

NA 718757

TE444

Deposito  
Tesis  
19/10

# Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal



## Estudio epidemiológico y caracterización genética del virus de la hepatitis E (VHE) en explotaciones porcinas

Tesis Doctoral presentada por la Licenciada D<sup>a</sup> Salceda Fernández-Barredo y del Amo para optar al grado de Doctor Europeo en Medicina Veterinaria.

Dirigida por:

Dra. Dña. M<sup>a</sup> Teresa Pérez Gracia

Dr. D. Ángel García Muñoz

Dr. D. Santiago Vega García

**VALENCIA**  
**2007**



**CEU**  
Biblioteca  
*Universidad Cardenal Herrera*

Registro  
Núm.: TE444  
Entrada día: 19 de nov. de 2007

Este trabajo se ha realizado gracias a la beca de FPDI de la Fundación CEU San Pablo que disfruta D<sup>a</sup> Salceda Fernández-Barredo y del Amo, y ha sido financiado por los proyectos UCH 02/26. 03/15 y 04/8 de la Universidad Cardenal Herrera-CEU así como por los proyectos de la Escuela Valenciana de Estudios de Salud (053/2005) y la Consellería de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana (GV05/132). La autora de esta Tesis Doctoral ha disfrutado de una beca a cargo de la Fundación CEU San Pablo para la realización de una estancia de tres meses en el Veterinary Laboratories Agency de Weybridge en el Reino Unido.

**A mis padres, por su apoyo**

**A Bernat, por aceptarme como soy**

**A todos los recuerdos, pero sobre  
todo a los olvidados. A ti, si no me  
recuerdas, para que recuerdes que  
yo no te olvido**

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Teresa Pérez Gracia su dedicación y apoyo incondicional desde el primer día de mi llegada a esta Universidad. Durante estos años, ha sido muchísimo más que una Directora de Tesis; no sólo me ha enseñado a disfrutar de la investigación, sino que es un claro ejemplo de que un excelente científico puede mostrar además una calidad humana y humildad incuestionables, tesoros escasos en estos tiempos.

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. D. Ángel García Muñoz sus sabios consejos, el compartir conmigo toda su amplia experiencia en el campo de las enfermedades infecciosas y todas las horas que le ha restado a su familia para que este trabajo salga adelante. Para mí es un honor que haya sido uno de mis directores de tesis, por no hablar de la suerte que he tenido de contar con él como compañero.

Me gustaría agradecer al Dr. D. Santiago Vega su inestimable colaboración, sin la cual no hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

A la Dra. Dña. Teresa Gómez Muñoz mil gracias por su amistad. Sin su influencia, ni siquiera me habría planteado comenzar una tesis doctoral, y sin sus consejos no habría podido terminarla. Su honestidad y objetividad son sólo algunas de las cualidades que me sirven de ejemplo cada día.

A Carol, porque ha compartido conmigo todas las alegrías y las tristezas durante estos cuatro años. Me siento muy afortunada de contar con ella como compañera de equipo y sobre todo, como amiga.

A Toni (Pepito), por su amistad y las risas que hemos compartido dentro y fuera de la Universidad, por no hablar de la muestra de sangre que con tanto sufrimiento ha donado para la ciencia.

A Jose Sansano, Maruxi, Marilena, Joaquín y Cristina, por todos los buenos ratos y el apoyo moral en los momentos difíciles. Hacen que sea fácil compartir un despacho tan concurrido como el nuestro.

A mi familia valenciana, por su apoyo y cariño. Sin ellos el camino hubiera sido mucho más duro.

