservadas dentro de la ORF-2 y amplifican un fragmento de 212 pb dentro del gen que codifica para la proteína de la cápside del HEV y potencialmente pueden identificar cepas del HEV genéticamente diversas (Martin y col., 2007). La síntesis del ADN de la secuencia blanco seleccionada del HEV fue realizada con RT-PCR en una sola etapa con la ayuda del estuche comercial *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, www.lifetechnologies.com), referida de aquí en adelante como *SuperScript® III*, y siguiendo las recomendaciones del fabricante con ligeras modificaciones. En primera instancia se realizó un RT-PCR y PCR semi-anidado en gradientes de temperatura para determinar la temperatura óptima de unión de los oligonucleótidos. Las temperaturas analizadas fueron 44.4°C , 45.3°C , 46.0°C , 48.0°C , 50.2°C , 52.4°C , 53.4°C , 55.3°C , 57.0°C , 58.5°C , 58.9°C , 59.4°C . Para estos y todos los ensayos posteriores la reacción de PCR fue realizada a 35 ciclos. Para la RT-PCR se mezclaron en un tubo de reacción $0.5\ \mu\text{l}$ de HEV-F1 ($50\ \mu\text{M}/\mu\text{l}$), $0.5\ \mu\text{l}$ de HEV-R1 ($50\ \mu\text{M}/\mu\text{l}$), $8\ \mu\text{l}$ de agua mili Q y $5\ \mu\text{l}$ del extracto de ARN de cada una de las muestra a cada uno de los tubos. La mezcla fue incubada durante 6 min a 94°C y subsecuentemente a 4°C por 30 s, en este tiempo a cada tubo se agregó $36\ \mu\text{l}$ de una preparación que contenía $25\ \mu\text{l}$ de mezcla de reacción 2X (amortiguador que contiene $0.4\ \text{mM}$ de cada dNTP, $3.2\ \text{mM}$ MgSO_4), $1\ \mu\text{l}$ de *SuperScript® III* y $10\ \mu\text{l}$ de agua mili-Q (mezcla

conocida como mix para HEV). Después de realizar la RT-PCR y PCR semi-anidada de gradientes se escogió la temperatura de 48° C para la unión de los oligonucleótidos dado que a esta temperatura se observaron bandas del tamaño esperado de 212 pb con suficiente nitidez en los agarosa. Subsecuente a la determinación de la secuencia de nucleótidos (ver Tabla 7), de dos de los productos de PCR obtenidos se determinó que correspondían a las secuencias del HEV acorde a secuencias genéticas depositadas en el banco de Genes (GenBank®, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando el programa “nucleotide blast” del algoritmo BLAST® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los ensayos subsiguientes de RT-PCR y PCR-semi-anidado fueron realizados usando una de estas muestras como control positivo de reacción.

Tabla 7 Condiciones de gradientes de temperatura y fases de la RT-PCR empleadas para amplificar un fragmento genético (parte del gen ORF-2 del Virus de la Hepatitis E a partir de muestras de porcino.

	Temperaturas				ciclos
Desnaturalización	94° C 3 min	94° C 4 min	94° C 6 min		1
Enfriamiento	4° C 30 s	4° C 1 min	4° C 2 min		
Transcripción	50 °C 30 min				1
Desnaturalización	94° C 30 s	94° C 1 min	94° C 2 min		
Desnaturalización	94° C 50 s				35
Alineación	45.3° C 30	46.0° C 30s	48° C 30s	50.2° C 30s	
Amplificación	72° C 60 s				
Elongación final	72° C 7 min				1

3.8. PCR semi-anidado para VHE.

Para la amplificación de VHE por PCR semi-anidado se utilizó el estuche comercial *Platinum® PCR SuperMix* (Invitrogen, www.lifetechnologies.com) con ligeras modificaciones a las recomendaciones del fabricante. En breve, se mezclaron 45µl de *Platinum® PCR SuperMix* (22 U/ µl de *Taq* DNA polimerasa unida un anticuerpo anti-*Taq* *Platinum®*, 22mM Tris-HCL [pH 8.4], 55mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM de cada dNTP), 0.50 µl del oligonucleótido VHE-F1 (50µM), 0.50 µl de oligonucleótido VHE-R2 (50 µM) y 4 µl del

Producto del RT-PCR de la primera ronda de reacción. La mezcla fue sometida un ciclo de 94° C 50 s, seguido de 35 ciclos a 94° C 50 s, 48° C 30 s, 72° C 1min y un ciclo final de 72° C durante 7 min. Todos los ciclos de temperatura para llevar a cabo las reacciones de la RT-PCR semi-anidada fueron efectuados en un termociclador de gradientes automático (MAXYGEN Thermal Cycler, AXYGEN Scientific, Inc.) (Ver Tabla 8). Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis a 100V, 40mA, durante 45 minutos en gel de agarosa al 1.5% elaborado con solución amortiguadora de Tris-acetato-EDTA (TAE). La determinación del tamaño del ADN copia (ADNc) fue establecido al comparar los productos de la PCR contra un marcador de peso molecular (100 bp ladder DNA marker, Axygen Biosciences) y bajo previa tinción con bromuro de etidio, visualizados con una cámara de luz ultravioleta y con la ayuda del programa MultiDoc-It™ Imaging System (www.uvp.com). El tamaño del producto esperado fue de 212 pb. En cada ensayo de RT-PCR se incluyó agua como control negativo. El control positivo de reacción fue una muestra de hígado que resultó positiva al HEV mediante secuenciación, obtenida en el presente estudio.

Tabla 8 Condiciones de gradientes de temperatura y fases del PCR empleadas para amplificar un fragmento genético (parte del gen ORF-2 del Virus de la Hepatitis E a partir de muestras de porcino.

	Temperaturas				ciclos
Desnaturalización	94° C 30 s	94° C 50 s	94° C 2 min		1
Desnaturalización	94° C 50 s				35
Alineación	45.3° C 30 s	46.0° C 30 s	48° C 30 s	50.2° C 30 s	
Amplificación	72° C 60 s				
Elongación final	72° C 7 min				1

3.9. Purificación de los productos amplificados a partir de geles de agarosa

Los productos amplificados del VEH se purificaron a partir de geles de agarosa con la ayuda del estuche comercial *PureLink® Quick Gel Extraction* (www.invitrogen.com) de acuerdo a las condiciones descritas por el fabricante. Posteriormente, el ADN purificado fue cuantificado con la ayuda de un espectrofotómetro (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, Biotek;

Estados Unidos) a una longitud de onda de 260 / 280 nm. La cuantificación se realizó utilizando 2 µl del extracto de ADN en cada uno de los 16 pocillos de una microplaca (Take3 Micro-Volume Plates de Biotek). El cálculo se realizó usando un software para Análisis de Datos (Gen5™ Bio Tek, Estados Unidos) que permite que el ADN se cuantifique rápidamente, realizando los cálculos y exportando los resultados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel (La medida de la absorbancia a ambas longitudes de onda permitió saber el grado de pureza de la preparación de DNA, mientras que la medida a 260 nm permitió cuantificar la cantidad de DNA de cada muestra).

Se realizó también la secuenciación de los productos purificados utilizando el kit bigDye Terminator v3.1 Sequencing kit (Abi Prism, EEUU) en un secuenciador Genetic Analyzer 310 (Abi Prism). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las base de datos del GenBank (es parte de la colaboración de bases de datos de secuencias de nucleótidos Internacional, que comprende el Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ), el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) y GenBank en NCBI.) para la búsqueda de homologías con secuencias previamente reportadas.

3.10. Secuenciación de los productos Purificado de ADN del PCR

Para la secuenciación se utilizó el kit Abi Prism bigDye Terminator v3.1 Sequencing kit (Applied Biosystems, EEUU). Todo el contenido de los productos purificados se depositó en tubos Eppendorf de 1.5 ml. A cada tubo se le agregó 20 µl de acetato de Na (Sigma-Aldrich) al 3M, con un pH ajustado a 4.6. Posteriormente se les agregaron 50 µl de Etanol (Sigma-Aldrich) al 95%. En otro tubo que no contenga producto purificado se colocó el estándar interno (que es el pGEM-3Z + que contiene un cebador -21 M13 para realizar reacción de control) lo cual se agitó brevemente, para posteriormente dejar los tubos a temperatura ambiente durante 25 minutos para que se produjese una precipitación del producto. A continuación, los tubos se centrifugaron por 20 minutos a velocidad máxima de 30,733 g en una microcentrífuga de tubos Eppendorf (Lambet Z300K). Posteriormente se aspiró cuidadosamente el sobrenadante el cual se descartó. A cada uno de los pellets restantes se les

añadió 250 µl de metanol (Sigma-Aldrich) al 70%, agitándolos brevemente en un vortex. Después se centrifugaron de nuevo durante 5 minutos a una velocidad máxima de 62,720 g. Tras retirar el sobrenadante, la muestra resultante se secó a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar durante unos 15 minutos. Posteriormente se re-suspendió el pellet agregándole 25 µl de formamida (Invitrogen) y se incubó por 2 minutos a 95° C, enfriándolo a continuación en hielo antes de transferir 10 µl a un tubo de secuenciación. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático Abi Prism[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Este equipo, que funciona de manera totalmente automática, inyecta las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero que funciona como si fuera un gel de secuenciación, permitiendo separar los fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base, a una altura determinada del láser del dispositivo, detectando la fluorescencia emitida por cada una de las cadenas sencillas de ADN que habían sido marcadas con fluoróforos diferentes (Ver anexo 2).

3.11. Análisis de los datos de las secuencias

Después de las lecturas de las secuencias emitidas por el secuenciador automático, todas y cada una de las secuencias fueron analizadas para verificar su calidad. En caso de dudas en alguna posición o sitio en las bases, se realizó de nuevo la secuenciación. La secuencia final fue la secuencia consenso obtenida de tres análisis independientes a partir del mismo material del cDNA obtenido de cada muestra. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y manejadas manualmente con los programas EditSeq y MegAlign contenidos en paquete de programas computacionales DNASTAR[®] Lasergene 8. (Madison WI, EEUU). Las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos usados en el presente estudio fueron descartados para realizar el análisis de la homología de secuencias con otros miembros de la familia *Hepeviridae*. En primera instancia las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron enviadas para la búsqueda de homología con secuencias genéticas depositadas en el banco de Genes (GenBank[®], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando el programa “nucleotide blast” del programa BLAST[®] (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Una vez determinada la

homología con miembros de la familia *Hepeviridae* se obtuvo el número de acceso del GenBank® y la secuencia de aquella cepa o aislado que mostró una mayor homología. Estas secuencias junto con aislados prototipo de cada genotipo reportado del género *Orthohepevirus* fueron igualmente obtenidas para realizar los análisis filogenéticos y análisis de secuencias. Las claves de acceso al GenBank de las secuencias completas o parciales de las cepas seleccionadas reportadas como *Orthohepevirus*, así como las obtenidas en el presente trabajo y su referencia se muestran en la tabla (9).

3.12 Análisis filogenéticos.

Para realizar los análisis de secuencia final y filogenéticos de las secuencias obtenidas se excluyeron las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos empleados para amplificar parte del gen ORF-2 del HEV. Los análisis de homología, alineamiento múltiple de secuencias y de filogenia fueron realizados con el paquete de Bio-informática de DNASTAR® Lasergene 8. (Madison WI, EEUU). Las secuencias parciales del gen ORF-2 de otras cepas de *Orthohepevirus* fueron obtenidas y editadas con el módulo EditSeq. La homología de 172 / 174 pb resultante de cada muestra con las secuencias respectivas del *Orthohepevirus* fue calculada usando el módulo MegAlign usando el alineamiento múltiple de secuencias con el método de CLUSTALW (Thompson y col., 1997). Bajo este mismo módulo fueron realizados los cálculos del porcentaje de identidad y de divergencia de las secuencias. Los análisis de filogenia, homología e identidad y divergencia de las secuencias obtenidas en el presente estudio se realizaron en conjunto con las cepas seleccionadas de la familia Hepeviridae que se muestran en la tabla 9. Se empleó el método de Vecinos más Cercanos (Neighbor-joining) para construir el árbol filogenético de 172/174 nucleótidos obtenidos de las secuencias del presente trabajo con las secuencias respectivas de diferentes miembros de Hepevirus mediante MegAlign versión 8.1.0 (DNASTAR, Lasergene) con el algoritmo de alineamiento múltiple de secuencias Clustal-W y 1000 réplicas de bootstrap.

Tabla 9 Datos de las secuencias de las cepas de Hepeviridae¹ usados para los análisis de homología genética y filogenia

Cepa/aislado	TS	GenBank	O-	GT	H	Referencia / Autor
Xinjiang	C	D11092	A	1	Hu	Aye y col. (1992)
Burma	C	M73218				Tam y col.(1991)
México	C	M74506		2	Ce	Huang y col. (1992)
swJ1-4	P	AB094206				Takahashi y col. (2003)
swJ2-3	P	AB094209		Leblanc y col. (2007)		
swSTHY911	P	DQ832266		3	Hu	Matsubayashi y Sakata (2012) No publicado.
HRC-HE13	P	AB670951			Tokita y col. (2003)	
HE-JA10	C	AB089824			Ce	Huang y col. (2002)
01-15555A	P	AF466683				Meng y col. (1998)
01-21160-1	P	AF466659			Hu	Schlauder y col. (1998)
¿?	C	AF082843			Takahashi y col. (2007)	
VHE-US2	C	AF060669			Ce	Paiva y col. (2007)
JE03-1760F	C	AB301710			Co	Zhao y col. (2009)
swBRA	C	EF491206		4	Hu	Wang y col. (2000)
GDC9	C	FJ906895			Ce	Nishizawa y col. (2003)
HEV-T1	C	AJ272108		5	Ja	Takahashi y col. (2010)
swJ13-1	C	AB097811			Takahashi y col. (2011)	
JBOAR135-Shiz09	C	AB573435		6	Ca	Woo y col. (2014)
wbJOY_06	C	AB602441				
178C	C	KJ496143		B	1	Av
Avian HEV	P	AY043166	Huang y col. (2004)			
F93-5077	C	AY535004	C	1	Ra	Johne y col. (2010) 1455
R63	C	GU345042				
BatHEV/BS7/GE	C	JQ001749	D	1	Mu	Drexler y col. (2012)
swSTHY23	P	FJ617438	¿?	¿?	Ce	Simard y col.(2009)
sw4NLMx	P	ND	ND	¿?	Ce	Presente trabajo
sw5NLMx						
Sw7NLMx						
sw8NLMx						
sw9NLMx						

1: *Hepeviridae* = acorde a Smith y col. (2014). TS: Tipo de secuencia, C: Completa, P: Parcial, O-HEV: especie de Orto-Hepevirus, GT: genotipo, H: Hospedero, especie susceptible predominante; HU= Humano, Ce= Cerdo, Co=Conejo, Ja=Jabalí, Ca= Camello, Av= Ave, Ra= Rata, Mu= Murciélago, ¿?: se desconoce, ND: no hay datos.

CAPITULO CUARTO

RESULTADOS

4.1. Resultados del Objetivo 1

4.1.1.- Poner a punto la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a la Transcripción Reversa (RT-PCR) para la detección de la secuencia genética del virus de la Hepatitis E (VHE) en distintas fuentes de contaminación.

4.1.1.1. Puesta a punto de RT-PCR y PCR Semi-anidado.

Previo a la realización de la prueba de RT-PCR, se extrajo el ARN de la muestra. Para su utilización en el RT-PCR ésta debe tener una calidad alta y estar libre de ADN y nucleasas para el paso inicial de producción de una copia de ADN complementario (ADNc) del ARN de interés, a través de la acción de la enzima transcriptasa inversa o retro transcriptasa (RT) (Freeman y col., 1999). Cabe mencionar que la enzima RT que se utilizó en el estudio es la del virus de la leucemia murina Moloney o *Moloney Leucemia Murine Virus*.

Se utilizó un gradiente de temperatura en el termociclador con variaciones de 1 grado hasta encontrar la temperatura óptima. Después de la preparación de la mezcla (MIX), se procedió a realizar 35 ciclos para amplificar el DNAc.

Posteriormente de revisar cada uno de los datos obtenidos, se tomó la decisión de utilizar los rangos de temperatura con los cuales se obtenían una banda de producto esperado con la suficiente nitidez e intensidad sobre los geles de agarosa. Se determinó que las temperaturas óptimas bajo nuestras condiciones fueron: 94° C por 6 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de una fase de enfriamiento a 4° C por 2 minutos y subsecuentemente una temperatura de 50° C por 30 minutos durante sólo 1 ciclo para la transcripción reversa. Para el PCR se establecieron 35 Ciclos consistentes en: Desnaturalización a 94° C durante 50 segundos, alineación a 48° C durante 30 segundos y una amplificación a 72° C por 60 segundos. Al final se permitió una elongación a 72° C por 7 minutos. Transcurrido este tiempo se pasó a un transluminador en el cual se le toma una fotografía al agar para demostrar la presencia de producto de amplificación. En las figuras 7a y 7b se observan las condiciones que del termociclador y los resultados observados en la RT-PCR.

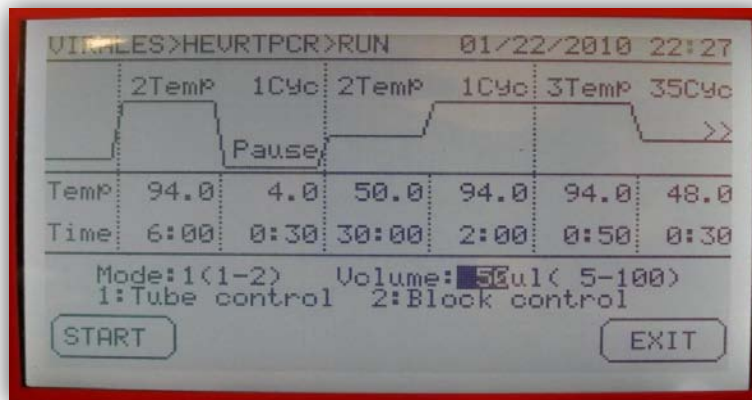


Figura 7a condiciones del termociclador en la técnica de RT-PCR para el VHE

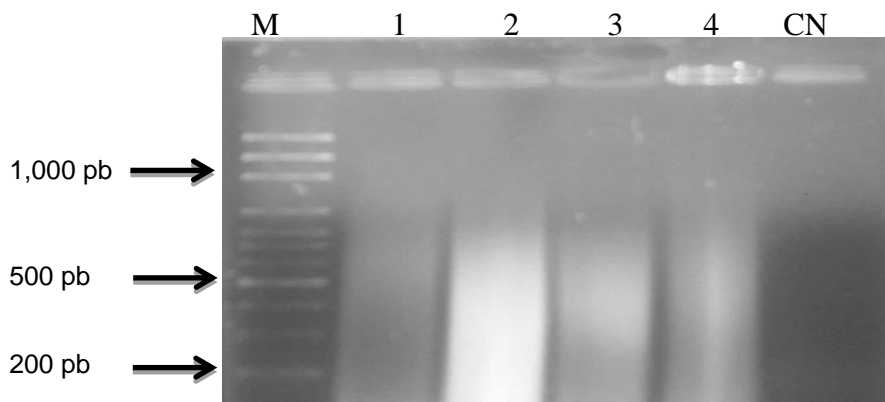


Figura 7b RT-PCR para el VHE Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de muestras de hígado en rastros de cerdos. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Condiciones de la electroforesis: 100V a 35 mA por 45 minutos, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular 100 pb., carril CN: control negativo, carriles 1-3: muestras de hígados.

El PCR-semi-anidado (segunda ronda) se realizó con la ayuda del estuche comercial del kit Platinum[®] Taq DNA Polymerasa Invitrogen PCR – TAQ-R-5 Taq Polymerasa Kit 500 Units y los primer VHE F1 TTVGGGCTYCTYGA^{CTTTGC} y VHE R2 CCRCGRCCCACCTCACCAAC. La reacción se llevó a cabo con 3.0 µl del producto de reacción de la RT-PCR (primera ronda). Para lo cual fueron depositados en tubos para PCR 200 µl. Se les agrego a cada uno 3.0 µl de muestra de la primera ronda del RT-PCR y posteriormente se colocaron en el termociclador. Las condiciones para la desnaturalización fueron 94° C por 50 segundos; para la alineación se bajó la temperatura a 48° C por 30 segundos y posteriormente se subió la temperatura para la amplificación a 72° C por 60

segundos. Esto se repitió por 35 ciclos y finalmente se mantuvo la temperatura a 72° C por 7 minutos para una elongación final (Figura 8a y 8b).

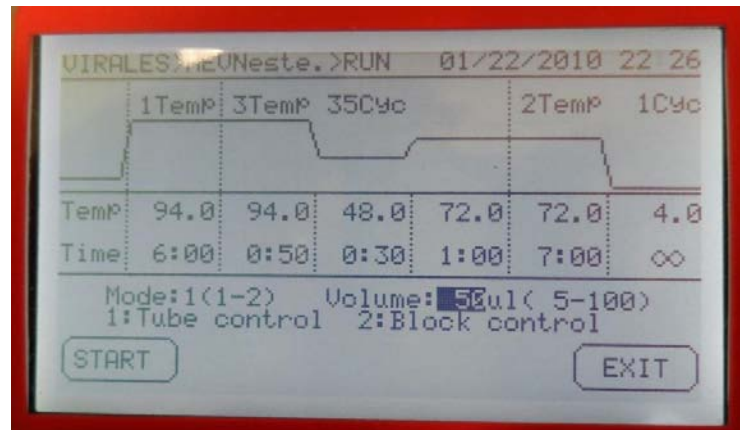


Figura 8a. Condiciones del termociclador para la tecnica de PCR para el VHE segunda ronda

Transcurrido el tiempo del termociclador, se colocaron 8 µl de cada reacción más 3 µl de buffer de corrimiento en una gel de agarosa al 1.5 % (productos del RT-PCR y del Semi-Nested PCR). Este gel se puso en una cámara de electroforesis (Enduro 300v Labnet international inc.) por 45 min. a 100 V y 35 mA. Transcurrido este tiempo se pasó a un transluminador y se fotografió.