Por último, quisiera agradecer a todos los alumnos a los que he impartido docencia durante estos cuatro años porque me han permitido descubrir lo gratificante y a la vez lo exigente que es la enseñanza.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. Historia natural de la hepatitis E	3
1.2. Estructura genómica del VHE	5
1.3. Clasificación y filogenia	9
1.4. Formas de presentación	15
1.4.1. Presentación epidémica	15
1.4.2. Presentación esporádica	17
1.5. Vías de transmisión	17
1.5.1. Transmisión fecal-oral	17
1.5.2. Transmisión vertical	18
1.5.3. Transmisión por contacto directo	19
1.5.4. Transmisión parenteral	20
1.5.5. Transmisión sexual	21
1.5.6. Transmisión por alimentos	21
1.6. Manifestaciones clínicas y marcadores de infección	21
1.7. Patogenia	26
1.8. Hospedadores	27
1.9. El VHE como agente zoonótico	28
1.10. Diagnóstico	31
1.11. Profilaxis	33
1.11.1. Medidas de control	33
1.11.2. Vacunas	33
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>43</b>
3.1. Zona de estudio	43
3.2. Población de estudio y tamaño muestral	44
3.3. Análisis estadístico de los resultados	47
3.4. Toma de muestras	48
3.4.1. Muestras de heces	48
3.4.2. Muestras de sangre	48
3.4.3. Muestras de fosas de purines	49
3.4.4. Datos de las explotaciones	49

3.5.	Procesamiento de las muestras	50
3.5.1.	Muestras de heces	50
3.5.2.	Muestras de sangre	50
3.5.3.	Muestras de fosas de purines	50
3.6.	Extracción del ARN vírico de las muestras	51
3.7.	Transcripción inversa del ARN vírico	53
3.8.	Amplificación del ADNc. Reacción en cadena de la polimerasa anidada (nested-PCR)	54
3.9.	Electroforesis del producto amplificado	59
3.10.	Secuenciación de los productos obtenidos en la RT-nested-PCR	60
3.10.1.	Purificación de los productos de PCR	61
3.10.1.1.	Purificación del producto de PCR directamente desde el tubo	61
3.10.1.2.	Purificación del producto de PCR mediante su escisión del gel	61
3.10.2.	Reacción de secuenciación	62
3.10.3.	Precipitación de los productos de la secuenciación	65
3.10.4.	Resuspensión de los precipitados de la reacción de secuenciación	66
3.11.	Análisis filogenético de las secuencias obtenidas	66
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>75</b>
4.1.	PREVALENCIA DEL VHE EN CERDOS	75
4.1.1.	Prevalencia total y por etapa productiva hallada en las muestras de heces de cerdos	75
4.1.2.	Determinación del riesgo de excreción del VHE en heces asociado a la etapa productiva	76
4.1.3.	Prevalencia total y por etapa productiva hallada en las muestras de sueros de cerdos	78
4.1.4.	Determinación del riesgo de viremia por el VHE asociado a la etapa productiva	79

4.1.5.	Prevalencia total y por etapa productiva de animales portadores del VHE	80
4.1.6.	Determinación del riesgo de infección por el VHE asociado a la etapa productiva	82
4.2.	PREVALENCIA DEL VHE EN GRANJAS	83
4.3.	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLADOS PORCINOS DEL VHE	86
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>105</b>
5.1.	PREVALENCIA DEL VHE EN CERDOS	105
5.1.1.	Prevalencia total y por etapa productiva hallada en las muestras de heces de cerdos	105
5.1.2.	Determinación del riesgo de excreción del VHE en heces asociado a la etapa productiva	108
5.1.3.	Prevalencia total y por etapa productiva hallada en las muestras de sueros de cerdos	109
5.1.4.	Prevalencia total y por etapa productiva de animales portadores del VHE	110
5.2.	PREVALENCIA DEL VHE EN GRANJAS	111
5.3.	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLADOS PORCINOS DEL VHE	114
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>125</b>
<b>8.</b>	<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	<b>159</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>161</b>
<b>10.</b>	<b>PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL</b>	<b>221</b>



## **1. INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. HISTORIA NATURAL DE LA HEPATITIS E

El virus de la hepatitis E (VHE) es la causa principal de las epidemias de hepatitis infecciosa aguda no A no B que se transmite de forma fecal-oral en los países subdesarrollados (Emerson y col. 2004b).