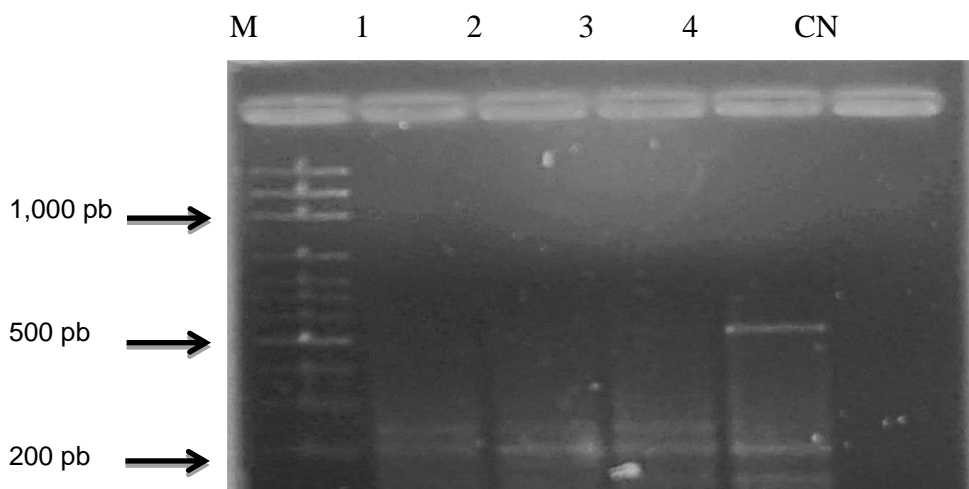


Figura 8b RT-PCR para el VHE Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de muestras de hígado en rastros de cerdos. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Condiciones de la electroforesis: 100V a 35 mA por 45 minutos, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular 100 pb., carril CN: control negativo, carriles 1-3: muestras de hígados.

4.2. Resultados del objetivo 2

4.2.1. Determinar la presencia del VHE mediante RT-PCR de punto final en cerdos sacrificados en el rastro TIF municipal de Monterrey, Nuevo León, México.

Se obtuvieron un total de 87 muestras de tejido hepático de cerdos de 5 y 6 meses de edad y que fueron sacrificados en el rastro municipal de la Ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. Las muestras procedían de 25 granjas porcinas del Estado, con un total 1,983 animales. Las 24 granjas porcinas pertenecen a 12 municipios del Estado de Nuevo León. La mayoría de las granjas están ubicadas en municipios aledaños al área metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León.

El análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos con los cebadores VHE-F1 VHE-R1 para el RT-PCR y los cebadores para el PCR VHE-F1 y VHE-R2 permitió constatar, que de las 87 muestras de tejido hepático, solo 17 (20.23%) de ellas fueron positivas a la amplificación de un fragmento de 212 pb del gen ORF2 de VHE (Figura 9 a y b). Estas muestras correspondieron a muestras que provenían de 11 granjas distintas de 9 municipios del Estado de Nuevo León en las que se encuentran (Allende, Cadereyta Jiménez, Ciénega de Flores, Doctor Gonzales, General Zuazua, Los Ramones, Montemorelos, Pesquería y Salinas Victoria).



Figura 9a. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de muestras de hígado en rastros de cerdos. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Condiciones de la electroforesis: 100V a 35 mA por 45 minutos, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular 100 pb., carril 1: control positivo, carril 2: control negativo, carriles 3-9: muestras de hígados.

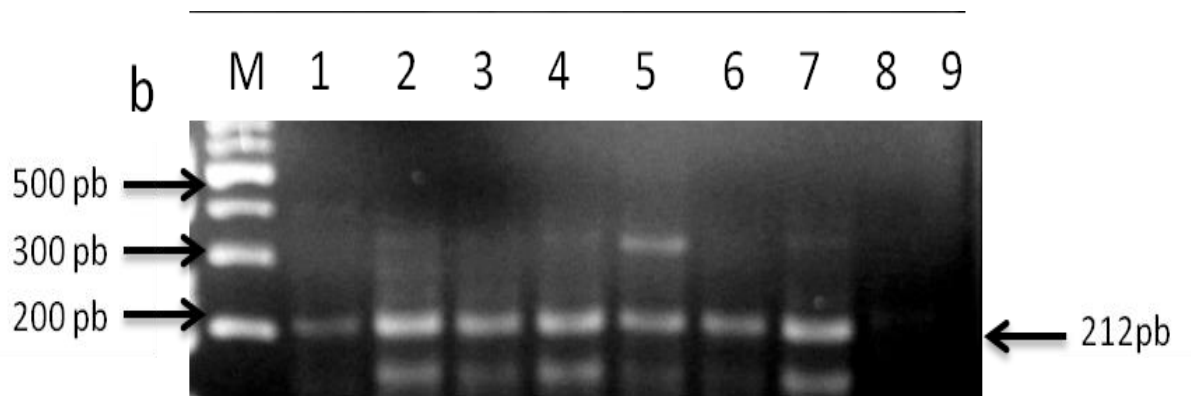


Figura 9b. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de muestras de hígado en rastros de cerdos. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Condiciones de la electroforesis: 100V a 35 mA por 45 minutos, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular 100 pb., carril 1: control positivo, carril 9: control negativo, carriles 2-8: muestras de hígados.

4.3. Resultados del Objetivo 3-

4.3.1. Determinar la presencia y circulación del VHE en granjas porcícolas del Estado de Nuevo León, México, por RT-PCR

Se obtuvieron un total de 233 muestras de heces de 26 granjas de cerdos de 13 municipios del Estado (Allende, Cadereyta Jiménez, Ciénega de Flores, Garza García, General Terán, Hidalgo, Juárez, Linares, Mina, Montemorelos, Los Ramones, Salinas Victoria, Vallecillo). Los cerdos de donde procedieron las muestras de los diferentes municipios se encontraban en diferentes etapas de su desarrollo, de los cuales 42 animales se encontraba en la etapa de Destete con un peso de (6-30 kg); así también 46 de ellos estaban en la etapa de Iniciación con un peso de entre (30-50 kg); así mismo 55 animales se encontraban en la etapa de Crecimiento con un peso entre los (50-70 kg); y 50 animales se encontraban en la etapa de Engorde con un peso de (70-100 kg), y hasta los 5.5 meses de edad antes de que se mandaban al sacrificio, también se muestrearon 40 hembras reproductoras.

De las 233 muestras de las heces de cerdos solamente 41 (17.53%) de ellas se observó un producto de amplificación de 212 pb mediante la técnica de RT-PCR que corresponden a las encontradas para el VHE (ver Figura 10 a y b). Las 41 muestras positivas procedían de 13 granjas de cerdos del Estado de Nuevo León; de las 13 granjas de cerdos que se muestrearon se encuentra situadas en 8 municipios del Estado (Allende, Cadereyta Jiménez, Ciénega de Flores, Dr. Gonzales, General Zuazua, Montemorelos, Pesquería y Salinas Victoria).

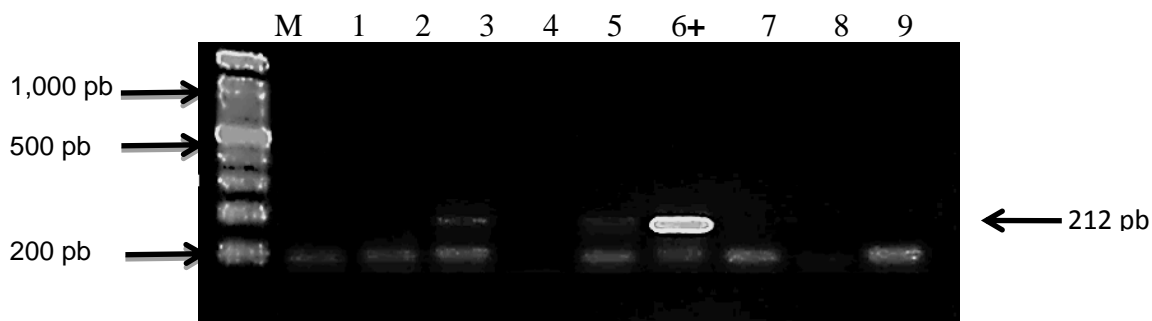


Figura 10 a. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE en heces de granjas porcinas. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % condiciones electroforesis 100V a 35 mA. por 45 minutos teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular 100 pb, carriles 6 controles positivos, carril 3 y 5 positivos, carriles 1, 2, 7, 8, 9 muestras de heces. B) M: Marcador de peso molecular 10 pb, carril 1: control negativo, carril 2: control positivo, carriles 3-9 muestras de hígados.

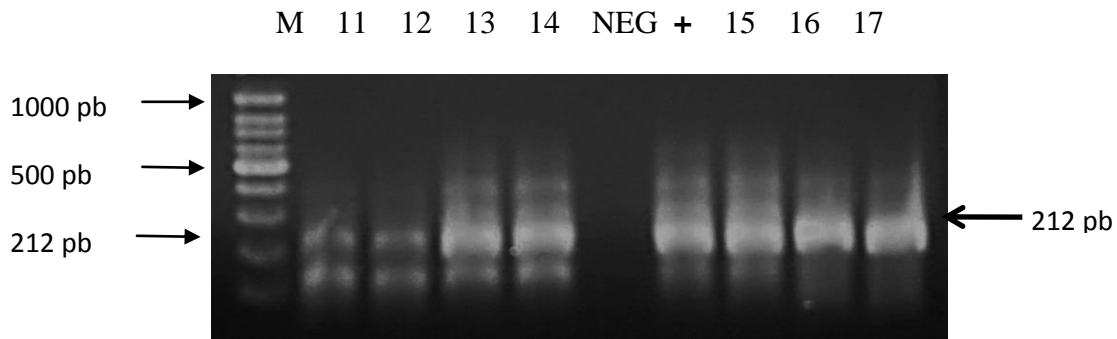


Figura 10 b. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE en heces de granjas porcinas. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % condiciones electroforesis 100V a 35 mA. por 45 minutos teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular 100 pb, carriles 6 controles positivos, carril 3 y 5 positivos, carriles 1, 2, 7, 8, 9 muestras de heces. B) M: Marcador de peso molecular 10 pb, carril 1: control negativo, carril 2: control positivo, carriles 3-9 muestras de hígados.

Cabe mencionar que de las 41 muestras de las que se obtuvieron el producto de amplificación al VHE, 5 muestras eran de la etapa de iniciación, 12 muestras eran de la etapa de crecimiento, 20 de ellos eran de la etapa de engorda y 4 muestras correspondía a hembras reproductoras, todos ellos procedían de 9 granjas en los 8 municipios ya mencionados.

4.4. Resultados del objetivo 4

4.4.1. Demostrar la presencia de secuencias genéticas del VHE en hígado fresco de cerdo, comercializado para consumo humano en carnicerías del área metropolitana de Monterrey y del estado de N.L.

De los 50 hígados de cerdo obtenidos en carnicerías y centros de venta de carne de cerdo de los diferentes municipios del Estado de Nuevo León estas muestras pertenecían solamente a 10 municipios diferentes del estado, únicamente en 9 (4.5 %) muestras de las 50 se obtuvo un resultado positivo a la amplificación al VHE (ver Figura 11 a y b). Las 9 muestras positivas provenían de 5 municipios del estado de los cuales están Allende, Cadereyta Jiménez, Ciénega de Flores, Montemorelos y Salinas Victoria.

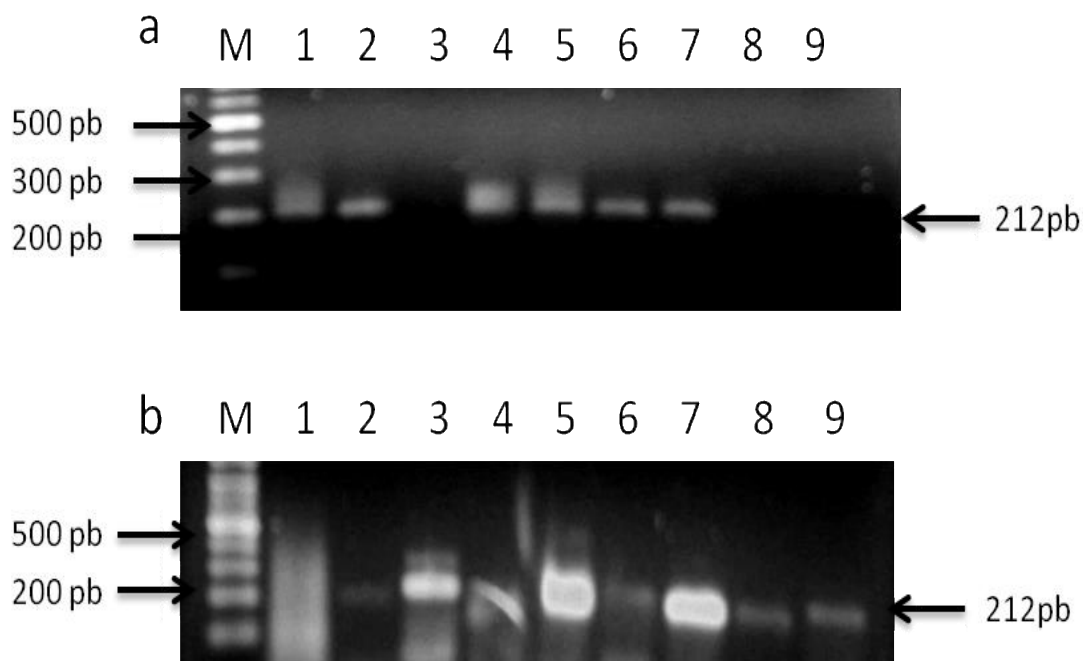


Figura 11a y b. Amplificación de un fragmento del gen ORF de VHE de hígados de carnicerías. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. M: Marcador de peso molecular 100 pb, carriles 1 y 2: controles positivos, carril 3: control negativo, carriles 4-9 muestras de heces. B) M: Marcador de peso molecular 10 pb, carril 1: control negativo, carril 2: control positivo, carriles 3-9 muestras de heces.

4.5. Resultados del objetivo 5

4.5.1. Obtener la secuencia de nucleótidos de una parte del genoma del VHE y caracterizar el genotipo de las cepas que circulan en el Estado de Nuevo León, México.

4.5.1.1. Obtención y análisis de las secuencias.

Se obtuvo la secuencia de 172-174 nucleótidos a partir de 5 muestras positivas al RT-PCR y PCR-semianidado. Las muestras fueron obtenidas ya sea de excremento porcino en granjas porcícolas ó de hígado de cerdo conseguido de carnicerías o del rastro del área metropolitana de Monterrey, N.L. En la Figura 12 se muestra la posición relativa de los municipios de Nuevo León México, a partir de los cuales se obtuvieron las muestras.

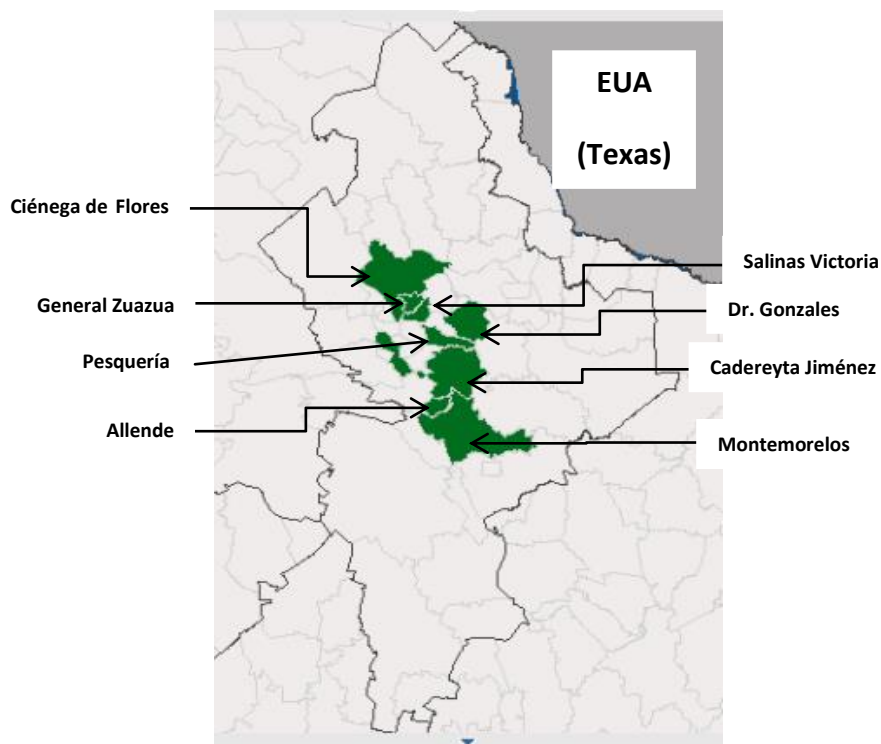


Figura 12. Mapa del Estado de Nuevo León donde se establece la posición relativa de los Municipios a partir de los cuales se obtuvieron muestras de hígado y heces de cerdos para obtener la secuencia de una parte del genoma del VHE

Un total de 9 muestras, que fueron seleccionadas por su nitidez y por el tamaño de banda en gel, fueron enviadas a secuenciar. No obstante, debido a múltiples inconsistencias en las lecturas del secuenciador, entre otras causas, de 4 muestras no fue posible obtener la calidad suficiente para los análisis posteriores. De esta manera 5 de las secuencias si correspondieron en homología con miembros de *Hepeviridae*, según análisis del BLAST[®], con secuencias depositadas en el GenBank[®]. Las secuencias fueron denominadas sw4NL-Mx-1, sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1; conforme fueron realizándose los análisis de secuenciación. Las secuencias de nucleótidos obtenidas en el presente trabajo junto con las secuencias respectivas de distintos genotipos selectos de la familia *Hepeviridae* se muestran en el Anexo 6. Para realizar los estudios de comparación, en todos los casos se excluyeron las secuencias de nucleótidos que corresponden a las secuencias de los oligonucleótidos usados en la amplificación de esa parte del genoma del HEV. Acorde a la comparación de las secuencias usando el programa Clustal W (Thompson y col., 1994) del paquete de Bioinformática de DNASTAR[®] y tomando en cuenta a la secuencia D11092 (Aye y col., 1992) del Orthohepevirus A Genotipo 1 como referencia, se observaron numerosas sustituciones, inserciones y deleciones a lo largo del fragmento genético analizado (ver Anexo 4). Acorde a estos análisis, las secuencias del presente trabajo contrastaron entre sí en dos grupos: uno constituido por las secuencias sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 y otro por sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1. El primer grupo se ubicó junto secuencias reportadas dentro de la especie Orthohepevirus A del genotipo 3 de *Hepeviridae* y el segundo con una secuencia porcina con clave de acceso FJ617438 (Simard y col., 2009) en el GenBank[®]. Esta secuencia fue detectada en Canadá y aparentemente no se ha ubicado con especie ó genotipo alguno. Las discrepancias observadas fueron reflejadas en los análisis de porcentaje de identidad u homología y de divergencia genética, los cuales se describen en la Figura 13. Acorde a estos datos, el rango de homología entre las cepas del presente estudio fue de 29.5 a 99.8%. No obstante, las secuencias del grupo de sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 mostraron un rango de homología de 91.9 a 94.2% mientras que la homología de sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1 fue de 98.8%. Todas las secuencias del presente trabajo mostraron la mayor homología con secuencias de cepas aisladas de cerdos y de humano.

Porcentaje de identidad																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
1	■	92.4	76.3	75.6	74.4	76.7	77.3	78.5	74.4	76.7	75.0	75.0	73.8	75.6	77.3	73.8	73.8	73.3	74.4	73.3	52.7	72.7	71.5	33.5	31.5	32.1	34.0	31.7	31.4	1	D11092	
2	8.2	■	77.5	75.6	74.4	75.6	76.2	77.3	75.6	74.4	75.0	76.2	72.7	73.8	75.6	77.3	75.0	75.6	75.0	77.3	73.8	52.1	73.8	76.7	32.3	32.1	31.4	33.3	32.9	31.4	2	M73218
3	28.8	26.9	■	73.4	71.0	72.8	73.4	74.6	71.0	71.6	71.0	69.8	70.4	69.2	71.6	69.2	69.2	71.0	72.2	72.8	74.0	51.8	71.6	69.8	34.8	29.2	30.3	31.7	31.7	31.3	3	M74506
4	30.1	30.1	32.9	■	95.3	94.8	94.2	92.4	93.0	93.0	91.9	91.9	91.9	91.3	90.1	86.6	84.9	76.7	76.2	75.0	77.9	52.7	77.9	74.4	32.3	30.2	30.1	30.2	32.3	32.0	4	sw7NLMx-1
5	31.8	31.8	36.7	4.8	■	97.1	95.3	93.6	96.5	95.3	94.2	94.2	94.8	92.4	86.6	87.2	76.7	74.4	72.7	76.2	51.5	79.1	75.6	32.9	29.6	29.5	29.6	32.9	32.5	5	AB094209	
6	28.1	29.9	33.8	5.5	3.0	■	95.3	93.6	93.6	93.6	93.6	93.6	94.2	91.9	86.0	87.8	75.6	75.0	73.8	77.9	52.1	79.1	75.0	31.7	30.9	30.8	30.9	31.1	32.5	6	AB094206	
7	27.2	29.0	32.9	6.1	4.8	4.8	■	93.3	93.0	96.5	93.6	94.2	93.0	93.0	91.9	86.0	87.2	76.7	75.0	73.3	77.3	52.1	76.7	75.6	31.1	28.4	29.5	29.6	32.3	34.9	7	sw9NLMx-1
8	25.5	27.2	31.1	8.1	6.8	6.8	1.6	■	92.4	95.9	91.9	93.6	91.3	92.4	92.4	85.5	86.6	76.7	76.2	74.4	76.7	51.5	77.9	74.4	31.7	28.4	29.5	30.9	31.1	35.5	8	AB67095
9	31.9	30.0	36.7	7.5	3.6	6.8	7.5	8.1	■	94.2	93.0	93.0	91.9	92.4	91.3	86.6	86.0	77.3	75.0	73.3	75.6	50.9	79.1	76.2	34.1	27.8	27.6	29.0	32.3	30.8	9	DQ832266
10	28.1	31.9	35.7	7.5	4.9	6.8	3.6	4.2	6.2	■	93.6	96.5	94.2	93.6	91.3	86.0	86.6	76.7	74.4	73.8	75.6	50.3	79.1	73.3	32.3	27.8	28.8	30.2	32.9	34.3	10	AB089824
11	30.8	30.8	36.7	8.8	6.1	6.8	6.8	8.8	7.5	6.8	■	93.6	93.0	92.4	89.0	84.9	87.2	79.7	74.4	73.8	76.2	53.3	80.2	76.7	32.3	30.9	30.8	30.9	33.5	32.0	11	sw5NLMx-1
12	30.9	29.0	38.7	8.8	6.1	6.8	6.1	6.8	7.5	3.6	6.8	■	94.2	92.4	92.4	87.2	87.8	80.2	75.0	75.6	76.2	51.5	82.0	75.0	32.3	28.4	28.2	29.6	33.5	32.0	12	AF466683
13	30.8	34.7	37.8	8.8	6.1	6.8	7.4	9.5	8.8	6.1	7.4	6.1	■	92.4	91.3	86.0	89.5	77.9	71.5	72.1	76.2	51.5	79.7	72.1	32.3	29.0	28.8	29.0	31.7	32.5	13	AF082843
14	32.7	32.7	39.7	9.5	5.5	6.2	7.4	8.1	8.1	6.1	8.1	8.1	8.1	■	91.9	82.6	89.0	76.7	75.0	72.7	75.6	50.3	78.5	75.0	34.1	29.0	28.8	30.2	31.1	32.5	14	AF466659
15	30.0	30.0	35.7	10.9	8.1	8.8	8.8	8.1	9.6	9.6	12.4	8.2	9.5	8.8	■	87.2	89.0	79.7	76.2	75.6	77.3	52.7	79.1	73.8	31.7	29.6	29.5	30.9	31.1	33.1	15	AF060669
16	27.1	27.1	39.8	15.1	15.1	15.9	15.9	16.7	15.2	16.0	17.7	14.4	15.9	20.8	14.4	■	84.9	82.0	72.1	75.6	76.2	52.1	79.1	74.4	31.7	29.6	29.5	30.9	30.5	31.4	16	EF491206
17	32.6	30.7	39.9	17.7	14.5	13.7	14.5	15.3	16.1	15.4	14.7	13.8	11.5	12.3	12.3	17.6	■	78.5	74.4	74.4	72.7	52.7	76.7	76.7	28.7	30.9	30.8	30.9	31.7	32.5	17	AB301710
18	33.1	30.2	37.0	28.5	28.5	30.4	28.5	28.5	27.7	28.6	24.2	23.3	26.7	28.5	24.1	20.7	25.9	■	73.3	75.0	78.5	50.9	77.9	74.4	31.1	30.9	30.8	32.1	32.9	30.2	18	FJ906895
19	33.7	30.8	34.8	28.8	31.4	30.5	30.5	28.7	30.6	31.5	31.4	30.6	36.3	30.5	28.8	35.4	31.4	33.4	■	84.3	75.0	50.9	74.4	73.3	28.7	29.0	30.1	31.5	34.7	33.1	19	AJ272108
20	31.7	27.1	33.9	30.6	34.2	32.3	33.4	31.5	33.3	32.4	32.3	29.6	35.2	34.2	29.6	29.6	31.4	30.7	18.5	■	75.6	52.7	76.7	73.8	30.5	30.9	30.1	32.1	31.7	35.5	20	AB097811
21	32.8	31.8	31.7	25.7	28.3	25.6	26.5	27.4	29.3	29.3	28.4	28.3	28.4	29.2	26.6	28.3	34.4	24.8	30.3	29.5	■	51.5	80.2	76.2	36.6	29.0	28.8	29.0	28.7	29.6	21	AB573435
22	75.0	76.7	77.5	75.0	78.2	76.5	76.7	78.5	80.2	82.1	73.3	78.4	78.2	81.9	74.9	77.4	74.9	79.8	79.8	74.9	77.2	■	49.7	52.7	31.1	31.7	31.0	32.3	25.9	33.3	22	AY043166
23	34.2	32.3	36.1	26.3	24.6	24.6	28.1	26.3	24.7	24.7	23.0	20.6	23.8	25.5	24.7	24.8	28.1	26.5	32.0	28.1	22.4	84.3	■	77.9	35.4	29.6	29.5	30.9	27.5	32.5	23	AB602441
24	37.5	28.4	39.8	31.6	29.7	30.7	29.7	31.6	28.9	33.6	28.0	30.7	35.5	30.7	32.6	31.7	27.9	31.5	33.2	32.3	28.2	75.5	26.4	■	34.1	35.2	35.3	34.0	28.7	33.7	24	KJ496143
25	163.6	177.0	162.6	174.8	169.3	181.1	188.3	181.1	158.6	174.5	174.8	174.5	174.8	159.7	161.2	161.1	243.9	192.5	350.0	220.6	143.2	190.8	149.4	162.1	■	33.7	33.3	34.3	33.3	36.6	25	AY535004
26	207.0	192.6	300.6	261.9	350.0	227.2	350.0	350.0	350.0	350.0	210.5	350.0	350.0	298.3	265.5	217.8	227.2	350.0	210.5	250.1	182.0	265.5	154.8	169.1	■	98.8	97.1	34.6	43.3	26	sw8NLMx-1	
27	191.5	205.8	228.5	293.7	350.0	238.8	297.3	297.3	350.0	350.0	216.8	350.0	350.0	350.0	350.0	297.3	226.1	238.8	230.0	230.0	267.5	189.9	297.3	155.2	169.0	12	■	38.8	35.2	44.1	27	sw4NLMx-1
28	166.7	175.0	194.7	294.9	350.0	240.0	298.3	217.8	350.0	261.9	217.8	350.0	350.0	294.9	227.2	217.8	227.2	197.6	201.0	188.4	268.1	175.5	217.8	166.7	160.3	2.9	1.2	■	34.6	44.5	28	swFJ617438
29	350.0	251.9	213.9	221.7	189.6	258.9	204.0	258.9	211.8	195.0	178.4	182.4	224.3	258.9	292.3	243.1	237.3	209.3	166.6	237.3	350.0	350.0	350.0	350.0	182.1	166.4	157.9	169.5	■	55.2	29	GU345004
30	216.9	216.9	194.1	214.0	187.5	187.5	159.1	152.8	261.2	163.9	200.0	206.3	187.5	187.5	180.7	209.3	183.8	350.0	184.6	154.5	219.8	169.0	197.2	174.6	147.4	107.9	104.1	102.7	68.4	■	30	JQ001749

Divergencia

Figura 13. Porcentajes de identidad y divergencia de las secuencias sw4NL-Mx-1, sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 con secuencias de cepas representativas de distintas especies y genotipos de Hepeviridae obtenidas del GenBank®.

Interesantemente, las secuencias sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 mostraron la mayor homología con secuencias representadas dentro del genotipo 3 de Orthohepevirus A de origen humano y porcino, mientras que sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1 su homología máxima fue con una secuencia de una cepa porcina aislada en Canadá, que aparentemente representa un nuevo genotipo. La secuencia sw5NL-Mx-1 mostró la mayor homología del 93.6% con la

secuencia AF466683 del genotipo 3, cepa 01-15555A de origen porcino, reportada en el 2002 en los Estados Unidos de América (Huang y col., 2002). La mayor homología de la secuencia sw7NL-Mx-1 fue con la secuencia AB094209 del genotipo 3, cepa swJ2-3 de origen porcino detectada en Japón en el año 2003 (Takashi y col., 2003). Notablemente, la secuencia sw9NL-Mx-1 exhibió una homología de 98.3% con la secuencia AB670951, cepa HRC-HE13 de origen humano y aislada de un paciente donador de sangre en el año 2012 (Matsubayashi y Sakata, 2012). Para las secuencias sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1 ambas presentaron homología máxima de 98.8% con la secuencia FJ617438, cepa swSTHY23 aislada aparentemente de un cerdo en el año 2009 en Canadá (Simard y col., 2009).

4.5.1.2. Análisis filogenéticos.

Las relaciones evolutivas de las secuencias sw4NL-Mx-1, sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 con secuencias de referencia, y representativas de especies y genotipos, de la familia *Hepeviridae* fueron calculadas mediante análisis filogenéticos usando el método de Neighbor-joining y aplicando 1000 repeticiones en los análisis de Bootstrap. En la tabla 9 se muestran los datos de las distintas cepas representativas de *Hepeviridae* junto con las secuencias obtenidas en el presente trabajo. Las diferencias genéticas observadas en los análisis de homología y divergencia (Figura 13) fueron reflejadas en el árbol filogenético obtenido (Figura 14). Tomando en cuenta la reciente propuesta de clasificación para la familia *Hepeviridae* (Smith y col., 2014) las secuencias obtenidas en el presente trabajo fueron comparadas. Las secuencias sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 fueron agrupadas dentro del genotipo 3 de la especie *Ortohepeviridae*, no obstante las 3 secuencias fueron segregadas en distintos subgrupos del genotipo 3 (Figura 14). Si bien, la secuencia sw5NL-Mx-1 mostró su mayor homología de 93.6% con una secuencia de origen porcino (AF466683, cepa 01-15555A) detectada en los EUA (Huang y col., 2002), esta secuencia fue segregada en un grupo filogenético distinto dentro del genotipo 3. Por lo que, aparentemente esta secuencia o cepa está separada filogenéticamente de la cepa porcina 01-15555A. En el caso de la secuencia sw7NL-Mx-1 mostró su mayor homología de 95.3 % con la secuencia AB094209 (cepa swJ2-3) detectada en porcinos de Japón en el año 2003 (Takahashi y col., 2002). No

obstante, la secuencia sw7NL-Mx-1 se ubicó en la topología del árbol filogenético con mayor parentesco con la cepa porcina swJ-1-4, # acceso AB094206, reportada por (Takahashi y col., 2003). Las secuencias sw7NL-Mx-1 y swJ-1-4 (GenBank AB094206) mostraron una homología de 94.8% (Figura 14). Interesantemente, las secuencias sw9NL-Mx-1 y AB670951 (cepa HRC-HE13, origen humano) (Matsubayashi y Sakata, 2012), que mostraron una homología de 98.3% entre sí fueron ubicadas evolutivamente dentro del mismo grupo (Figura 13).

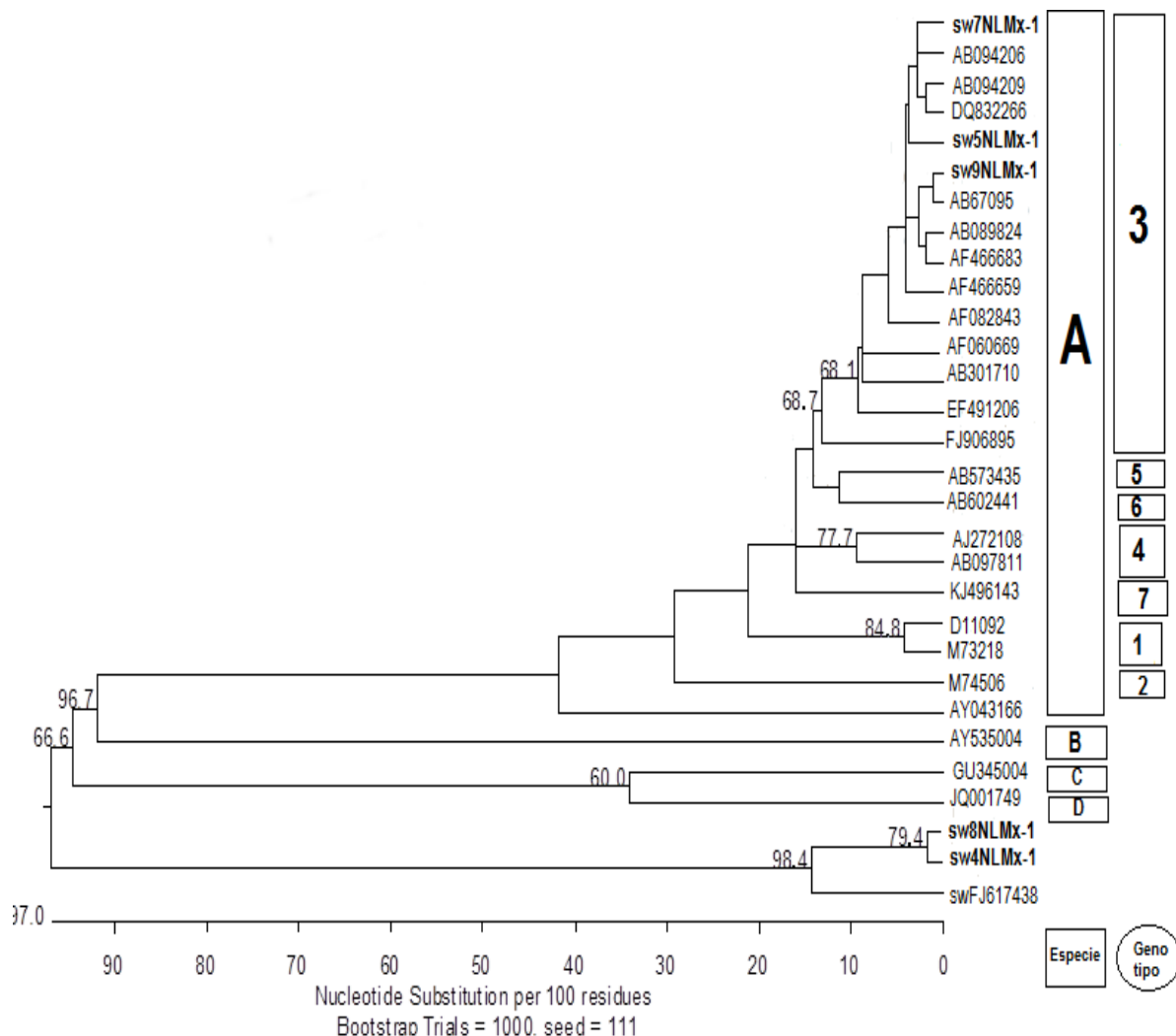


Figura 14. Árbol filogenético de Unión de Vecinos más cercanos (Neighbor-joining) de un fragmento de 172 nucleótidos del gen ORF-2 de diferentes miembros representativos de *Hepeviridae* con las secuencias de sw4NL-Mx-1, sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 obtenidas en el presente trabajo. La construcción del árbol fue realizada usando MegAlign (DNASTAR® Lasergene 8, Madison WI, USA) con el algoritmo de alineamiento múltiple de secuencias de CLUSTALW (Thompson y col., 1994) y usando 1,000 réplicas para el análisis de Bootstrap. Los valores de Bootstrap se dan en porcentaje y solo se muestran los valores $\geq 60\%$ en los nodos. Los diferentes genotipos de *Hepeviridae* están basados acorde Smith y col., 2014.

Ambas secuencias mostraron homologías de 94.3-95.5% con las secuencias AF466683 (cepa 01-15555A, origen porcino) (Huang y col., 2002) y AB089824 (cepa HE-JA10, origen humano) (Tokita y col., 2003), respectivamente. Basado en lo anterior, ambas secuencias aparentemente conforman un grupo que se relaciona evolutivamente con cepas detectadas en humanos y cerdos en Japón y los Estados Unidos de América, desde el año 1993 hasta la fecha (Mizuo y col., 2002; Huang y col., 2002; Tokita y col., 2003). En fuerte contraste a lo anterior, las secuencias sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1 se ubicaron en un grupo filogenético muy distinto y alejado a lo observado con las secuencias sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1. Las secuencias sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1 mostraron una homología entre ambas de 98.8% y fueron segregadas en un grupo filogenético, aparentemente único, que no está emparentado con miembros de las especies Orthohepevirus A, B, C ó D dentro de la familia *Hepeviridae* (Smith y col., 2014).

Las secuencias sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1 mostraron homología de 98.9% y 97.1% con la secuencia FJ617438 porcina (cepa swSTHY23) detectada en Canadá (Simard y col., 2009), respectivamente. No obstante, y acorde a la topología del árbol filogenético obtenido, estas secuencias aparentemente conforman dos grupos de virus evolutivamente relacionados pero segregados en dos subgrupos que probablemente esté conformado por genotipos distintos (Figura 14). La separación filogenética de estos subgrupos y secuencias mostró alto soporte estadístico de 98.4% entre sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1 con swSTHY23 (FJ617438) y de 79.4% entre sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1 del presente trabajo.

CAPITULO CINCO

DISCUSION

5. Discusión

El Virus de la Hepatitis E (VHE) es considerado un patógeno emergente de creciente importancia en los sistemas de salud pública y pecuario a nivel mundial (Morales y col. 2013, Aggarwal 2011, Bihl 2010). Los hallazgos, cada vez más frecuentes de este virus, ya sea en la cadena alimenticia humana, particularmente en subproductos derivados de cerdos y/ o como contaminante del agua, así como en diversas poblaciones de animales indican su naturaleza ubicua y constituyen una gran preocupación para las autoridades de salud pública y animal (Chaussade y col 2013., Wichmann y col. 2008., Tei y col 2003). El contacto directo con animales infectados y la ingesta de carne o subproductos porcinos u otros animales contaminados o portadores representan potenciales vías de transmisión zoonótica, lo cual ha sido ampliamente documentado (Rodríguez y col. 2012., Pavio y col. 2010). En México en 1992 se identificó, mediante métodos moleculares, la presencia del virus de la Hepatitis E como causa de afección al humano (Huang y col., 1992) a partir de muestras obtenidas de brotes iniciados en 1986 en dos comunidades rurales (Velázquez y col 1990), sin embargo, hasta la actualidad son muy limitados los estudios que se han realizado para conocer su epidemiología y efectos en la población humana y animal. Basado en la detección molecular del VHE, a partir de la amplificación de una región genética muy conservada dentro de la ORF2 del virus (Martin y col., 2007), en el presente estudio se reveló que el Virus de la Hepatitis E está ampliamente disperso en la población de cerdos ubicados en granjas porcícolas, así como en varias fuentes potenciales de contaminación, en el estado de Nuevo León, México. Si bien a nivel mundial el VHE se ha encontrado en una gama amplia de animales que incluyen roedores (Johns y col., 2010), aves (Hsu y Tsai 2014, Pavio y col., 2010, Bilic y col., 2009.), perros y gatos (Meng 2010, Andrew y col., 2009), hurones (Raj y col., 2012), ovejas (Gutiérrez y col., 2014), bovinos (Meng 2009), Equinos (Saad y col., 2007), conejos (Zhao y col., 2009), truchas (Batts y col., 2011), murciélagos (Drexler y col., 2012) y primates no humanos (Huang y col., 2004) se considera que a nivel mundial el cerdo es el reservorio principal de este virus (Zwettler y col. 2012, Pavio y col., 2010, Van y col.,

2001) y una fuente importante en la naturaleza y medio ambiente que impacta en la epidemiología de la enfermedad en zonas consideradas como endémicas (Mirazo y col., 2014). Por otro lado, en distintos países se ha reportado el aislamiento y circulación de cepas del VHE a partir de humanos y/o cerdos que comparten una alta homología genética (Galiana y col., 2010, Dalton y col., 2008) y en algunos casos asociados a daños clínico patológico (Echevarría y col., 2015). Previo a este trabajo, en porcinos de México solo se había reportado la presencia del VHE en granjas porcícolas de los estados de Sonora y Sinaloa ubicados en el noroeste del país (Copper y col., 2005). En el presente trabajo, se encontró evidencia del VHE no solamente en granjas porcícolas del Noreste de México, en el estado de Nuevo León, sino también en distintas fuentes potenciales de contaminación ya sea en el rastro o en carnicerías ambas ubicadas principalmente en áreas aledañas a la zona metropolitana de Monterrey, N. L. Acorde a los datos obtenidos, prácticamente todas las granjas porcinas cercanas al área metropolitana analizadas mostraron secuencias genéticas del VHE en las excretas de cerdo y sugiere un alto nivel de contaminación así como un potencial riesgo de adquisición del VHE en la población humana y animal. Los resultados observados concuerdan con los obtenidos por distintos autores, en diversas partes del mundo, en los cuales las condiciones de manejo son muy similares a los que están sujetos los porcinos en granjas de Nuevo León, México (Berto y col. 2012, Di Martino y col. 2010, de Deus y col., 2007). No obstante, estos datos contrastan con lo observado por otros investigadores en los cuales la frecuencia que se reporta es relativamente baja (Pavio y col., 2010). Al respecto, probablemente factores locales particulares de manejo (Morales col., 2013), el método de diagnóstico (Pischke y Wedemeyer 2013, Baylis y col., 2011) o el sistema de bioseguridad animal (Echevarria y col., 2015) aplicado a esas poblaciones, entre otros, influyeron en los resultados observados. En este sentido y basado en la alta dispersión obtenida del VHE sería altamente recomendable establecer o revisar los protocolos de bioseguridad aplicadas a granjas porcinas del estado para aminorar o evitar que el virus se mantenga en el medio ambiente y eventualmente evitar su ingreso a la población humana. En esta misma dirección, estudios realizados en varios países han revelado amplia evidencia de la presencia del VHE en porcinos procesados en plantas de sacrificio (Echevarría y col., 2015, Gutiérrez y col., 2014) y los riesgos inherentes que

conlleva al humano en la manipulación de tejido o excretas contaminadas (Meng 2010a). El presente estudio amplia estas observaciones y concuerda con los parámetros registrados en otras partes del Mundo (Legrand y col., 2009, Bendall y col., 2008, Herremans y col., 2007). Conforme a lo detectado en las distintas fuentes potenciales de contaminación, nos indica que una proporción relativamente alta de cerdos mayor al 20% que son sacrificados en el rastro de Monterrey N.L. México son portadores, ya sea en hígado o excremento, de secuencias genéticas del VHE al momento del sacrificio. Estos parámetros son suficientes para categorizar a esta región como una zona de alta endemicidad, acorde a lo establecido por Forero y col. (2014) y Gutiérrez y col. (2014) y pone de manifiesto que es necesario y urgente iniciar estudios subsecuentes que nos permitan revelar cuál es el papel que este patógeno viral tiene en la población humana y animal, particularmente analizando a los cerdos como fuente potencial de contaminación. A lo anterior, es menester agregar que todos los cerdos analizados no manifestaron síntomas o sospecha de enfermedad atribuible a VHE al momento del sacrificio. Al respecto, se ha reportado que la mayoría de las infecciones por VHE en el cerdo cursan de forma sub-clínica y que el virus es capaz de replicarse en hígado, tracto gastrointestinal así como otros tejidos extra-hepáticos (Pavio y col. 2010). Por lo que tal vez, los parámetros obtenidos en el presente trabajo están subestimados y de nuevo se enfatiza la urgente necesidad de llevar a cabo muestreos de rutina o protocolos de detección en los animales que ingresan al rastro para determinar la presencia del virus en tejidos infectados ó contaminados y así evitar o aminorar el ingreso a la cadena de consumo humana. Los índices de positividad para las muestras de hígado (22.9%) y de excremento (8.0%) obtenidos en los cerdos sacrificados en rastro son comparables a lo reportado por Martin y col. (2007) en España y por Di Martino y col. (2010) en Italia en hígado y heces, respectivamente. No obstante, los parámetros del presente trabajo son más altos que los obtenidos por Di Bartolo y col. (2012) en el hígado de cerdos en Italia 6% (2/33), España 3% (1/39) y 5% (2/40) y en República Checa; así como de los reportados por Feagins y col.(2007), con un 11% de resultados positivos en hígados de cerdo vendidos en tiendas en los Estados Unidos, y del 2% reportado por Yazaki y col en el 2003 en Japón. En Europa, Di Bartolo y col. en el 2012 detectaron al VHE en heces porcinas en Italia y España con 41% y 39% de resultados,

respectivamente; por otro lado en Sudamérica Forero y col.(2014) reportaron el 26.9% de resultados positivos en excretas de cerdo en Colombia.

A nivel de granja se ha reportado que la proporción de positivos al VHE en excretas fecales varía grandemente. Trabajos publicados por diversos autores en granjas de Europa señalan que el VHE está presente en la República Checa, España, Reino Unido, Portugal Italia y Holanda, con frecuencias de detección en heces del 3.5%, 4.3%, 10%, 30%, 23% y 73%; respectivamente. No obstante, la dinámica de la infección y la proporción de animales infectados por granja varía acorde con la edad y probablemente otros factores (Backer y col, 2012, Casas y col, 2011, de Deus y col, 2008). Según Berto y col. (2012) y de Deus y col. (2008), mayor índice de frecuencia de infección se observa entre las 12 y 16 semanas. Estos autores determinaron que en este período es cuando se presenta el pico de infección y el momento en el cuál en VHE puede ser detectado con relativa facilidad, pero además también es factible de encontrar en sangre, en bilis, nódulo linfático mesentérico, hígado y heces en más del 50% de los animales infectados (de Deus y col, 2008). No obstante, los cerdos del presente estudio positivos al VHE en su mayoría procedían de la etapa de engorde, con una edad promedio de 22 semanas de edad (entre 6 y 10 semanas después de la edad con pico de infección) por lo que las cifras de positividad obtenidas probablemente están subestimadas. Para ello será necesario ampliar estas observaciones y establecer estudios para conocer la dinámica de infección por el VHE acorde a las características de manejo y bioseguridad de las granjas del estado de Nuevo León, México. A nivel geográfico, y al analizar las cifras de positividad acorde al municipio, no se encontraron diferencias significantes en la proporción de positivos al VHE en los municipios estudiados del estado. Acorde a esto, no obstante se observó que en los municipios en donde se encontraron muestras positivas, solo en 5 de los 20 muestreados (Allende, Cadereyta Jiménez, Ciénega de Flores, Montemorelos, Salinas Victoria) se obtuvieron índices de positividad tanto en las muestras de los animales sacrificados en el rastro, como en las muestras de heces recolectadas en las granjas de cerdos y los hígados comprados en puntos de venta. Cabe resaltar que estos municipios son colindantes entre ellos geográficamente, lo cual sugiere fuertemente que existe una fuerte interacción entre

los mismos que favorece la circulación del virus. Probablemente, en estos sitios fallas en el sistema de Bioseguridad o la ausencia de este u otros factores como el ingreso-intercambio de personas de granja a granja, entre otros, están concurriendo para observar los parámetros de positividad observados.

El virus de la Hepatitis E es un virus RNA que muestra una gran variación genética entre los aislados a nivel mundial y en donde habitualmente se ha documentado que el genoma de las cepas aisladas de lugares geográficamente distintos resultan en una mayor diversidad genética (Schlauder y Mushahwar, 2001, Worm y col, 2002). En el presente trabajo fue posible obtener la secuencia de 172-174 nucleótidos a partir de 5 muestras positivas al PCR semi-anidado (ver anexo 4). Como es señalado previamente, a lo largo de este fragmento que corresponde a ~57-58 aminoácidos de la región central del gen de la cápside en la región ORF-2 (Arends y col, 2014) y comparándola con la cepa Xinjiang (D11092) (Aye y col, 1992) como cepa de referencia, se detectaron repetidas substituciones, inserciones y/o deleciones a lo largo del fragmento genético analizado. Observaciones similares a lo anterior, han sido reportadas por Oliveira-Filho y col (2013) quienes usando 148 nucleótidos encontraron inconsistencias en las relaciones filogenéticas de ciertos aislados del HEV. Para los virus miembros de Hepeviridae no se ha determinado la cantidad mínima de nucleótidos necesarios que funcionen como un marcador molecular para asignar a determinada secuencia o aislado dentro de esta familia. Acorde a lo obtenido en el presente trabajo, aparentemente la región de ORF-2 de 172-174 nucleótidos empleada muestra la suficiente variabilidad genética sin perder la fuerza de la señal filogenética (Xia y col., 2003, Olvera y col., 2010) y se propone que puede ser empleada como marcador molecular para asignar a determinada secuencia dentro de Hepeviridae y sus distintos subgrupos genéticos. En el presente trabajo las secuencias de las muestras a las que se denominó como sw4NL-Mx-1, sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 fueron sometidos a análisis de homología/divergencia y de filogenia. En estos análisis, las secuencias sw5NL-Mx-1, sw7NL-Mx-1 y sw9NL-Mx-1 se agruparon dentro del genotipo 3 de la especie Ortohepeviridae, empero las 3 secuencias fueron a su vez segregadas en distintos subgrupos dentro del genotipo 3 acorde a la clasificación recientemente propuesta por Smith y

col., 2014. Interesantemente, las secuencias de las muestras sw4NL-Mx-1 y sw8NL-Mx-1 fueron ubicadas substancialmente muy distantes de este grupo y situadas junto con la cepa swSTHY23 (GenBank® FJ617438) aislada de un cerdo en Canadá (Simard y col, 2009). Tomando en cuenta lo anterior, aparentemente en cerdos de esta parte del país circulan dos tipos de variantes genéticas del HEV: una que corresponde a cepas clásicamente reportadas dentro del genotipo 3 de Hepeviridae y con potencial zoonotico (Meng 2013, Smith y col., 2014, Zwettler y col 2012, Pavio y col, 2010) y otra representada por las secuencias sw4NL-Mx-1, sw8NL-Mx-1 y swSTHY23 (Simard y col, 2009) de las cuales aparentemente no corresponden a especie o genotipo alguno descrito dentro de la Familia *Hepeviridae* (Smith y col., 2014). Este último grupo de secuencias mostraron homologías mayores a 97.1% entre si y acorde a la topología del árbol filogenético y a los análisis de bootstrap, aparentemente conforman un grupo nuevo del HEV no descrito o reconocido previamente (Smith y col., 2013, Smith y col., 2014, Takahashi y col, 2014, Oliveira-Filho y col., 2013). No obstante, dadas las inconsistencias y bajos valores observados en el análisis de Bootstrap, referente a la separación de los nodos de los distintos grupos evolutivos del HEV usados para análisis, se requieren ampliar estas observaciones con mayor cantidad de muestras, aislamientos o aumentar el tamaño del fragmento nucleotidico a analizar (Felsenstein 1985, Xia y col., 2003, Liu y col, 2012). Basado en esto, estudios posteriores deberán de realizarse para determinar el origen y evolución de este grupo de HEV no detectado previamente. Por otra parte, considerando este grupo genético de HEV, así como el potencial zoonotico de cepas HEV Genotipo 3 derivadas de cerdos (Meng 2010, Montalvo y col. 2013, Meng 2013) y la posibilidad de salto inter-especie (Usamanov y col., 1994, Kabrane-Laziziu y col., 1999b, Meng 2010b, Geng y col. 2011, Geng y col. 2013b) sería importante ampliar los análisis a partir de muestras de humanos y otras poblaciones de animales de la zona para determinar si la dispersión de las variantes genéticas del HEV detectadas en este estudio se encuentran presentes en estas poblaciones. Lo anterior se sugiere dado que todas las secuencias del presente estudio mostraron la mayor homología genética con secuencias de cepas aisladas de cerdos y humanos (ver anexo 4 y figura 14). De esta manera las muestras denominadas sw5NL-Mx-1 y sw7NL-Mx-1 se encontró que están altamente emparentadas con cepas

porcinas reportadas en Estados Unidos de América (cepa 01-15555A, AF466683), Japón (cepa swJ1-4, AB094206 y cepa swJ2-3, AB094209) y Canadá (cepa swSTHY911, DQ832266) en los años 2002, 2003 y 2007, respectivamente (Huang y col. 2002, Takahashi y col. 2003, Leblanc y col. 2007). Por otra parte y de manera interesante la secuencia de sw9NL-Mx-1 mostró una alta relación genética y filogenética con la cepa HRC-HE13 (AB670951) de origen humano y aislado de un paciente donador de sangre en el año 2012 (Matsubayashi y Sakata 2012). Este último hallazgo enfatiza la necesidad ampliar este tipo de estudios para determinar la eventual circulación de este grupo genético en la población humana dado el carácter patogénico reportado previamente en humanos para esta cepa. La elevada identidad nucleotídica entre las muestras del HVE de este estudio con las reportadas por varios autores plantean que la variabilidad intergrupal del genotipo 3 podría estar asociada con las diferencias entre los sistemas de replicación entre animales y humanos (Kabrane-Lazizi y col., 2001, Zhang y col., 2005), que sugiere una fuente común de infección, probablemente ligada con una transmisión cruzada entre especies (Kabrane-Laziziu y col. 1999a, Meng 2010, Geng y col. 2013a)

CONCLUSIONES

Conclusiones

El procedimiento de RT-PCR y PCR semianidado empleado en muestras de tejidos hepáticos y materia fecal es útil para la determinación de la frecuencia del VHE en cerdos. De los datos obtenidos, se desprende que existe una fuerte evidencia que el VHE está presente y circula en granjas porcinas del estado de Nuevo León y que una proporción significativa (8.6%) de cerdos sacrificados en el rastro del Municipio de Monterrey son portadores de secuencias génicas específicas del VHE.

El genotipo 3 del VHE está presente y circula en una gran proporción en granjas porcinas y cerdos sacrificados en el rastro en el estado de Nuevo León, lo cuál eventualmente puede constituir un factor de riesgo importante para la salud humana tanto por el contacto directo e indirecto con los animales portadores como por el consumo de agua e hígados contaminadas con el virus procedentes de porcinos afectados, así como por la eventual contaminación de otros productos alimenticios irrigados o puestos en contacto con agua en el cual el VHE podría estar presente.

Aparentemente, en la región circulan dos genotipos distintos del VHE, uno representado por cepas clásicas reportadas en cerdos y con probada capacidad zoonótica y otro grupo del cuál aparentemente no existen indicios o reportes de su presencia y podrían representar variantes evolutivas no detectadas en estudios previos. Este es el primer estudio que aporta evidencia de la presencia de estos genotipos en México, y eventualmente podrían ser la causa, o una parte substancial de esta, de procesos de hepatitis diagnosticados hasta el momento como de causa desconocida.

LITERATURA CITADA

Literatura Citada

Acharya S. K., Panda S. K. 2006. Hepatitis E virus: epidemiology, diagnosis, pathology and prevention. *Tropical Gastroenterol*; 27 (2): 63-8.

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

Aggarwall R., Shahi H., Naik S., Yachha S. K., Naik S. R. 1997. Evidence in favour of high infection rate with hepatitis E virus among young children in India. (Letter) *Journal Hepatol*; 26: 1425–1426.

Aggarwal R., Mc. Caustland K. A., Dilawari J. B., Sinha S. D. and Robertson B. H. 1999. Genetic variability of hepatitis E virus within and between three epidemics in India. *Virus Research*; 59: 35-48.

Aggarwal R. 2011. Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *Journal Gastroenterol Hepatol. Jan*; 26 Suppl 1: 72-82.

Aggarwal R. and Krawczynski K. 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*; 15: 9-20.

Andrew A. Adjei, Tettey Yao, Aviyase John T., Adu- Gyamfi Clement, Obed Samuel, Mingle Julius A Patrick, Ayeh-Kumi F. and Adiku Theophilus K. 2009. Hepatitis E virus infection is highly prevalent among pregnant women in Accra, Ghana. *Virology Journal*; 6: 108.1-5

Anónimo 08-11-94 NORMA Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=522>

Arankalle V. A., and Chobe L. P., 1999. Hepatitis E virus: can it be transmitted parenterally *Journal of Viral Hepatitis. Mar*; 6 (2): 161-4.

Arankalle V. A., Paranjape S., Emerson S. U., Purcell R. H. and Walimbe A. M. 1999. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). *Journal of General Virology*; 80: 1691-1700.

Arankalle V. A., Ticehurst J., Sreenivasan M. A., Kapikian A. Z., Popper H., Pavri K. M., and Purcell R. H. 1988. Association of a virus-like particle with enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet*; I: 550-4.

Arankalle V. A., Goverdhan M. K., and Banerjee K. 1995. Antibodies against hepatitis E virus in Old World monkeys. *Journal Viral Hepatitis*; 1: 125–129.

Arends J. E., Ghisetti V., Irvingc W., Daltond H.R. Izopet J., Hoepelmana A. I. M., Salmonf D. 2014. Hepatitis E: An emerging infection in high income countries *Journal of Clinical Virology*; 59: 81–88

Aye T. T., Uchida T., Ma X. Z., Iida F., Shikata T., Zhuang H. and Win K. M. 1992. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China *Journal Nucleic Acids Research*; 20 (13): 3512

Balayan M. S., Andzhaparidze A. G., Savinskaya S. S., Ketiladze E. S., Braginsky D. M., Savinov A. P., Poleschuk V. F. 1983. Evidence for virus in non-A/non-B hepatitis transmitted via the faecal-oral route. *Intervirology*; 20: 23–31.

Batts W., Yun S., Hedrick R. & Winton J. 2011. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Research*; 158: 116–123.

Balayan M. S. 1997. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*; 4: 155-165.

Baylis S. A., Hanschmann K. M., Blumel J., Nubling C. M. 2011. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification techniquebased assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *Journal Clinical Microbiology*. 49: 1234–1239.

Bendall R., Ellis V., Ijaz S., Thurairajah P., Dalton H. R. 2008. Serological response to hepatitis E virus genotype 3 infection: IgG quantitation, avidity, and IgM response. *Journal of Medical Virology* 80: 95–101.

Berke T, Matson D. O. 2000. Reclassification of the *Caliciviridae* into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Archives of Virology*; 145: 1421-36.

Backera J. A., Bertoa A., McCrearyb b. C., Martellib F., Van Der Poela W. H. M. 2012. Transmission dynamics of hepatitis E virus in pigs: Estimation from field data and effect of vaccination *Epidemics*. 4 (2): 86–92

Berto A., Backer J. A., Mesquita J. R., Nascimento M. S., Banks M., Martelli F., Ostanello F., Angeloni G., Di Bartolo I., Ruggeri F. M., Vasickova P., Diez-Valcarce M., Hernández M., Rodríguez –Lazaro D., van der Poel W. H., 2012. Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes*. 5(1-2):190.

Bihl F., Negro F. 2010. Hepatitis E virus: a zoonosis adapting to humans. *Journal Antimicrob Chemother*. May; 65 (5): 817-21.

Bilic I., Jaskulska B., Basic A., Morrow C. J. & Hess M. 2009. Sequence analysis and comparison of avian hepatitis E viruses from Australia and Europe indicate the existence of different genotypes. *Journal of General Virology*; 90: 863–873.

Bile K., Isse A., Mohamud O., Allebeck P., Nilsson L., Norder H., 1994. Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 51: 466-74.

Bissuel François, Houhou Nadira, Leport Catherine, Vezinet Françoise Brun, Jean Louis Vildé. 1996. Hepatitis E antibodies and HIV status *The Lancet* Volume 347, Issue 9013, 25 May, Pages 1494

Blitz-Dorfman L., Monsalve F., Atencio R., Porto L., Monzon M., Favorov M. O. Fields H. A., Pujol F. H., Echevarría J. M., 1996. Serological survey of markers of infection with viral hepatitis among the Yukpa amerindians from western Venezuela. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 9: 655-7.

Bradely D. W., Krawczynski K., Cook E. H. Jr, Mc. Caustland K. A., Humphrey C. D., Spelbring J. E., Myint H. and Maynard J. E. 1987. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Serial passage of disease in *Cynomolgus* macaques and Tamarins and recovery of disease associated 27 to 34 nm virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Science USA*; 84: 6277-6281.

Bradley D. W., Andjaparidze A., Cook E. H., Mc. Caustland K. A., Balayan M., Steler H., Velazquez O., Robertson B., Humphrey C., Kane M., 1988. Aetiological agent of enterically transmitted non-A non-B hepatitis. *Journal of General Virology*; 69: 731- 738.

Bradley D. W., Balayan M. S. 1988. Virus of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Lancet*; 1:819.

Bradley D. W., Purdy M. A. and Reyes, G. R. 1991. Hepatitis e virus genome: molecular features, expression of immunoreactive proteins and sequence divergence. *Journal of Hepatology*; 13 (Suppl. 4): S152-S154.

Bradley D. W. 1992. Hepatitis E: epidemiology, aetiology and molecular biology. *Review of Medical Virology*; 2: 19-28.

Bradley D. W. 1994. Hepatitis E virus. In: Webster, R.G. and Granoff, A. (eds). *Encyclopedia of Virology*. Academic Press Ltd, London; 580-586.

Buisson Y., Coursaget P., Bercion R., Anne D., Debord T., Roue R. 1994. Hepatitis E virus infection in soldiers sent to endemic regions. *Lancet*; 344: 1165-6.

Bustin S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*; 25: 169-193

Bustin S. A. 2002. Quantification of mRNA using real Time reverse transcription PCR (RT-PCR) trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*; 29: 23-39

Bustin S. A. and Nolan, T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal Biomolecular Techniques*; 15: 155-166.

Bustin S. A. and Mueller R. 2005. Real-Time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science. (Lond.)*; 109: 365-379

Buti M., Jardí R., Cotrina M., Rodríguez F. F., Troonen H., Viladomiu L., Esteban J. I., Esteban R., Guardia J. 1995. Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. *Journal of Virological Methods*; 55: 49-54.

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

Casas M., Cortés R., Pina S., Peralta B., Allepuz A., Cortey M., Casal J., Martín M. 2011. Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Veterinary microbiology*. 24; 148 (1): 27-34.

Chauhan A., Jameel S., Dilawari J. B., Chawla Y. K., Kaur U., and Ganguly N. K. 1993. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet*; 8838 (341): 149-150.

Chaussade H., Rigaud E., Allix A., Carpentier A., Touzé A., Delzescaux D., Choutet P., Garcia Bonnet N., Coursaget P. 2013. Hepatitis E virus seroprevalence and risk factors for individuals in working contact with animals. *Journal of Clinical Virology*; 58 (3): 504-508.

Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*; 15: 532-537

Clayson E. T., Innis B. L., Myint K. S., Narupiti S., Vaughn D. W., Giri S., Ranabhat P., and Shrestha M. P. 1995. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 53: 228-232.

Clemente C. P., Pina S., Buti M., Jardi R., Martin M., Bofill M. S., Girones R. 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Journal Emerging Infectious Diseases*; 9: 448-9.

Cruells M. R., Mescia G., Gaibisso R., Ramírez M., Gutiérrez M., Kohen S., González M., Russi J., Chiparelli H., Ucar L., Pérez M. T. 1997. Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay. *Gastroenterol Hepatol*. 20: (6): 95-8.

Cooper K., Huang F. F., Batista L., Rayo C. D., Bezanilla J. C., Toth T. E., and Meng X. J. 2005. Identification of Genotype 3 Hepatitis E Virus (HEV) in Serum and Fecal Samples from Pigs in Thailand and Mexico, Where Genotype 1 and 2 HEV Strains Are Prevalent in the Respective Human Populations *Journal Clinical Microbiology*. Apr; 43 (4): 1684–1688.

Corwin Andrew L., Nguyen T. K. Tien, Bounlu Khanthong, Winarno Jarot, Putri Maily P., Laras Kanti, Larasati Ria P. Sukri, Nono, Timothy Endy, Sulaiman H. A. and Kenneth C. Hyams., 1999. The unique riverine ecology of hepatitis E virus transmission in South-East Asia *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. May-Jun; 93 (3): 255-60.

Dalton H. R., Bendall R., Ijaz S., Banks M. 2008. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infectious Diseases*; 8: 698–709.

de Deus N., Casas M., Peralta B., Nofrarias M., Pina S., Martin M., Segales J., 2008. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Veterinary Microbiology*; 132: 19-28.

de Deus N., Seminati C., Pina S., Mateu E., Martin M., Segale's J., 2007. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Veterinary Microbiology*; 119 (2-4): 105-14.

Di Bartolo Ilaria, Diez-Valcarce Marta, Vasickova Petra, Kralik Petr, Hernandez Marta, Angeloni Giorgia, Ostanello Fabio, Bouwknegt Martijn, Rodríguez-Lázaro David, Pavlik Ivo,

and Maria Rugger Franco 2012. Hepatitis E Virus in Pork Production Chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010 Emerging infectious Diseases; 18 (8): 1282-1289

Di Martino B., Di Profio F., Martella V., Di Felice E., Di Francesco C. E., Ceci C., Marsilio F. 2010. Detection of Hepatitis E Virus in slaughtered pigs in Italy. Archives Virology. 155: 103-106.

Dieffenbach C. W., Dveksler G. S. 2003. PCR primer: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 520

Drexler J. F., Seelen A., Corman V. M., Fumie Tateno A., Cottontail V., Melim Zerbinati R., Gloza-Rausch F., Klose S. M., Adu-Sarkodie Y., Oppong S. K., Kalko E. K., Osterman A., Rasche A., Adam A., Muller M. A., Ulrich R. G., Leroy E. M., Lukashev A. N. and Drosten C. 2012. Bats Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus within the Family Hepeviridae Journal Virol; 86 (17): 9134-9147

Echevarría J. M., Fogeda M., Avellón A. 2015 Epidemiology of hepatitis E virus infection in Spain. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 33 (04): 281-286

Emerson S. U., Zhang M., Meng X. J., Nguyen H., St Claire M., Govindarajan S., Huang Y. K. and Purcell R. H. 2001. Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: Importance of capping and discovery of a cis-reactive element Journal Proceedings National Academy Sciences. U.S.A.; 98 (26): 15270-15275

Emerson S. U., Purcell R. H. 2003. Hepatitis E virus. Reviews in Medical Virology; 13: 145–154.

Emerson S. U., Anderson D., Arankalle A., Meng X.-J., Purdy M., Schlauder G. G., Tsarev S. A., 2004a. Hepevirus. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (Eds.), Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, London, United Kingdom, pp. 851–855.

Emerson S. U., Nguyen H., Graff J., Stephany D. A., Brockington A., and Purcell R. H. 2004b. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *Journal of Virology*; 78: 4838–4846.

Engle R. E., YU C., Emerson S. U., Meng X.-J., and Purcell R. H. 2002. Hepatitis E Virus (HEV) Capsid Antigens Derived from Viruses of Human and Swine Origin Are Equally Efficient for Detecting Anti-HEV by Enzyme Immunoassay. *Journal of clinical Microbiology* 40 (12): 4576-4580

Eckert K. A., Kunkel T. A. 1991 DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR methods and applications*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1 (1):17-24.

Favorov M. O., Nazarova O., Margolis H. S. 1998. Is hepatitis E an emerging zoonotic disease *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 59: 242.

Feagins A. R., Opriessnig T., Guenette D. K., Halbur P. G., Meng X. J. 2007. Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig liver sold in local grocery stores in the United States. *Journal of General Virology*; 88: 912–917.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Forero J. E., Parra J. E., López A. 2014. Detección del Genoma del virus de La Hepatitis E (VHE) en muestras de heces de cerdos en plantas de beneficio de Antioquia, Colombia *Revista Facultad Medicina Veterinaria Zootecnia*. 61(3), septiembre – diciembre: 221-227

Freeman Richard B., Giatras Ioannis., Falagas Mathew E., Supran Stacey., O'Connor Kevin., Bradley James., Snyderman David R., Delmonico Francis L. 1999. Outcome of Transplantation of Organs procured from Bacteremic Donors *Clinical Transplantation* 27 October-Volume 68 - Issue 8 - pp 1107-1111

Galiana C., Fernández B. S. Pérez G. M. T. 2010. Prevalencia del virus de la hepatitis E (VHE) y factores de riesgo en trabajadores de explotaciones porcinas y donantes voluntarios *Enferm Infecc Microbiol Clinical*; 28 (9): 602–607

Geng Jiabao, Fu Hongwei, Wang Ling, Bu Qiuning, Liu Peng, Wang Maorong, Sui Yunhua, Wang Xiaojuan, Zhu Yonghong, Zhuang Hui. 2011. Phylogenetic analysis of the full genome of rabbit hepatitis E virus (rbHEV) and molecular biologic study on the possibility of cross species transmission of rbHEV *Infection, Genetics and Evolution*; 11: 2020–2025

Geng Y., Zhao C., Fan J., Harrison T. J., Zhang H., Lian H., Geng K. and Wang Y. 2013a. Genotype analysis of hepatitis E virus from sporadic hepatitis E *Journal Infection Genetics Evolution*; 20: 413-417

Geng Yansheng, Zhang Hongxin, Li Jun, Huang Weijin, Harrison Tim J., Zhao Chenyan, Zhou Yanchun, Lian Haichen, Wang Youchun. 2013b. Comparison of hepatitis E virus genotypes from rabbits and pigs in the same geographic area: No evidence of natural cross-species transmission between the two animals *Infection, Genetics and Evolution*; 13: 304–309

Ghabrah T. M., Tsarev S., Yarbough P. O, Emerson S. U., Strickland G. T. and Purcell R. H. 1998. Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *Journal of Medical Virology*; 55: 134-137.

Green K. Y., Ando T., Balayan M. S., Berke T., Clarke I. N., Estes M. K., Matson D. O., Nakata S., Neill J. D., Studdert M. J. and Thiel H-J. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *The Journal Infectious Diseases*; 181 (2): 322-30.

Gutiérrez C., Quintero, Forero J. E., Parra J. E., López- Herrera A. 2015. Detection of Hepatitis E Virus genome in pig livers in Antioquia (Colombia). *Genetics and Molecular Research. En prensa*; 14 (1): 2890-9

Gutiérrez J. I., Rodríguez M. J., De Ory F., Piédrola G., Maroto M. C. 1999. Reliability of low-avidity IgG and of IgA in the diagnosis of primary infection by rubella virus with adaptation of a commercial test. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*; 13 (1): 1-4.

Gutiérrez V. C., Ospina V. D., Forero D. J., De Jesús R. B., Gutiérrez B. L., Correa L. G., López H. A., Parra S. J. 2014. Serological and molecular detection of Hepatitis E virus in pig farms of Antioquia *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* Vol 9, No 2 158-168

Halabe CH. J. and Angulo V. F., 2000. Hepatitis Viral *Revista Facultad Medicina. UNAM* Vol.43 No. 3 Mayo-Junio., 2000 pp 90-100

Halbur P. G., Kasornrorkbua C., Gilbert C., Guenette D., Potters M. B., Purcell R. H., Emerson S. U., Toth T. E., Meng, X.-J., 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *Journal of Clinical Microbiology*; 39: 918–923.

Haqshenas G., Shivaprasad H. L., Woolcock P. R., Read D. H., and Meng X. J.. 2001. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *Journal of General Virology*; 82: 2449–2462.

Harrison T. J. 1999. Hepatitis E virus- an update. *Liver International*; 19: 171-176.

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

Hillis A., Shrestha S. M., Saha N. K. 1973. An epidemic of infectious hepatitis in the Kathmandu Valley. *Journal of Nepal Medical Association*; 11-51.

Hsieh S. Y., Yang P. Y., Ho Y. P., Chu C. M., Liaw Y. F. 1998. Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *Journal of Medical Virology*; 55: 3000-4.

Hsieh S. Y., Meng X. J., Wu Y. H., Liu S. T., Tam A. W., Lin D. Y., and Liaw Y. F. 1999. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *Journal of Clinical Microbiology*; 37: 3828–3834.

Hsu I. W.-Y. & Tsai H.-J. 2014. Avian hepatitis E virus in chickens, Taiwan, 2013. *Emerging Infectious Diseases Journal*; 20: 149–151.

Huang C. C., Nguyen D., Fernandez J., Yun K. Y., Fry K. E., Bradley D. W., Tam A. W. and Reyes G. R. 1992. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV) *Journal Virology*; 191: (2): 550-558

Huang F. F., Haqshenas G., Guenette D. K., Halbur P. G., Schommer S. K., Pierson F. W., Toth T. E., Meng X. J., 2002. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *Journal Clinical of Microbiology*; 40: 1326–1332.

Huang F. F., Sun Z. F., Emerson S. U., Purcell R. H., Shivaprasad H. L., Pierson F. W., Toth T. E. and Meng, X. J. 2004. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV *Journal Gen. Virol.*; 85: (PT 6): 1609-1618

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

Inoue J., Takahashi M., Mizuo H., Suzuki K., Aikawa T., Shimosegawa T. and Okamoto H. 2009. Nucleotide substitutions of hepatitis E virus genomes associated with fulminant hepatitis and disease severity *Tohoku The Journal of Experimental Medicine* 218: (4): 279-284

Ishikawa K., Matsui K., Madarame T, Sato S., Oikawa K., Uchida T. 1995. Hepatitis E probably contracted via a Chinese herbal medicine, demonstrated by nucleotide sequencing. *Journal Gastroenterol*; 30: 534-8.

Jameel S., 1999. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 1999, 1–16.

Johne R., Heckel G., Plenge B., A., Kindler E., Maresch C., Reetz J., Schielke A. and Ulrich R. G. 2010 Novel hepatitis e virus genotype in norway rats, Germany *Journal Emerging Infect. Dis.*; 16 (9): 1452-1455

Kabrane L. Y., Fine J. B, Elm J., Glass G. E., Higa H., Diwan A., Gibbs C. J., Jr. Meng X. J., Emerson S. U., and Purcell R. H.. 1999a. Evidence for wide-spread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 61: 331–335.

Kabrane L. Y., Meng X. J., Purcell R. H., Emerson S. U. 1999b. Evidence that the genomic ARN of hepatitis E virus is capped. *Journal of Virology*; 73: 8848–8850.

Kabrane L. Y., Zhang M., Purcell R. H., Miller K. D., Davey R. T., and Emerson S. U. 2001. Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains. *Journal of General Virology*; 82: 1687– 1693.

Kasorndorkbua C., Opriessnig T., Huang F. F., Guenette D. K., Thomas P. J., Meng X. J., and Halbur P. G. 2005. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Applied and Environmental Microbiology*; 71: 7831-7.

Ke W. M., Tan D., Li J. G., Izumi S., Shinji Y., Hotta H., Yao J. L. 1996. Consecutive evaluation of immunoglobulin M and G antibodies against hepatitis E virus. *Journal Gastroenterol Hepatol*; 31: 818-22.

Khudyakov Y. E., Khudyakova N. S., Fields H. A., Jue D., Starling C., Favorov M. O., Krawczynski K., Polish L., Mast E., Margolis H. 1993. Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology*; 194: 89-96.

Khudyakov Y. E., Khudyakova N. S., Jue D. L., Wells T. W., Pandhya N., Fields H. A. 1994. Comparative characterization of antigenic epitopes in the immunodominant region of the protein encoded by open reading frame 3 in Burmese and Mexican strains of hepatitis E virus. *Journal of General Virology*; 75: 641-6.

Khuroo M. S. 1980. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: Possibility of another human hepatitis virus distinct from post transfusion non-A, non-B Type. *American Journal of Medicine*; 68: 818-23.

Khuroo M. S. and Dar M. Y. 1992. Hepatitis E evidence for person to person transmission and inability of low dose immune serum globulin from an Indian source to prevent it. *Indian Journal Gastroenterol*; 11: 113-116

Khuroo M. S., Kamili S., Jameel S., 1995. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet*; 345:1025-6.

Khuroo M. S. 2003. Viral hepatitis in international travellers: risks and prevention. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 2 (21): 143-152.

Khuroo M. S., Kamili S., Yattoo G. N. 2004. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *Journal Gastroenterol Hepatol*. 19 (7): 778–784.

Koonin E. V., Gorbalenya A. E., Purdy M. A., Rozanov M. N., Reyes G. R., Bradley D. W. 1992. Computer assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand ARN plant and animal virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; 89: 8259–8263.

Kumar R. M., Uduman S., Rana S., Kochiyil J. K., Usmani A., Thomas L., 2001. Seroprevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*; 100: 9-15.

Kumar A., Beniwal M., Kar P., Sharma J. B., Murthy N. S. 2004. Hepatitis E in pregnancy. *International Journal of Gynaecology Obstetrics*; 85:240-4.

Kwo P. Y., Schlauder G. G., Carpenter H. A., Murphy P. J., Rosenblatt J. E., Dawson G. J., Mast E. E., Krawczynski K. and Balan V. 1997. Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clinic Proceedings*; 72:1133-1136.

Leblanc D., Ward P., Gagne M. J., Poitras E., Muller P., Trottier Y. L., Simard C. and Houde A. 2007. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter *International Journal Food Microbiology*; 117 (2): 160-166

Legrand-Abravanel F., Thevenet I., Mansuy J. M., Saune K., Vischi F., Peron J. M., Kamar N., Rostaing L. and Izopet J. 2009. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections. *Clinical Vaccine Immunology*; 16: 772–774.

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

Li D., Huang R., Tian X., Yin S., Wei J., Huang X., Wang B., Li R., Li Y. 1995. Morphology and morphogenesis of hepatitis E virus (strain 87 A). *Chinese Medical Journal*; 108: 126-31.

Li C. P., Tong M. J., Hwang S. J., Luo J. C., Co R. L., Tsay S. H., Chang F. Y., Lee S. D., 2000. Autoimmune cholangitis with features of autoimmune hepatitis: successful treatment with immunosuppressive agents and ursodeoxycholic acid. *Journal Gastroenterol Hepatol*; Jan; 15 (1): 95-8.

Li T. C., Chijiwa K., Sera N., Ishibashi T., Etoh Y., Shinohara Y., Kurata Y., Ishida M., Sakamoto S., Takeda N., and Miyamura T. 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerging Infectious Diseases*; 11 (12): 1958-60.

Liu Peng, Li Lingjun, Wang Ling, Bu Qiuning, Fu Hongwei, Han Jian, Zhu Yonghong, Lu Fengmin, Hui Zhuang 2012. Phylogenetic analysis of 626 hepatitis E virus (HEV) isolates from humans and animals in China (1986–2011) showing genotype diversity and zoonotic transmission *Infection, Genetics and Evolution*; 12: 428–434

Lyra A. C., Pinho J. R. R., Silva L. K., Sousa L., Saracen C. P. 2005. HEV, TTV and GBV-C/HGV markers in patients with acute viral hepatitis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*; 38: 767-75.

Magden J., Takeda N., Li T., Auvinen P., Ahola T., Miyamura T., Merits A., Kaariainen L. 2001. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *Journal of Virology*; 75: 6249–6255.

Maneerat Y., Clayson E. T., Myint S. A., Young G. D., Innis B. L. 1996. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *Journal of Medical Virology*; 48: 121-8.

Mansuy Jean-Michel, Richard Bendall, Florence Legrand-Abravanel, Karine Sauné, Marcel Miédouge, Vic Ellis, Henri Rech, François Destruel, Nassim Kamar, Harry R. Dalton, and Jacques Izopetcorresponding. 2011. Hepatitis E Virus Antibodies in Blood Donors, France *Emerg Infect DisDec*; 17 (12): 2309–2312.

Markham R., Frey S., Hills G. H. 1963. Methods for the enhancement of image detail and accentuation of structure in electron microscopy. *Virology*; 20: 88-102.

Martin M., Segalés J., Huang F. F., Guenette D. K., Mateu E., de Deus N., Meng X. J. 2007. Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Veterinary Microbiology*; 122: 16–24

Mast E. E., Alter M. J., 1993. Epidemiology of viral hepatitis: an overview. *Seminars in Virol*; 4: 273-83.

Mast E. E. and Krawczynski K. 1996. Hepatitis E: an overview. *Annual Review of Medicine*. 47: 257-266.

Mast E. E., Alter M. J., Holland P. V. and Purcell R. H. 1998. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology*; 27: 857-861.

Mateos M. L., Camarero C., Lasa E., Teruel J. L., Mir N., Baquero F. 1999. Hepatitis E virus: relevance in blood donors and risk groups. *Vox Sang.*; 76: 78-80.

Matsubayashi K. and Sakata H. 2012 Analysis of HEV strains isolated from blood donors in Hokkaido: Hepatitis E virus type 3 gene for capsid protein, partial cds, isolate: HRC-HE13 Unpublished Submitted GenBank ACCESSION AB670951

Meng X.-J., Purcell R. H., Halbur P. G., Lehman J. R., Webb D. M., Tsareva T. S., Haynes J. S., Thacker B. J., Emerson S. U. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*; 94 (18): 9860–9865.

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

Meng X. J., 2009. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk, *Veterinary Microbiol*; 140:256–265

Meng X. J. 2009. Recent advance in hepatitis E *Journal of Viral Hepatitis*; 17: 153-161

Meng X. J. and Halbur P. G. 2005. Swine hepatitis E virus. In *Diseases of Swine*, 9 th ed. Straw B. E., Zimmerman J. J. D’Allaire S. and Taylor D. J. eds. Blackwell Publishing Iowa State University Press, Ames, Iowa; 537-545

Meng X. J. 2010a. Hepatitis E virus: Animal Reservoirs and Zoonotic Risk *Veterinary Microbiology* Jan 27; 140 (3-4): 256-265.

Meng X. J. 2010b. Recent advances in Hepatitis E Virus *Journal of Viral Hepatitis*; 17: 153-161

Meng X. J. 2013. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Seminars in liver disease Journal*; 33: 41–49.

Mizuo H., Suzuki K., Takikawa Y., Sugai Y., Tokita H., Akahane Y., Itoh K., Gotanda Y., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H. 2002. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *Journal Clinical Microbiol*; 40: 3209–3218.

Mirazo S., Ramos N., Mainardi V., Gerona S., Arbiza J. 2014. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: An update. *Hepatic Medicine: Evidence and Research*; 6: 45- 59.

Montella F., Rezza G., Di Sora F., Pezzotti P., Recchia O. 1994. Association between hepatitis E virus and HIV infection in homosexual men. *Lancet*; 19: 344:1433

Montalvo Villalba María de la Caridad, Canwat Owot Jacob, Correia Benedito, Bello Corredor Marité, Pedroso Flaquet Placido, Sariego Frometa Susel, Sanchez Wong Meilin, Rodríguez Lay Licel de los Ángeles. 2013. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Cuba *Infection, Genetics and Evolution* 14: 335–339

Moraes dos Santos D. C., Dutra Souto F. J. 2002. Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living a community located in the north area of Rio de Janeiro, R. J., Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 97: 37-40

Morales A., García F., Bermúdez V., Solórzano M., Morales R., 2013. Hepatitis E virus in domestic animals: A revi *Revista del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”*; 44 (1)

Myint H., Soe M. M., Khin T, Myint T. M., Tin K. M. 1985. A clinical and epidemiological study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Rangoon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 1183-9.

Nanda S. K., Yalcinkaya K., Panigrahi A. K., Acharya S. K., Jameel S., Panda S. K. 1994. Etiological role of hepatitis E virus in sporadic fulminates hepatitis. *Journal of Medical Virology*; 42: 133-137.

Nanda S. K., Ansari I. H., Acharya S. K., Jameel S., Panda S. K. 1995. Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infections. *Gastroenterol*; 108: 225-30.

National Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. Viral hepatitis. Acceso 25 de febrero. <http://www.cdc.gov/hepatitis/>.

Nishizawa T., Takahashi M., Mizuo H., Miyajima H., Gotanda Y. and Okamoto H. 2003. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome. *Journal of General Virology*; 84: 1245–1251.

Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994 (www.senasica.gob.mx)

Okamoto H., Takahashi M., Nishizawa T., Fukai K., Muramatsu U. and Yoshikawa A. 2001. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 289: 929-936.

Oliveira-Filho Edmilson F., Heinz-Jürgen Thiel Matthias König. 2013. Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification; *Journal Veterinary Microbiology*; 165: 148–154

Olvera Alex, Busquets Núria, Cortey Marti, de Deus Nilsa, Ganges Lillianne, Núñez José Ignacio, Peralta Bibiana, Toskano Jennifer, Dolz Roser. 2010. Applying phylogenetic analysis to viral livestock diseases: Moving beyond molecular typing; *The Veterinary Journal*; 184: 130–137

Panduro A., Escobedo M. G., Fierro N. A., Ruiz M. B., Zepeda C. E. A., Román, S. 2011. Epidemiología de las hepatitis virales en México *Salud pública de México*; vol.53 supl.1 Cuernavaca ene. pp. 37-45

Paraná R., Cotrim H. P., Cortey-Boennec D., Trépo C., Lyra L. 1997. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibodies in patients from a referral unit of liver diseases in Salvador, Bahia, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 57: 60-1.

Paiva H. H., Tzaneva V., Haddad R. and Yokosawa J. 2007. Molecular Characterization of Swine Hepatitis E Virus from Southeastern Brazil. *Braz. Journal Microbiol*; 38: 693-698

Paul D. A., Knigge M. F., Ritter A., Gutierrez R., Pilot-Matias T., Chau K. H., and Dawson G. J. 1994. Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion proteins and synthetic peptides. *Journal of Infectious Disease*; 4 (169): 801-806.

Pavio N., Meng X. J., Renou C. 2010. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Veterinary Research*; 41 (6): 46.

Pérez O. M., Morales W., Paniagua M., Strannegard O. 1996. Prevalence of antibodies to hepatitis A, B, C, and E viruses in a healthy population in Leon, Nicaragua. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 55: 17-21.

Pfeffer U., Fecarotta E. and Vidali G. 1995. Efficient one-tube RTPCR amplification of rare transcripts using short sequence-specific reverse transcription primers. *BioTechniques*, 18: 204-205.

Pina S., Jofre J., Emerson S. U., Purcell R. H. and Girones R. 1998. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Applied and Environmental Microbiology*; 64: 4485-4488.

Pina S., Buti M., Cotrina M., Piella J., Girones R., 2000. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *Journal of Hepatology*; 33: 826–833.

Pischke S. and H. Wedemeyer, 2013. “Hepatitis E virus infection: multiple faces of an underestimated problem,” *Journal of Hepatology*, vol. 58, no. 5, pp. 1045–1046,.

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

Psichogiou M., Vaindirli E., Tzala E., Voudiclari S., Boletis J., Vosnidis G., Moutafis S., Skoutelis G., Hadjiconstantinou V., Troonen H., Hatzakis A. 1996. Hepatitis E virus (HEV)

infection in haemodialysis patients. The Multicentre Haemodialysis Cohort Study on Viral Hepatitis. *Nephrol Dial Transplant*. Jun; 11 (6):1093-5.

Pudupakam R. S., Huang Y. W., Opriessnig T., Halbur P. G., Pierson F. W., and Meng X. J.. 2009. Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo. *Journal Virology*; 83: 384–395.

Pujol F., Favorov M. O., Marcano T., Esté J. A., Magris M., Liprandi F. Khudyakov Y. E., Khudyakova N. S., Fields H. A., 1994. Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban a rural populations in Venezuela. *Journal of Medical Virology*; 42: 234-6.

Purcell R. H. Hepatitis E virus. In: Fields B. N., Knipe D. M., and Howley P. M., 1996. eds. *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott – Raven; 2831-2843.

Purcell R. H., Emerson S.U., 2001. Hepatitis E virus. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; pp. 3051–3061.

Quintana J. y González A. 2003. Virus de la hepatitis E. *Revista Biomédica*; 14: 165-89.

Quintana A., Sanchez L., Larralde O., Anderson D. 2005. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in residents of district in Havana, Cuba. *Journal of Medical Virology*; 76: 69-70.

Rab M. A., Bile M. K., Mubarik M. M., Asghar H., Sami Z., Siddiqi S., Dil A. S., Barzgar M. A., Chaudhry M. A. and Burney M.I. 1997. Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan a common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 57: 151-157

Raj V. S., Smits S. L., Pas S. D., Provacia L. B. V., Moorman-Roest H., Osterhaus A. D. M. E. & Haagmans B. L. 2012. Novel hepatitis E virus in ferrets, The Netherlands. *Emerging Infectious Diseases journal*; 18: 1369–1370.

Reyes G. R., Purdy M. A., Kim J. P., Luk K. C., Young L. M., Fry K. E., Bradley D. W. 1990. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science Translational Medicine*; 247 (4948): 1335-9.

Reyes G. R., Huang C. C., Tam A. W., Purdy M. A. 1993a. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Archives of Virology*; 7: 15-25.

Robson S. C., Adams S., Brink N., Woodruff B., Bradley D. 1992. Hospital outbreak of hepatitis E. *Lancet*; Jun 6; 339: 1424-5.

Rodríguez F., Jardi R., Buti M., 2012. Hepatitis E: Molecular virology, epidemiology and pathogenesis *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*; 30 (10): 624–634

Rychlik W., Spencer W. J., and Rhoads R. E., 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*. Nov 11; 18 (21): 6409–6412.

Saad M. D., Hussein H. A., Bashandy M. M., Kamel H. H., Earhart K. C., Fryauff D. J., Mary Younan., Mohamed Amira H. 2007. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt, *Infection Genetics and Evolution Journal*; 7: 368–373

Schlauder G. G., Dawson G. J., Erker J. C., Kwo P. Y., Knigge M. F., Smalley D. L., Rosenblatt J. E., Desai S. M. and Mushahwar I. K. 1998 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*; 79 (Pt 3): 447-456

Schlauder G. G., Desai S. M., Zanetti A. R., Tassopoulos N. C., Mushahwar I. K. 1999. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of HEV. *Journal of Medical Virology*; 57: 243-51.

Schlauder G. G., Mushahwar I. K. 2001. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *Journal of Medical Virology*; 65: 282-92.

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

Simard G., Quessy S., Mueller P., Delisle J., Lamarche C.-A., Trottier Y.-L. and Simard C. 2009. Experimental infection of swine with a Canadian isolate of Hepatitis E virus (HEV) *Journal Unpublished Journal Submitted Virologie Alimentaire, ACIA, 3400 Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe, QC J2S 8E3, Canada*

Smith J. L. 2001. A review of hepatitis E virus. *Journal of Food Protection*. 64: 572-586.

Smith Donald B., Purdy Michael A., Simmonds Peter. 2013. Genetic Variability and the Classification of Hepatitis E Virus *Journal of Virology*; 87 (8): 4161– 4169

Smith D. B., Simmonds P., Jameel S., Harrison T. J., Meng X. J., Okamoto H., Van der Poel W. H. M., Purdy M. A., 2014. Consensus Proposals for Classification of the Family Hepeviridae. *Journal of General Virology*; 95: 2223-2232.

Tagle Martín. 2007. Hepatitis A y E. Simposio. *Revista Diagnóstico*; 46 (1): 18-23.

Takahashi K., Kang J. H., Ohnishi S., Hino K. and Mishiro S. 2002 Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis *Journal of Infectious Diseases*; 185 (9): 1342-1345

Takahashi M., Nishizawa T., Miyajima H., Gotanda Y., Iita T., Tsuda F., and Okamoto H.. 2003. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *Journal of General Virology*; 84: 851– 862.

Takahashi M., Tanaka T., Azuma M., Kusano E., Aikawa T., Shibayama T., Yazaki Y., Mizuo H., Inoue J. and Okamoto H. 2007. Prolonged fecal shedding of hepatitis E virus (HEV) during sporadic acute hepatitis E: evaluation of infectivity of HEV in fecal specimens in a cell culture system *Journal Clinical Microbiology*; 45 (11): 3671-3679

Takahashi K., Terada S., Kokuryu H., Arai M. and Mishiro S. 2010 A wild boar-derived hepatitis E virus isolate presumably representing so far unidentified 'genotype 5 Journal Kanzo 51: 536-538

Takahashi M., Nishizawa T., Sato H., Sato, Y., Jirintai Nagashima S. and Okamoto H. 2011 Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype Journal of General Virology; 92 (PT 4): 902-908

Takahashi Masaharu, Nishizawa Tsutomu, Nagashima Shigeo, Jirintai Suljid, Kawakami Manri, Sonoda Yoshihide, Suzuki Tadahiro, Yamamoto Shogo, Shigemotof Kazuhiro, Ashida Kozo, Sato Yukihiro, Okamoto Hiroaki, 2014. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains Virus Research; 180: 59–69

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

Tam A. W., White R., Yarbough P. O., Murphy B. J., McAtee C. P., Lanford R. E. and Fuerst, T. R. 1997. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. Virology; 238: 94-102.

Tanno H., Hay O. 2005. Hepatitis viral en América Latina. Acta Gastroenterol Latinoam: 35: 169-82.

Tavera H. R., Richheimer W. R. 2008. Hepatitis E anictérica en pediatría. Reporte de un caso y revisión de la literatura. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría: 21.22 (83): 85-89.

Tei S., Kitajima N., Takahashi K., and Mishiro S. 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. Lancet; 362: 371–373.

Thomas D. L., Yarbough P. O., Vlahov D., Tsarev S. A., Nelson K. E., Saah A. J., and Purcell R. H., 1997. Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *Journal of Clinical Microbiology*; 35 (5): 1244-1247.

Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*; 25: 4876-4882.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*; 22: 4673-4680.

Ticehurst J. 1991. Identification and characterization of hepatitis E virus. En: Hollinger BF, Lemon SM, Margolis HS eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore: Williams & Wilkins; 501-13.

Ticehurst J., Popkin T. J., Bryan J. P., Innis B. L., Duncan J. F., Ahmed A. Iqbal M., Malik I., Kapikian A. Z., Legters L. J., 1992. Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis on Pakistan: Serologic responses and pattern of virus excretion. *Journal Medical Virology*; 36: 84-92

Ticehurst J. R. Hepatitis E virus. In: Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C. and Tenover F. C. 1999. Eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edition. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1053-1069

Tokita H., Harada H., Gotanda Y., Takahashi M., Nishizawa T. and Okamoto H. 2003. Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient infected with a genotype III hepatitis E virus in 1993 *Journal of General Virology*; 84 (PT 2): 421-427

Trinta K. S., Liberto M. I. M., de Paula V. S., Yoshida C. F. T. 2001. Hepatitis E virus infection in selected brazilian populations. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 96: 25-9.

Tsarevo S. A., Emerson S. U., Tsareva T. S., Yarbough P. O., Lewis, M., Govindarajan S., Reyes G. R., Shapiro M. and Purcell R. H. 1993. Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *Journal of Infectious Diseases*; 167: 1302-1306.

Tsarevo S. A., Binn L. N., Gomatos P. J., Arthur R. R., Monier M .K., van Cuyck-Gandre, H., Longer C. F. and Innis, B. L. 1999. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *Journal of Medical Virology*; 57: 68-74.

Usmanov R. K., Balaian M. S., Kazachkov IuA., Alymbaeva D. B., Zamiatina N. A., Dzhumalieva D. I., Voronina O. V. 1994. Further study of experimental hepatitis E in piglets journal *Voprosy virusologii* 39 (5):208-12

Valasek M. A. and Repa J. J. 2005 The power of real-time PCR, *Adv. Physiol. Educ.* 29: 151-159

Van der Poel W. H., Verschoor F., van der Heide R., Herrera M. I., Vivo A., Kooreman M., de Roda Husman A. M., 2001. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands. *Journal Emerging Infectious Diseases*; 7: 970–976.

Velázquez O., Stetler H. C., Avila C., Ornelas G., Alvarez C., Hadler S. C., Bradley D. W., 1990. Sepulveda J Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. *Journal of the American Medical Association*; 263: 3281-5.

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

Wang Y. R., Ling R., Erker J. C., Zhang H., Li H., Desai S. M., Mushahwar I. K. and Harrison T. J. A 1999. Divergent Genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology*; 80: 169-177.

Wang Y., Zhang H., Roger L., Hemin L., Harrison T. J. 2000. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *Journal of General Virology*; 81: 1675-86.

Wang Y., Levine D. F., Bendall R. P., Teo C. G., and Harrison T. J. 2001. Partial sequence analysis of indigenous hepatitis E virus isolated in the United Kingdom. *Journal of Medical Virology*; 4 (65): 706-709.

Wang Y. C., Zhang H. Y., Xia N. S., Peng G., Lan H. Y., Zhuang H., Zhu Y. H., Li S. W., Tian K. G., Gu W. J., Lin J. X., Wu X., Li H. M., Harrison T. J. 2002. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *Journal Medical Virology*; 67: 516-21.

Widdowson M. A., Jaspers W. J., van der Poel W. H., Verschoor F., de Roda Husman A. M., Winter H. L., Zaaijer H. L., Koopmans M. 2003. Cluster of cases of acute hepatitis associated with hepatitis E virus infection acquired in the Netherlands. *Clinical Infectious Diseases*; 36 (1): 29-33

Wichmann O., Schimanski S., Koch J., Kohler M., Rothe C., Plentz A., Jilg W, Stark K. 2008. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany, *Journal of Infectious Diseases*; 198: 1732–1741

Wong D. C., Purcell R. H., Sreenivasan M. A., Prasad S. R., Pavari K. M., 1980. Epidemic and endemic hepatitis in India; Evidence for non-A, non-B type. *Lancet II*: 876-9.

Woo P. C., Lau S. K., Teng J. L., Tsang A. K., Joseph M., Wong E. Y., Tang Y., Sivakumar S., Xie J., Bai R., Wernery R., Wernery U. and Yuen K. Y. 2014. New hepatitis e virus genotype in camels, the middle East *Journal Emerging Infectious Diseases*; 20 (6): 1044-1048

Worm H. C. and Wirnsberger G. 2004. Hepatitis e vaccines: progress and prospects. *Drugs*; 64 (14): 1517-1531.

Worm H. C., van der Poel W. H. M., Brandstatter G. 2002. Hepatitis E: an overview. *Microbes and Infection*; 4: 657–666.

Worm H. C., Schlauder G. G., Wurzer H., and Mushahwar I. K. 2000. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. *Journal Gen. Virol.*; Pt 12 (81): 2885-2890.

Xia Xuhua, Xie Zheng, Salemi Marco, Chen Lu, and Wang Yong, 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 26: 1–7

Xing L., Kato K., Li T., Takeda N., Miyamura T., Hammar L., Cheng R.H. 1999. Recombinant hepatitis E cápside protein self-assembles into dual-domain T=1 particle presenting native virus. *Virology*; 265: 35–45.

Xing L., Li T. C., Mayazaki N., Simon M. N., Wall J. S., Moore M., Wang C. Y., Takeda N., Wakita T., Miyamura T., Cheng R. H. 2010. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathwa. *The Journal of biological chemistry*. 285 (43): 33175-83

Yarbough P. O., Tam A. W., Fry K. E., Krawczynski K., Mc. Caustland K. A., Bradley D. W. and Reyes G. R. 1991. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *Journal of Virology*; 65: 5790-5797.

Yarbough P. O. 1999. Hepatitis E virus: Advances in HEV biology and HEV vaccine approaches. *Intervirology*; 42: 179-184.

Yayli G., Kilic S., Ormeci R. 2002. Hepatitis agents with enteric transmission an epidemiological analysis. *Infection*; 30: 334-7.

Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki N., Gotanda Y., and Okamoto H.. 2003. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *Journal of General Virology*; 84: 2351–2357.

Zafrullah M., Ozdener M. H., Panda S. K., Jameel S. 1997: The ORF3 protein of hepatitis E is phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *Journal of Virology*; 71: 9045–9053.

Zafrullah M., Ozdener M. H., Kumar R., Panda S. K., Jameel S. 1999. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *Journal of Virology*; 73: 4074–4082.

Zanetti A. R., Schlauder G. G., Romano L, Tanzi E, Fabris P, Dawson G. J., Mushahwar I. K., 1999. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *Journal Medical Virology*; 57: 356-60.

Zhang M., Purcell R. H., Emerson S. U. 2001. Identification of the terminal sequence of the SAR-55 and MEX- 14 strains of hepatitis E virus and confirmation that the genome is capped. *Journal of Medical Virology*; 65: 293–295.

Zhao C., Ma Z., Harrison T. J., Feng R., Zhang C., Qiao Z., Fan J., Ma H., Li M., Song A. and Wang, Y. 2009. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China *Journal of Medical Virology*; 81 (8): 1371-1379.

Zwettler D, Fink M, Revilla-Fernández S, Steinrigl A, Winter P, Köfer J. 2012. First detection of hepatitis E virus in Austrian pigs by RT-qPCR. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*; 125 (7-8): 281-9.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS.....	104
ÍNDICE DE ANEXOS.....	105
ANEXOS 1.....	107
Tabla 1 Total de municipios del estado de Nuevo León que tienen granjas porcinas y el total de la población de cerdos por municipio.....	107
ANEXO 2.....	109
2.1.-Técnica de Extracción de RNA.....	109
2.2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	110
Tabla 2 Protocolo de Extracción de ARN Método de Trizol.....	112
2.3.-La Purificación de los productos delPCR.....	112
Tabla 3. Procedimiento para purificar muestra para secuenciador.....	113
2.4 Protocolo de Secuenciación para VHE.....	114
Tabla 5. Recomendaciones de rangos de cantidad de ADN de plantilla para cada Química.....	114
2.5.- Descripción de cómo preparar y llevar a cabo las reacciones del ciclo para la secuenciación.....	114
Tabla 6 Para preparar las mezclas para lleva acabo la reacción se utiliza M13, plásmidos, y Productos de PCR.....	115
2.6.- Protocolos para la eliminación de los terminadores no incorporados	115
Tabla 7 Purificación de muestras para precipitar con Etanol / Acetato de Sodio para secuenciar Usar etanol al 95% en lugar de absoluto.....	116
Tabla 8 Purificación de muestras para precipitar con Etanol / Acetato de Sodio para secuenciar Usar etanol al 95% en lugar de absoluto.....	117
2.7.- Recomendaciones para perpetrar el kit ABI PRISM bigDye Terminator v3.1 secuenciación.....	118
Tabla 9. Recomendaciones de rangos de cantidad de ADN de plantilla para cada Química.....	118

ANEXO 3.....	119
Tabla 10 Municipios positivos a la amplificación de 212 pb del virus de la hepatitis E del Estado de Nuevo León.....	119
Figura 1 Municipios donde coinciden la positivos de hígado de rastro y punto de venta y granjas de cerdos del virus de la hepatitis E del Estado de Nuevo León.....	120
ANEXO 4.....	121
Alineación de secuencias de las cepas de HEV reportadas en el banco de genes con las secuencias sw7NLMx, sw9NLMx,sw5NLMx, sw8NLMx-1, sw4NLMx-1 obtenidas en el presente estudio.....	121
ANEXO 5.....	123
Artículo en la revista Salud pública Méx vol.55 no.2 Cuernavaca mar./abr. 2013.....	124

ANEXOS 1

En la porcicultura en Nuevo León existe una gran variedad de sistemas productivos que se diferencian entre sí por el nivel de tecnología aplicada, el grado de integración vertical y horizontal y los mercados que atienden, se agrupan en tres diferentes categorías, el Tecnificado, el Semitecnificado y el de Traspatio el total de municipios del estado de Nuevo León que tienen granjas porcinas y el total de la población de cerdos por municipio

Tabla 1 Distribución de 86 Granjas de cerdos en 20 municipios del estado de Nuevo León y la cantidad de números de cerdos comprendidas en cada una de las granjas

Nombre Granja	Municipio	Población total	Población total por Municipio
El Cerrito	Allende	2140	19177
El Gavilán		968	
Ana Margarita1		7220	
Ana Margarita2		4510	
Los Leales		2167	
El Olmo		2172	
San Jerónimo	Apodaca	4508	5800
Javier Treviño		1292	
La Prietita	Cadereyta	3984	71092
La Rurrís		3876	
La 5 Hermanos		1026	
Los Dos Puerquitos		553	
La Perseverancia		14245	
El Milagro		412	
Santa Cecilia		813	
La Esperanza		3600	
La Escondida		7200	
La Esperanza		2568	
Santa Mónica		2254	
El Chancho		4962	
Erika		4556	
San Ramón del Topetón		6495	
El Tesoro		10820	
La Fortaleza		3728	
El Gorgeo de las Aves # 2	Cerralvo	590	717
San Francisco		127	
El Puente,	Ciénega de Flores	4506	4506
La Jara	Dr. Coss	2710	2710
ABCI	Dr. González	1745	34711
La Prieta		1030	
LaLa		2080	
Los Partidores		4431	
El Tropezón		9015	
Las Tres G		11365	
G5		4503	
La Cañada		542	
El Parreño	El Carmen	1128	1128

Villafina	García	4320	4320		
Las Tórtolas	Gral. Terán	1900	2804		
Carmen 4		904			
1° de Marzo	Gral. Zuazua	2229	24899		
La Pila		1809			
Los Caballos		950			
El Castellón		2166			
La Ponderosa		4506			
Las Palmas		1806			
El Machaco		3614			
Santa Teresita		3231			
San Juan		2890			
San Francisco		1698			
Rancho Nido		Juárez		1445	3697
Carmen - Jes	1247				
Santa Isabel	1005				
El Suspiro	Los Ramones	543	4043		
Los Cochinitos		2501			
Rancho Nuevo		455			
San Fernando		544			
Campus Marín	Marín	364	1573		
Lucero		800			
El Consuelo		409			
El Arco	Mina	1181	773		
Palo Alto	Montemorelos	1355	14114		
El Charco		987			
Crianza Porcina Guira		270			
Elizabeth		2713			
El Milagro		4960			
Tanguma		2023			
Los Tres Cochinitos		1806			
El Aguacate		994			
La Purísima	Pesquería	500	12693		
La Camisa		778			
Granja 83		8118			
PRYCA		2303			
San Pablo		2258			
San Gerardo	Sabinas Hidalgo	363	6595		
San Isidro		1808			
San Javier		2166			
La Victoria		1346			
El Mayab	Salinas Victoria	949	13074		
A L		1088			
Mariana		4134			
Picachos		2890			
Margo		2079			
La Golondrina		588			
El Palmar I		Santa Catarina		2573	2573
TOTAL DE GRANJAS		86		TOTAL DE ANIMALES	231407

ANEXO 2

2.1.- Técnica de extracción de RNA

Previa a la prueba de RT-PCR se requiere de la purificación del ARN y la calidad del templado es uno de los factores determinantes más importante de la reproducibilidad y la relevancia biológica de los resultados del RT-PCR. El ARN es extremadamente delicado una vez retirado de su entorno celular, por lo que su depuración es mucho más complicada que la del ADN y un templado adecuado para la inclusión en el RT-PCR debe ser de alta calidad, libre de ADN y nucleasas (Bustin y Nolan, 2004).

El paso inicial en el proceso de RT-PCR es la producción de una copia de ADN complementario (ADNc) del ARN de interés a través de la acción de la enzima transcriptasa inversa o retro transcriptasa (RT) (Freeman y col., 1999).

Las enzimas RT comúnmente usadas son la del virus de mieloblastosis aviar (AMVRT), la del virus de leucemia murina Moloney o *Moloney leucemia murine virus* (MMLVRT), además de enzimas obtenidas por ingeniería que mejoran la actividad polimerasa y reducen la actividad RNAasa no deseada, y son comercializadas por diversos laboratorios (por ejemplo, Omniscript, PowerScript, StrataScript, SuperScript II, etc.) (Valasek y Repa, 2005).

Estas enzimas han sido utilizadas con éxito en RT-PCR (Dieffenbach y Dveksler, 2003). La síntesis de ADNc puede llevarse a cabo utilizando primers específicos, hexámeros al azar, oligo dT o una combinación de hexámeros al azar y oligo dT (Bustin y Mueller, 2005), y la elección de estos cebadores requiere una cuidadosa consideración.

El uso de primers específicos permite obtener ADNc específico y probablemente provee la mayor sensibilidad en pruebas cuantitativas. Para su utilización se requiere una cantidad abundante de RNAm blanco (Bustin y Mueller, 2005).

Los hexámeros al azar inician el RT en diversos puntos a lo largo de cada ARN templado produciendo más de un ADNc por cada RNAm presente; además la mayoría de ADNc deriva

de ARN ribosomal. Esto sobreestima la cantidad de RNAm inicial, lo cual afecta la cuantificación. Esto podría crear problemas si el RNAm de interés está presente en niveles bajos (Bustin y Mueller, 2005).

La síntesis de ADNc utilizando oligo dT es más específica que con hexámeros al azar y es la mejor opción cuando el objetivo es obtener una cantidad representativa de ADNc a partir de un pool de RNAm y también cuando la muestra de RNAm es limitada. Sin embargo, requiere de RNAm intacto, que no se fragmente o presente estructuras secundarias (Bustin y Mueller, 2005).

El uso de hexámeros al azar y oligo dT maximiza el número de moléculas de RNAm que se puede analizar desde una pequeña muestra de ARN (Bustin, 2000).

La prueba de RT-PCR se puede llevar a cabo en un formato de dos tubos o dos pasos (Two Step RT-PCR), en donde primero se lleva a cabo la transcripción inversa del ARN en ADNc, a continuación, una alícuota de la reacción de RT se utiliza para PCR. Esto ha hecho difícil utilizar procedimientos de control de contaminación basada en Uracil-N-glicosilasa (UNG),. Además, la manipulación extra y pipeteo se añaden a la variabilidad de los resultados. En los últimos años, se ha desarrollado y utilizado un sistema mejorado de RT-PCR en un tubo o un paso (One Step RT-PCR). Este método tiene la ventaja de ser un formato que se realiza en un solo tubo de reacción, es compatible con PCR en tiempo real y puede tolerar la inclusión de sistemas de control de contaminación (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

2.2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Posterior a la reacción de RT, el ADNc es amplificado por PCR. La técnica de PCR se realiza normalmente utilizando una alícuota de la reacción de RT o añadiendo los componentes necesarios de PCR directamente a la reacción de RT (Pfeffer y col., 1995).

El PCR utiliza ADN polimerasas para amplificar segmentos específicos de ADN utilizando pequeños oligonucleótidos de secuencia específica que actúan como primers o cebadores. La más utilizada es la enzima Taq polimerasa (de *Thermus aquaticus*) (Valasek y Repa, 2005).

La técnica de PCR es generalmente un proceso cíclico de tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión, con temperaturas que varían sujetas a una serie de consideraciones que deben determinarse empíricamente.

Desnaturalización. El ADN templado (cadena doble) es llevado a temperaturas altas (95° C por 5 minutos) para separar ambas hebras obteniendo cadenas simples (Valasek y Repa, 2005).

Hibridación. La temperatura desciende (alrededor de un minuto de 55-65° C, temperatura determinada por las características de los cebadores utilizados) para permitir a los cebadores unirse a las regiones complementarias en cada hebra del ADN templado (Valasek y Repa, 2005). Este paso representa un punto crítico, si la temperatura no es la óptima puede no darse la hibridación o pueden generarse productos inespecíficos. Comúnmente la temperatura de hibridación se calcula en unos 5° C menor a la temperatura de la fusión (T_m) de los cebadores (Rychlik y col., 1990).

Extensión. Por acción de la enzima ADN polimerasa se sintetiza una cadena ADN complementaria (a 72° C por alrededor de 30 segundos). La enzima lee la cadena molde y extiende los cebadores adicionando los nucleótidos complementarios (Valasek y Repa, 2005).

Extensión final. Al término del último ciclo. Los tubos se mantienen a 72° C durante 10-15 minutos, lo cual permitirá que todos los productos completen su extensión.

La reacción requiere de un control estricto de las concentraciones de Mg^{2+} y dNTPs, debido a que el Mg^{2+} influye en la actividad de la polimerasa así como una mezcla desbalanceada de dNTPs pueden afectarla (Eckert y Kunkel, 1991). El Mg^{2+} aumenta la temperatura de la fusión (T_m) del ADN de doble cadena y forma complejos solubles con dNTPs para producir el sustrato que la polimerasa reconoce. Las altas concentraciones de dNTPs interfieren con la actividad polimerasa y afectan la hibridación de los cebadores reduciendo el Mg^{2+} (Bustin, 2000).

Actualmente se pueden encontrar diversos kits comerciales que incluyen una solución tampón Master Mix que contiene concentraciones estandarizadas de los reactivos necesarios para el

desarrollo de la prueba, así como para su uso en pruebas en tiempo real que pueden utilizarse en los distintos equipos termocicladores (Bustin, 2002).

Tabla 2 Protocolo de Extracción de ARN. Método de Trizol

Paso	Procedimiento	FECHA
1.-	Pelet agregar 1 ml de trizol y re suspender (células: 6×10^6 cels; tejido: 50-100mg).	
2.-	Incubar a por 5 minutos a temperatura ambiente (15 a 30° C).	
3.-	Agregar 200 μ l de cloroformo grado molecular por cada ml de Trizol y mezclar.	
4.-	Incubar por espacio de 5 minutos a temperatura ambiente (15 a 30° C).	
5.-	Posterior mente se centrifuga por espacio de 10 minutos a 10,000 rpm.	
6.-	Posteriormente se transfiere la fase inorgánica o superior acuosa a otro tubo eppendorf.	
7.-	Se le agrega 0.5ml de alcohol isopropanol y se mezcla.	
8.-	Posteriormente se incuba por espacio de 5 minutos a temperatura ambiente (15 a 30° C).	
9.-	Trascurrido el tiempo se centrifuga por espacio de 10 minutos a 10,000 rpm.	
10.-	Retirar el alcohol teniendo cuidado con el concentrado.	
11.-	Se le agrega 1 ml de etanol al 75 % y se mezcla.	
12.-	Posteriormente se centrifuga por espacio de 5 minutos.	
13.-	Se centrifuga a 10,000 rpm durante 5 a 10 minutos.	
13.-	Retirar el alcohol y dejar secar sobre una toalla de papel a temperatura ambiente (15 a 30° C).	
14.-	Mantener a -70° C (se resuspende con 20 μ l de agua DDLEPC).	

1. Tomar una alícuota para determinar la absorbancia a 260 y 280 nm.

2.3.- La Purificación de Los productos de PCR

Para la purificación de los productos de PCR suelen contener restos de nucleótidos y de cebadores que interfieren en la secuenciación. Por este motivo, es necesario llevar a cabo un paso de purificación previa a la secuenciación de los productos de PCR.

Los productos de PCR pueden purificarse mediante el empleo de kits específicos o por precipitación con diferentes tipos de alcoholes

Tabla 3. Procedimiento para purificar muestra para secuenciador

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE MUESTRAS PARA SECUENCIACION	
1	Pipetear todo el contenido de cada reacción de la extensión depositarlo en una tubos para microcentrífuga de 1,5 ml. Para eliminar las reacciones que se producen en el Termociclador TC1 o ADN 480: Coloque la punta de la pipeta en el fondo de la reacción y retire con cuidado la reacción del aceite IMPORTANTE transferencia como el aceite de menos posible
2	Agregar una de las siguientes reactivos a cada tubo: 80 µl de alcohol isopropanol al 75% 20 µl de agua desionizada y 60 µl de alcohol isopropanol 100% La concentración de isopropanol final debe ser de $60 \pm 5\%$.
3	Cerrar los tubos y agitar brevemente por espacio de 1 minuto.
4	Dejar los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitar la amplificación de los productos. A veces la precipitación tarda menos de 15 minutos dando como resultado la pérdida de poco productos de amplificación. Si se da más de 24 horas aumenta la precipitación de productos no constituidas.
5	Colocar los tubos en una microcentrífuga y marcar sus orientaciones. Centrifugar los tubos por 20 minutos a velocidad máxima. Si fuera posible, deberá centrifugar los tubos durante 2 minutos más antes de realizar el siguiente paso.
6	Aspirar cuidadosamente el sobrenadante con la punta de la pipeta para cada muestra y descartarla. El Pellets puede ser visible o no puede ser. Los sobrenadantes se deben quitar por completo, debido a que los terminadores no incorporados se disuelven los colorantes en ellas.
7	Añadir a cada tubo 250 µl de isopropanol al 75% y agitar brevemente por espacio de 1 minuto.
8	Colocar los tubos en la microcentrífuga en la misma orientación que en el paso 5 y centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima.
9	Aspirar el sobrenadante con cuidado como en el paso 6.
10	Las muestras a secan en una centrífuga de vacío durante 10-15 minutos o hasta sequedad. (Como alternativa, coloque los tubos con las tapas abiertas en un bloque de calor o en el termociclador 90° C durante 1 minuto.)

2.4 Protocolo de Secuenciación para VHE

Se debe de cuantificar la cantidad de ADN purificado mediante la medición de la absorbancia a 260 nm o por algún otro método. Total = 40 X Abs 260 X factor de dilución = $\mu\text{gRNA}/\mu\text{l}$

Para secuenciar la cantidad necesaria de producto de PCR a utilizar se deberá tomar en cuenta el tamaño del producto de acuerdo a las recomendaciones de la siguiente tabla, según lo que recomienda el manual de secuenciación ABI PRISMA

Tabla 5. Recomendaciones de rangos de cantidad de ADN de plantilla para cada Química

Ciclo de Química de Secuenciación					
Producto de PCR:	Rodamina Dye Terminator	dRhodamine Terminator	BigDye Terminator	Fluoresceína / Rodamina	Primer colorante del BigDye Cebador
100-200 pb	3.1 ng	1.3 ng	1.3 ng	2.5 ng	2.5 ng
200-500 pb	3-10 ng	3-10 ng	3-10 ng	5-10 ng	5-10 ng
500-1000 pb	5-20 ng	5-20 ng	5-20 ng	10-20ng	10-20 ng
1000-2000 pb	10-40 ng	10-40 ng	10-40 ng	20-50 ng	20-50 ng
> 2000 pb	40-100 ng	40-100 ng	40 a 100 ng	50-150 ng	50-150 ng
monocatenario	100-250 ng0	50-100 ng	50-100 ng	150-300 ng	150-400 ng
doble cadena	200-500 ng	200-500 ng	200-500 ng	300-600 ng	200-800 ng

2.5.- Descripción de cómo preparar y llevar a cabo las reacciones del ciclo para la secuenciación

Para la realización de la secuenciación automática del DNA mediante electroforesis capilar y utilizando el Kit Abi Prism bigDye Terminator v3.1 Sequencing kit (Applied Biosystems, EEUU). Todas las muestras deben ser purificadas con el fin de eliminar el ruido de fondo, tienen que producir un ADN libre de ARN, fenol, sales, etanol, EDTA, proteínas, etc.

Tabla 6 Para preparar las mezclas para lleva acabo la reacción se utiliza M13, plásmidos, y Productos de PCR:

Los procedimientos de secuenciación del ciclo de terminadores BigDye		
paso	Para cada reacción, añadir los siguientes reactivos a cada uno de los tubo por separado	
1	Reactivo	Cantidad
	Agregar de la mezcla de terminator Mix	8.0 µl
	lista	
	Único estándar de DNA	100ng
	Doble estándar de DNA	200-500ng
	Producto de PCR de DNA	100ng
	Cebador	3.2 pmol
	Agua desionizada	q.s.
	Volumen total	20 µl
2	Mezclar bien y girar brevemente	
3	si se utilizo el termociclador de ADN (TC1) o DNA Termociclador 480	
	superponer la mezcla de reacción con 40 µl de aceite mineral ligero	

2.6 Protocolos para la eliminación de los terminadores no incorporados

Hay una gran variedad de protocolos que resultan eficientes para eliminar los terminadores de reacción no incorporados. La elección de uno u otro protocolo dependerá esencialmente del tipo de marcaje de la molécula terminadora (tipo de química empleada), de las características del segmento analizado y del tipo de secuenciador empleado para el análisis. La mayoría de estos protocolos se basan en la precipitación de los productos de extensión mediante algún solvente químico como el etanol, sólo o combinado con algunas sales, y la posterior eliminación de aquellos terminadores no incorporados mediante lavados con etanol al 70%. Estos protocolos presentan una eficiencia óptima de eliminación de los terminadores de reacción no incorporados.

Tabla 7 Purificación de muestras para precipitar con Etanol / Acetato de Sodio para secuenciar Usar etanol al 95% en lugar de absoluto

PROTOCOLO DE PURIFICACION DE MUESTRA DE PCR	
1	Pipetear todo el contenido de cada reacción de extensión y depositarlo en una tubo para microcentrífuga de 1,5 ml.
2	Colocarle a cada tubo de 1.5 ml 20 µl de acetato de Na al 3M con un ph 4.6. Agregar a cada tubo 50 µl de Etanol al 95%
3	En un tubo colocar el positivo (pGEM-3Z +) y en otros tubos colocar los diferentes producto
4	Cerrar los tubos y agitar brevemente por espacio de 1 minuto.
5	Deja los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitar la amplificación los productos. Nota a veces se precipita en menos de 15 minutos como resultado de pérdida de productos de extensión. Tiempos de precipitación de 24 horas aumenta la precipitación de productos
6	Colocar los tubos en una microcentrífuga y marcar sus orientaciones y centrifugar los tubos por 20 minutos a velocidad máxima (14,000 rpm).
7	Aspirar cuidadosamente el sobrenadante con una micro pipeta a cada muestra y descartarlo. El Pellets puede o no puede ser visible.
8	Añadir a cada tubo 250 µl de metanol 70% y agitar brevemente en un vortex por 1 minuto.
9	Colocar los tubos en la microcentrífuga en la misma orientación que en el paso 6 y centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima.
10	Aspirar el sobrenadante con cuidado como en el paso 7.
11	Las muestras se secan durante 10-15 minutos o hasta sequedad. (Como alternativa, coloque los tubos con las tapas abiertas en un bloque de calor o en el termociclador 90° C durante 1 minuto. Si no tiene otra opción)
12	Guardar el pellet a una temperatura de -20° C para su posterior realización o se re-suspender el pellet con formamida (20 µl)
13	Incubar por 2 minutos a 95° C
14	Colocarlo en Hielo el tubo de secuenciación y colocar 10 µl del purificado
15	Ponerlo en el secuenciador

La Purificación de Los productos de PCR suelen contener restos de nucleótidos y de cebadores que interfieren en la secuenciación. Por este motivo, es necesario llevar a cabo un paso de purificación previa a la secuenciación de los productos de PCR. Los productos de PCR pueden purificarse mediante el empleo de kits específicos o por precipitación con etanol /Acetato de sodio.

Tabla 8 Purificación de muestras para precipitar con Etanol / Acetato de Sodio para secuenciar Usar etanol al 95% en lugar de absoluto

PROTOCOLO DE PURIFICACION DE MUESTRA	
1	Pipetar todo el contenido de cada reacción de extensión en una microcentrífuga de 1,5 ml tubo.
2	Colocar en tubo de 1.5 ml Agregar 20 µl de acetato de Na al 3M con un ph 4.6 a cada tubo Agregar 50 µl de Etanol al 95%
3	En un tubo colocar el positivo (pGEM-3Z +) En otros tubos colocar los diferentes producto
4	Cerrar los tubos y agitar brevemente.
5	Deja los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitar la amplificación los productos. Nota a veces se precipita en menos de 15 minutos como resultado de pérdida de productos de extensión. Tiempos de precipitación de 24 horas aumenta la precipitación de productos
6	Colocar los tubos en una microcentrífuga y marcar sus orientaciones. Centrifugar los tubos por 20 minutos a velocidad máxima (14,000 rpm).
7	Aspirar cuidadosamente el sobrenadante con una punta de la pipeta para cada muestra y descarte. El Pellets puede o no puede ser visible.
8	Añadir 250 µl de metanol 70% a los tubos y agitar brevemente en un vortex por 1 minuto.
9	Colocar los tubos en la microcentrífuga en la misma orientación que en el paso 6 y centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima.
10	Aspirar el sobrenadante con cuidado como en el paso 7.
11	Las muestras se secan durante 10-15 minutos o hasta sequedad. (Como alternativa, coloque los tubos con las tapas abiertas en un bloque de calor o en el termociclador 90° C durante 1 minuto. Si no tiene otra opción)
12	Guardar el pellet a -20° C para su posterior realización o re-suspender el pellet con formamida (20 µl)
13	Incubar por 2 minutos a 95° C
14	Colocarlo en Hielo un tubo de secuenciación y colocar 10 µl del purificado
15	Ponerlo en el secuenciador

2.7.- Recomendaciones para perpetrar el kit ABI PRISM bigDye Terminator v3.1 secuenciación

Contenido del kit.

Cycle Sequencing mix

pGEM-3Z (+) ADN control de la prueba 0.2 µg/µl

21 M13 control del cebador delantero, 0.8 pmol/µl

Para secuenciar la cantidad necesaria de producto de PCR a utilizar se deberá tomar en cuenta el tamaño del producto de acuerdo a las recomendaciones de la siguiente tabla, según lo que recomienda el manual de secuenciación ABI PRISMA

Tabla 9. Recomendaciones de rangos de cantidad de ADN de plantilla para cada Química

Ciclo de Química de Secuenciación					
Producto de PCR:	Rodamina Dye Terminator	dRhodamine Terminator	BigDye Terminator	Fluoresceína / Rodamina	Primer colorante del BigDye Cebador
100-200 pb	3.1 ng	1.3 ng	1.3 ng	2.5 ng	2.5 ng
200-500 pb	3-10 ng	3-10 ng	3-10 ng	5-10 ng	5-10 ng
500-1000 pb	5-20 ng	5-20 ng	5-20 ng	10-20ng	10-20 ng
1000-2000 pb	10-40 ng	10-40 ng	10-40 ng	20-50 ng	20-50 ng
> 2000 pb	40-100 ng	40-100 ng	40 a 100 ng	50-150 ng	50-150 ng
monocatenario	100-250 ng	50-100 ng	50-100 ng	150-300 ng	150-400 ng
doble cadena	200-500 ng	200-500 ng	200-500 ng	300-600 ng	200-800 ng
cósmido, BAC	0.5-2,0 µg	no recomendada	0.5-1.0 µg	0.5-2.0 µg	0.5-1.0 µg
genómica bacteriana ADN	no se recomienda	no se recomienda	2-3 µg	no se recomienda	no se recomienda

ANEXO 3

Municipios del Estado de Nuevo León donde se encontraron las muestras positivas a la presencia de hepatitis E y donde se resaltan los municipios en las cuales se encontró la amplificación de 212 pb del virus de la hepatitis E en los tres tipos de muestras, que son hígados de cerdos obtenidos en el rastro TIF, muestras de heces obtenidas en granjas de cerdos y hígados comprados en puntos de ventas.

Tabla 10 Municipios positivos a la amplificación de 212 pb del virus de la hepatitis E del Estado de Nuevo León

Municipios Muestreados			
Municipios	Municipio + en Rastros	Municipio + en granjas de cerdos (heces)	Municipio + Hígados comprados en carnicerías
Allende	+	+	+
Apodaca			
Cadereyta Jiménez	+	+	+
Cerralvo			
Ciénega de Flores	+	+	+
Dr. Coss			
Dr. Gonzales	+	+	
El Carmen			
Escobedo	+		
Garza García			
General Treviño			
General Zuazua	+	+	
Juárez	+		
Los Ramones	+		
Marín			
Mina			
Montemorelos	+	+	+
Pesquería	+	+	
Sabinas Hidalgo			
Salinas Victoria	+	+	+
Santa Catarina	+		

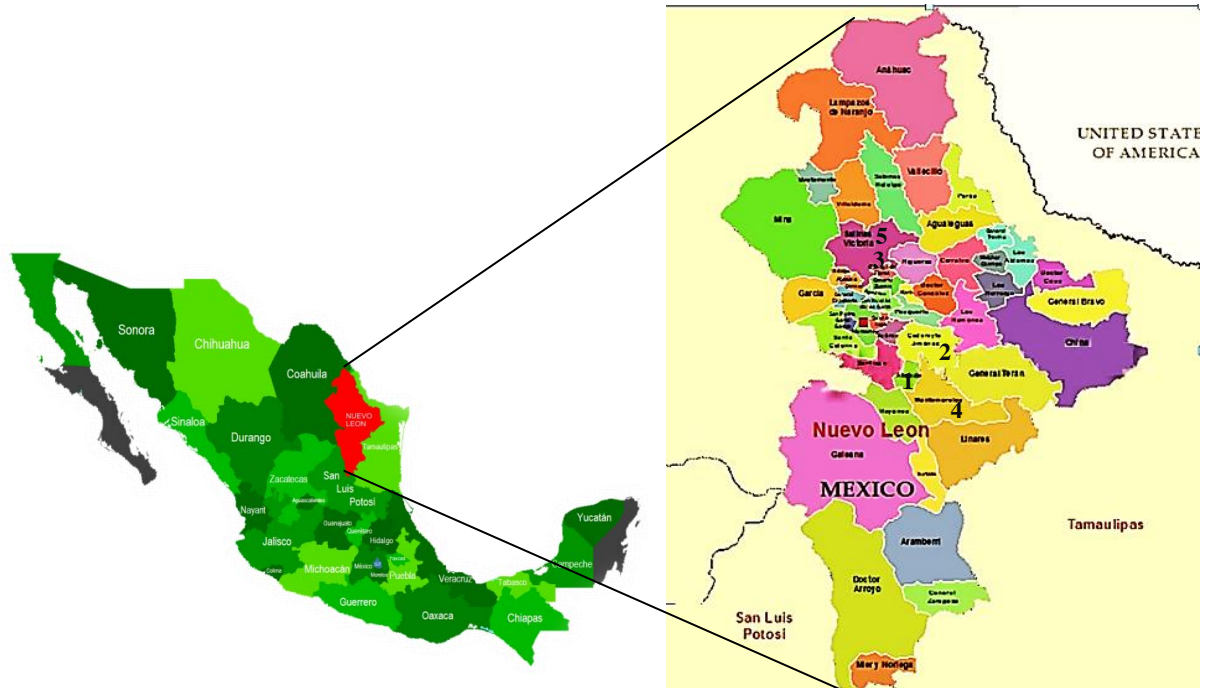


Figura 1. Se muestran los Municipios (1.- Allende, 2.- Cadereyta Jiménez, 3.- Ciénega de Flores, 4.- Montemorelos, 5.- Salinas Victoria) donde coinciden los positivos de las muestras de hígado tanto del rastro como en puntos de venta, carnicerías y granjas de cerdos, del virus de la hepatitis E en el Estado de Nuevo León

ANEXO 4

Alineación de secuencias de las cepas de HEV reportadas en el banco de genes con las secuencias sw7NLMx, sw9NLMx, sw5NLMx, sw8NLMx-1, sw4NLMx-1 obtenidas en el presente estudio.

Las secuencias de los nucleótidos obtenidas en el presente trabajo junto con las secuencias respectivas de distintos genotipos selectos de la familia *Hepeviridae* se muestran para realizar los estudios de comparación, en todos los casos se excluyeron las secuencias de nucleótidos que corresponden a las secuencias de los oligonucleótidos usadas en la amplificación de esa parte del genoma del HEV.

D11092	-CCTCGAACTTGAGTTCG-CAACCTCACCCCGGTAATACCAACGCGGGTCTCCGTTACTCCAGCACTGCCGTCA	78
M73218	-CCTTGAGCTTGAGTTTCG-CAACCTTACCCCGGTAACACCAATACGCGGGTCTCCGTTATCCAGCACTGCTCGCCA	78
M74506	-CTTAGAGCTTGAGTTTCG-CAATCTCACACCTGTAACACCAATACACGTGTGTCCCGTTACTCCAGCACTGCTCGTCA	78
sw7NLMx	-ATTGAGCTTGAGTTTAG-AAATTTGACACCCGGGAACACTAACACCCGTTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
AB094209	-ATTAGAGCTTGAGTTTAG-AAATTTGACACCCGGGAACACTAACACCCGTTTCCAGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
AB094206	-ATTAGAGCTTGAGTTTAG-AAATTTGACACCCGGGAACACTAACACCCGTTTCCAGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
sw9NLMx	-ATTAGAGCTTGAAATTTAG-AAATCTGACACCCGGGAACACAAACACCCGTTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGTCA	78
AB67095	-ATTAGAGCTTGAAATTTAG-AAATCTGACACCCGGGAACACAAACACCCGTTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGTCA	78
DQ832266	-ATTAGAGCTTGAGTTTAG-AAATTTGACACCCGGGAACACTAATACCCGTTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
AB089824	-ATTAGAGCTTGAAATTTAG-AAATTTGACACCCGGGAACACTAACACCCGTTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGTCA	78
sw5NLMx	-ATTAGAGCTTGAAATTTAG-AAATTTGACACCTGGGAACACTAATACCCGCTCTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
AF466683	-ACTAGAGCTTGAAATTTAG-AAATTTGACACCCGGGAACACTAACACCCGCTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
AF082843	-ATTAGAGCTTGAAATTTAG-AAATTTGACACCCGGGAACACTAACACCCGTTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
AF466659	-ATTAGAGCTTGAAATTTAG-AAATTTGACACCTGGGAACACTAACACCCGTTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
AF060669	-ACTAGAGCTTGAAATTTAG-GAATTTGACACCCGGGAACACTAACACCCGTTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
EF491206	-CTTGAGCTTGAGTTTAG-GAATCTGACACCCGGGAACACTAACACCCGCTTCCCGGTATACAAGCACAGCCCGCCA	78
AB301710	-ATTAGAGCTTGAAATTTAG-GAATTTGACACCCGGGAACACTAACACCCGCTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
FJ906895	-GCTTGAGTTGAATTTCCG-GAATCTGACTCCAGGGAACACTAACACACGCGTCTCCCGTTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
AJ272108	-ACTTGAGCTTGAGTTTCG-CAATTTGACACCTGGTAACACCAATACGCGCGTTTCCCGTTATCCAGTAGCGCGGCTCA	78
AB097811	-ACTTGAACCTTGAGTTTCG-CAATTTGACACCCGGTAACACGAATACGCGCGTTTCCCGTTATCCAGTAGCGCGGCTCA	78
AB573435	-CCTTGAACCTGGAGTTTCG-TAATCTGACACCTGGGAACACTAACACCCGTTTCCCGGTATACCAGCACAGCCCGCCA	78
AY043166	-CATAAAGTTACAGCTAAG-GAATTTGTCGCCCGGTAATACAAATGCCAGGGTACCCCGTGTGAAGGTGACGGCCCCACA	78
AB602441	-ACTTGAGCTTGAGTTTCG-TAATTTGACACCTGGGAACACTAACACCCGTTTCCCGTTATACAAGCACTGCTCGCCA	78
KJ496143	-CCTTGAGCTTGAGTTTCG-TAATCTTACACCTGGGAACACTAATACCCGCTTCCCGCTATTCTAGTACTGCTCGCCA	78
GU345042	GGTCTGTTT--AATATTGCAGATACCTGTTGGGAGGGCTTCGACGGACCTGGTGTCTAATGCTGGAGGGCAGCTGTT	78
JQ001749	-GTTTGATTCTGAATGTGGCTGATAGTTTGTGGGGAATATACCACTACCTATTTTATCCCTCGTGGTGGGCGACTTTT	79
AY535004	--TTTGGCTGCGCCGAGCACCATGATGGTGAATTAATTTGATCACTGGTGTGCGCGCCCGCCGATCAAGTCA	71
sw8NLMx-1	--ACTTCCACTGATGTTAGGATATTGGTACAGCCCGTATTGCTTCCGAGTTAGTCACTCCCTAGTGAGCGCCTCCA	74
sw4NLMx-1	-ACTCCACTGATGTTAGGATATTGGTACAGCCCGTATTGCTTCCGAGTTAGTCACTCCCTAGTGAGCGCCTTCA	74
swFJ617438	-ACTTCCACTGATGTTAGGATATTGGTACAGCCCGTATTGCTTCCGAGTTAGTCACTCCCTAGTGAGCGCCTTCA	74
D11092	CCGCTTCGTCGCGGTGCGAGTGGGACTGCCGAGCTTACCACCACGGCTGCTACCCGCTTCATGAAGGACCTCTATTT--	156
M73218	CCGCTTCGTCGCGGTGCGGACGGGACTGCCGAGCTACCACCACGGCTGCTACCCGCTTATGAAGGACCTCTATTT--	156
M74506	CTCGCCCGA---GGGGCCGACGGGACTGCGGAGCTGACCACAACGCAGCCACCAGGTTTCATGAAGATCTCCACTT--	153
sw7NLMx	TCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATCTGCATTT--	156
AB094209	TCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATCTGCATTT--	156
AB094206	TCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATCTGCATTT--	156
sw9NLMx	TCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATCTGCATTT--	156
AB67095	CCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATCTGCATTT--	156
DQ832266	CCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATCTGCATTT--	156
AB089824	CCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATTTGCATTT--	156
sw5NLMx	TCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATCTGCATTT--	156
AF466683	CCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATTTGCATTT--	156
AF082843	CCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACCACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATCTGCATTT--	156
AF466659	CCGGCTGCGCCGCGGCTGATGGGACCCTGAGCTTACTACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGATTTGCATTT--	156
AF060669	CCGGCTGCGCCGCTGGTGTGATGGGACTGCTGAGCTTACTACCACAGCAGCCACACGTTTTCATGAAGGACCTGCATTT--	156
EF491206	CCGGCTGCGTCTGGCGCTGATGGTACCGCCGAGCTTACCACCACGGCGGCTACGCGTTTTCATGAAGGACCTGCATTT--	156
AB301710	TCGGCTGCGCCGCGGCTGCGGACGGGACTGCTGAGCTTACTACTACAGCGCCACGCGTTTTCATGAAGGACTTGCATTT--	156
FJ906895	CCGCTGCGCCGCTGGCGGCTGGAACCGCGAECTCAACTACGGCGGCCACACGTTTTCATGAAGGACCTCCACTT--	156

AJ272108	CAAAGCTACGTCGTTGGCCGACGGTACTGCTGAGTTGACTACTACTGCCGCCACACGTTTTATGAAAGACCTCCATTT--	156
AB097811	CAAGCTACGTCGTTGGCCGACGGTACTGCTGAGCTAACCACCCTGCTGCTACACGGTTTATGAAAGATCTTCACTT--	156
AB573435	TAGGCTACACCGTGGCCGCTGATGGAACCGCAGAATTGACCACTACTGCAGCCACACGGTTTTATGAAAGGATCTAYACTT--	156
AY043166	TACCATCAAGGCTGACCCATCTGGTGTACC-A--TAACAACAGCAGCTGCCGCCAGGTTTTATGGCGGATGTGCGTTGGG	155
AB602441	CCGCCTGCCGGGGGGGCTGACGGCACGGCTGAGTTGACAACCACCGCAGCCACACGGTTCATGAAGGATTTATACTT--	156
KJ496143	TCGCCTTAAGCGTGGTGTGACGGCACAGCTGTTTTAACTACTACAGCGGCCACTAGGTTTTATGAAAGGATCTGCATTT--	156
AY535004	CTGGACGAAGGCAACAGTGGATGGGTCCAGGTGAAGACTGTCGATGCTAGTTCTGGGAGTAATAGGTTTGCAGCGTT--	149
sw8NLMx-1	TTACCGTAATC---AAGGCTGGCGCTCTGTTGTGACTACGGGCGTGGTTGAAGAGGAGGCTACCT--CCGGCCTGGTAAT	149
sw4NLMex-1	TTACCGTAATC---AAGGCTGGCGCTCTGTTGTGACTACGGGCGTGG-----AGGAGGCTACTT--CCGGCCTGGTAAT	143
swFJ617438	CTACCGTAATC---AAGGCTGGCGCTCTGTTGAGACTACGGGCGTGGCTGAAGAGGAGGCTACTT--CCGGCCTGGTAAT	149
GU345042	TTACGGCCGCCCTCAGGTGTCTGAGAACGGTGAGCCCTCTGTCAAATC---TACACCTCTGTTGAGGCCGCCCAATTAG	155
JQ001749	ATATGGGAAGCCAGTGACCTCATCCAATGGTGAGCCTACAGTCTGCTT---TATGGGTCTGTTGAGCAGGCTCAGCTTG	156
D11092	-TACTAGTACTAATGGT	172
M73218	-TACTAGTACTAATGGT	172
M74506	-TACCGCCTTAATGGG	169
sw7NLMX	-TACTGGCACTAATGGC	172
AB094209	-TACTGGCACGAACGGC	172
AB094206	-TACTGGCACGAATGGC	172
sw9NLMx	-TACTGGCACGAATGGT	172
AB67095	-TACTGGCACGAATGGT	172
DQ832266	-TACTGGTACGAACAGC	172
AB089824	-TACTGGCACGAACGGT	172
sw5NLMx	-TACTGGCACGAACGGG	172
AF466683	-CACTGGCACGAACGGT	172
AF082843	-CACCGGCACGAACGGC	172
AF466659	-TACTGGCACGAATGGC	172
AF060669	-CGCTGGCACGAATGGC	172
EF491206	-CACTGGTACGAACGGA	172
AB301710	-CACCGGTACGAATGGA	172
FJ906895	-CACTGGGATGAACGGG	172
AJ272108	-TACGGGGACTAATGGT	172
AB097811	-CACAGGGACCAATGGT	172
AB573435	-CACTGGGTCTAATGGG	172
AY043166	GCTTGGGCACTGCTGAG	172
AB602441	-CACTGGTTCAAACGGG	172
KJ496143	-TACTGGTATGAATGGT	172
AY535004	-ACCTGCATTTGGAAAGCCAGCTGTGTGGGG	179
sw8NLMx-1	-GCTTTGCATTCATGGCTCTCCTGTT	174
sw4NLMex-1	-GCTTTGCATTCATGGCTCTCCTGTTAATTCC	174
swFJ617438	-GCTTTGCATTCATGGCTCTCCTGTT	174
GU345042	-ACCAAGGTGTGACAATAC	173
JQ001749	-ACAAACCACTGCAGATTC	174

El alineamiento fue realizado con el programa ClustaW (Thompson et al., 1994) (Slow/Accurate, IUB) contenido en los programas de MegAlign del paquete de bioinformática de DNASTAR® y editado manualmente.

AEXO 5

Se mandó un artículo a la revista Salud Pública de México, que es una revista bimestral e interdisciplinaria editada por el Instituto Nacional de Salud Pública INSP. El propósito general de la publicación es disseminar informaciones sobre salud pública, entendida como la aplicación de las ciencias biológicas, sociales, clínicas y de la conducta para el entendimiento de los problemas de salud de la población, así como la identificación de las necesidades de salud y la organización de servicios integrados

Salud Pública de México

Versión impresa ISSN 0036-3634

Salud Pública Méx vol.55 no.2 Cuernavaca mar./abr. 2013

ARTÍCULO BREVE

Detección molecular del virus de la hepatitis E en hígados de cerdo destinados al consumo humano en el estado de Nuevo León, México

Molecular detection of hepatitis E virus in pig livers destined for human consumption in the state of Nuevo Leon, Mexico

Marco Antonio Cantú-Martínez, M en C^I; Artur Xavier Roig-Sagués, D en C^{II}; Sibilina Cedillo-Rosales, D en C^I; Diana Elisa Zamora-Ávila, D en C^I; Ramiro Ávalos-Ramírez, D en C^I

^IDepartamento de Virología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México

^{II}Fac. de Veterinaria, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España

Autor de correspondencia

Detección molecular del virus de la hepatitis E en hígados de cerdo destinados al consumo humano en el estado de Nuevo León, México

Marco Antonio Cantú-Martínez, M en C,⁽¹⁾ Artur Xavier Roig-Sagués, D en C,⁽²⁾ Sibilina Cedillo-Rosales, D en C,⁽¹⁾
Diana Elisa Zamora-Ávila, D en C,⁽¹⁾ Ramiro Ávalos-Ramírez, D en C,⁽¹⁾

Cantú-Martínez MA, Roig-Sagués AX, Cedillo-Rosales S, Zamora-Ávila DE, Ávalos-Ramírez R. Detección molecular del virus de la hepatitis E en hígados de cerdo destinados al consumo humano en el estado de Nuevo León, México. *Salud Pública Mex* 2013; 55: 193-195.

Resumen

Objetivo. Detección molecular del virus de la hepatitis E (VHE) en hígado de cerdo para consumo humano en Nuevo León, México. **Material y métodos.** Se analizaron 127 hígados de cerdo (87 obtenidos de rastros TIF, y 40 de carnicerías) mediante RT-PCR semianidado para amplificar un fragmento de 212 pb del gen ORF2 del VHE. **Resultados.** El 19.5% (17) de los hígados de rastros y 22.5% (9) de carnicerías fueron positivos. La secuenciación mostró 94-95% de homología con el genotipo 3. **Conclusiones.** Los resultados indican que el VHE circula en granjas porcinas del estado, lo que constituye una probable fuente de contaminación para los productos cárnicos porcinos.

Palabras clave: hepatitis E; VHE; hígados de cerdo; México

Cantú-Martínez MA, Roig-Sagués AX, Cedillo-Rosales S, Zamora-Ávila DE, Ávalos-Ramírez R. Molecular detection of hepatitis E virus in pig livers destined for human consumption in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Salud Pública Mex* 2013; 55: 193-195.

Abstract

Objective. Molecular detection of HEV in pig livers destined for human consumption in Nuevo Leon, Mexico. **Materials and methods.** 87 livers were collected from pigs slaughtered in TIF and 40 livers from butchers. A 212 pb fragment of HEV ORF2 gene was amplified by semi-nested RT-PCR. **Results.** 19.54% (17) of tifs and 22.5% (9) of butcher's livers were positive for HEV. Sequencing of the amplified products showed a 94%-95% homology with the sequences reported for genotype 3. **Conclusions.** Our results indicate that HEV is circulating in swine herds in the state, constituting a probable source of contamination of pig meat products.

Keywords: hepatitis E; HEV; pork livers; Mexico

(1) Departamento de Virología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.
(2) Fac. de Veterinaria, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.

Fecha de recibido: 25 de junio de 2012 • Fecha de aceptado: 6 de diciembre de 2012
Autor de correspondencia: Dr. Ramiro Ávalos Ramírez, Departamento de Virología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Francisco Villa s/n, col. Ex Hacienda el Canadá Escobedo, 66050 Nuevo León, México.
Correo electrónico: razavara@hotmail.com

El virus de la hepatitis E (VHE) es uno de los cinco virus hepatotropos que afectan a humanos y se ha reconocido recientemente en varios países. El VHE causa la hepatitis E, la cual se considera una zoonosis emergente que se transmite esencialmente mediante la ruta fecal-oral y su presentación clínica va desde la forma asintomática hasta la falla hepática fulminante (FHF).¹ A nivel mundial, se han identificado cuatro genotipos del VHE. Los genotipos 1 y 2 se han encontrado exclusivamente en humanos y los genotipos 3 y 4 se han identificado en cerdos y otros animales en distintos países.²

Para el genotipo 3, encontrado en humanos y animales domésticos en zonas consideradas no endémicas, se considera al cerdo como el principal reservorio en la naturaleza y fuente primaria directa o indirecta de la infección hacia el humano.³ En 1997, Meng y colaboradores identificaron una nueva cepa porcina genética y serológicamente relacionada con cepas humanas en los Estados Unidos,⁴ lo que sugiere la posibilidad de infecciones humanas con cepas porcinas. En cifras oficiales en Nuevo León, en el periodo 2000 a 2007, se reportaron hasta 50% de casos de hepatitis en humanos por causas desconocidas.⁵ Debido a que nuestro país no cuenta con pruebas de diagnóstico serológico para el VHE, no se puede asegurar si dentro de estos casos se encuentre involucrado este virus. El objetivo de este trabajo es detectar mediante RT-PCR semianidado el VHE en muestras de hígados de cerdos destinados al consumo humano en el estado de Nuevo León, México.

Material y métodos

Durante 2010 y 2011 se recolectaron un total de 87 hígados de cerdos de un rastro tipo TIF de Nuevo León. Los animales procedían de 24 granjas porcinas de 11 municipios conurbados al área metropolitana de Monterrey. Además, se incluyeron 40 hígados de centros de venta de 10 diferentes municipios de la misma área. Se obtuvo el ARN total de cada una de las muestras por el método de TRIzol Reagent. La síntesis del ADN complementario y RT-PCR semianidado se realizó utilizando un estuche comercial (Superscript III One-Step) para amplificar un fragmento de 212 pb del gen ORF 2 del VHE, utilizando los iniciadores recomendados por Martín y colaboradores.⁶ La amplificación se realizó en un termociclador con 35 ciclos (desnaturalización 94°C 50s, alineación 48°C 30s y amplificación a 72°C 60s) con incubación final a 72°C durante 7 minutos.⁴ Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se documentaron previa visualización bajo la luz UV del transiluminador. Las amplificaciones de 15

muestras positivas se purificaron a partir de los geles de agarosa utilizando el estuche "Purelink Quik gel Extracción", acorde a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, dos de los productos amplificados se secuenciaron en un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer AB utilizando el estuche ABI PRISM bigDye Terminator v3.1 Sequencing kit y se analizaron con el software DNASTar lasergene 10. Las secuencias resultantes se analizaron para buscar homología con las secuencias reportadas del VHE en el GenBank. El protocolo científico y ético del estudio fue aprobado por la subdirección de posgrado de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Resultados

De las 87 muestras analizadas, 17 (19.5%) fueron positivas a la amplificación para VHE. Estas muestras provenían de 11 granjas distintas (figura 1 a, b). Una las muestras positivas, confirmada mediante secuenciación, fue utilizada como control positivo para los ensayos posteriores. De los 40 hígados de centros de venta de carne, 9 (22.5%) fueron positivos a VHE. Estos provenían de cuatro municipios del estado: Salinas Victoria, Cerralvo, Cadereyta Jiménez y Montemorelos (figura 2 a, b). Las secuencias detectadas pertenecen al genotipo 3 y muestran 94% de homología con la reportada en cerdos por Huang FF y colaboradores en EUA en 2002 (AF466664.1)⁷ y con la reportada por Takahashi M.

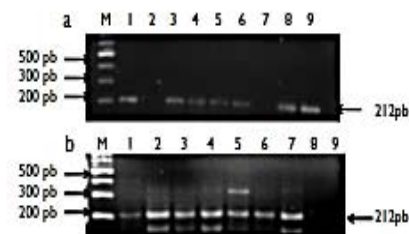


FIGURA 1 A y B. AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN ORF DE VHE DE HÍGADOS PROVENIENTES DE RASTROS. A) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5 % TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100 PB, CARRIL 1: CONTROL POSITIVO, CARRIL 2: CONTROL NEGATIVO, CARRILES 3-9: MUESTRAS DE HÍGADOS. B) M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100PB, CARRIL 1: CONTROL POSITIVO, CARRILES 2-7: MUESTRAS DE HÍGADOS, CARRIL 8: CONTROL NEGATIVO

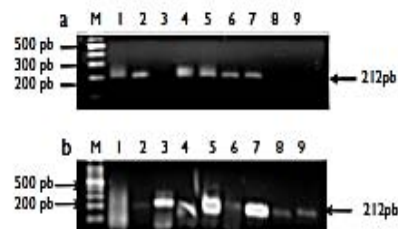


FIGURA 2 A Y B. AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN ORF DE VHE DE HIGADOS PROVENIENTES DE CARNICERÍAS. A) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5 % TENIDO CON BROMURO DE ETIDIO. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100PB, CARRILES 1 Y 2: CONTROLES POSITIVOS, CARRIL 3: CONTROL NEGATIVO, CARRILES 4-9 MUESTRAS DE HIGADOS. B) M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100PB, CARRIL 1: CONTROL NEGATIVO, CARRIL 2: CONTROL POSITIVO, CARRILES 3-9 MUESTRAS DE HIGADOS

colaboradores en 2003 (AB094209.1) para cepas porcinas. Es interesante resaltar que una de las secuencias detectadas mostró una homología mayor a 95% con una cepa del VHE reportada en 2008 en pacientes en Japón (AB360348.1).^{2,5}

Conclusión

Actualmente se ha demostrado que los porcuicultores y veterinarios que manejan cerdos tienen un mayor riesgo de infectarse con el VHE,^{9,10} y además, existen informes que asocian el consumo de hígado de cerdo o carne cruda con el desarrollo de hepatitis E.^{11,12} Nuestros resultados sugieren que existe la posibilidad de que los pacientes catalogados en nuestro país con hepatitis por causas desconocidas presenten una infección por VHE no reportada tal vez por falta de pruebas de diagnóstico específicas. Por otro lado, en EUA se ha reportado una secuencia parcial de una variante en humanos del VHE (VHE-US1) aislada de pacientes que sufrieron hepatitis viral aguda,^{13,14} generando evidencia de la presencia de nuevas cepas del virus en América del Norte diferente a las secuencias reportadas previamente para las cepas de EUA, Birmania y México. No se conoce el origen de estas nuevas cepas, sin embargo, existe la hipótesis de que sean de origen animal y que deberán existir varios reservorios potenciales del VHE.

Este es el primer estudio que aporta evidencia de la circulación del genotipo 3 de VHE en granjas porcinas, cerdos sacrificados en rastro y carnicerías de Nuevo

León. La presencia del virus puede constituir un factor de riesgo importante para la salud humana.

Deducción de conflicto de intereses: Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 2006;16:5-36. PMID: 16173650.
2. Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Ito T, Tsuda F, et al. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 2003;84:851-862. PMID: 12655086.
3. Halbur PG, Kasomdorkbua C, Gilbert C, Guenette D, Potters MB, Purcell RH, et al. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol* 2001;39:918-923. PMID: 11230404.
4. Meng X, Purcell J, Halbur RH, Lehman PG, Webb JR, Tsareva DM, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9860-9865. PMID: 9275216.
5. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA 1997. México: SUVIE/SSA, 2007.
6. Martín M, Segale's J, Huang FF, Guenette DK, Matzu E, de Deus N, et al. Association of hepatitis E virus (HVE) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Veterinary Microbiology* 2007;122:16-24. PMID: 17270366.
7. Huang FF, Hargreaves G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, 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. PMID: 11923352.
8. Takahashi M, Hoshino Y, Tanaka T, Takahashi H, Nishizawa T, Okamoto H. Production of monoclonal antibodies against hepatitis E virus capsid protein and evaluation of their neutralizing activity in a cell culture system. *Arch Virol* 2008;153(4):657-666. PMID: 18266052.
9. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A, et al. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis* 2001;184:1594-1597.
10. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, 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* 2001;40:117-122. PMID: 11773103.
11. 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;84:2351-2357. PMID: 12917455.
12. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiuro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362:371-373. PMID: 12907011.
13. Hsieh SY, Meng XJ, Wu YH, Liu ST, Tam AW, Lin DY, et al. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 1999;37:3828-3834. PMID: 10565892.
14. Kabrane-Lazizi Y, Zhang M, Purcell RH, Miller KD, Davey RT, Emerson SU. Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains. *J Gen Virol* 2001;82:1687-1693. PMID: 10463689.

*Todo gran proyecto, tiene un principio, pero con la continuidad se
llega al final, y es cuando se alcanza el verdadero conocimiento*

Monterrey, Nuevo León México a 04 de julio del 2016