La primera epidemia producida por el VHE se halla documentada en el año 1955 (Viswanathan 1957; Viswanathan y col. 1957) en Nueva Delhi, pero no fue atribuida a este virus hasta el año 1980. En este año, se analizaron los sueros de dicha epidemia atribuida al virus de la hepatitis A (VHA), descubriéndose que no eran reactivos frente al antígeno del citado virus (Khuroo 1980; Wong y col. 1980). Tres años más tarde, se consiguió reproducir la enfermedad en un voluntario infectado por vía parenteral con un inóculo de heces de un individuo afectado en una epidemia de hepatitis acaecida en Kirgizstan en 1955 (Balayan y col. 1983). En este experimento se detectaron por primera vez las partículas víricas de este nuevo agente infeccioso mediante microscopía electrónica y se comprobó que éstas eran reconocidas por el suero de otros individuos afectados por este tipo de hepatitis, mientras que el suero de individuos positivos a hepatitis A o B no reaccionaba frente a estas partículas. Adicionalmente, se inocularon macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) con esta muestra, logrando reproducir la excreción en heces, la producción de inmunoglobulinas y la hepatopatía. En 1988, se aislaron partículas de un virus de 32 nm de diámetro en heces de individuos de Rusia, Estados Unidos y el continente africano que padecían hepatitis no-A no-B. Además, observaron que dichas partículas reaccionaban con sueros de individuos de otras zonas afectados por este tipo de hepatitis, y en el caso de la

cepa de Estados Unidos se logró infectar a macacos cinomolgos. Este hallazgo sugirió que, a pesar de la variabilidad geográfica de los aislados, existía un único serotipo (Bradley y col. 1988).

En 1990, se consiguió aislar un fragmento del ADN complementario del VHE (Reyes y col. 1990) y en 1991 se secuenció y se caracterizó el genoma vírico completo usando primates (*Macaca fascicularis*) infectados experimentalmente con heces humanas obtenidas de pacientes infectados durante una epidemia en Burma (Tam y col. 1991). Posteriormente, se secuenció un segundo aislado procedente de un brote epidémico en Méjico (Huang y col. 1992). Los dos aislados eran similares en su organización genómica, pero sólo compartían un 76% de identidad de nucleótidos del genoma completo. De forma paralela a estos hallazgos, se diseñaron varios experimentos con el objetivo de reproducir la enfermedad en diferentes especies animales. Así, además de las infecciones experimentales efectuadas en macacos mencionadas anteriormente, se consiguió reproducir la infección en cerdos consiguiendo la excreción del virus en heces (Balayan y col. 1990; Usmanov y col. 1991a), en corderos (Usmanov y col. 1994) y en ratas (Maneerat y col. 1996).

En 1996 se aisló y secuenció una cepa distinta de las anteriores, cuyo origen era un paciente de Estados Unidos sin historia de viaje al extranjero (Schlauder y col. 1998). Este hecho, unido a la seroprevalencia relativamente elevadas de hepatitis E halladas en población sana de países desarrollados como Suecia (Sylvan y col. 1998), Taiwán (Lin y col. 2000), Italia (Pavia y col. 1998) y España (Buti y col. 1995), generó la sospecha de la existencia de un reservorio animal que mantuviera la circulación del VHE. A partir de este momento, se realizaron numerosos estudios de seroprevalencia tanto en países

industrializados como en vías de desarrollo, en diferentes especies animales incluyendo cerdos (Arankalle y col. 2001; Banks y col. 2004; Choi y col. 2003; Garkavenko y col. 2001; Hsieh y col. 1999; Meng y col. 1999; Takahashi y col. 2003; Wibawa y col. 2004), roedores (He y col. 2002; Kabrane-Lazizi y col. 1999), aves de corral (Huang y col. 2002b), y ganado vacuno, y caprino (Arankalle y col. 2001). En 1997, se aisló en Estados Unidos la primera cepa del VHE de origen porcino (Meng y col. 1997); esta cepa presentaba una identidad en la secuencia de nucleótidos de tan sólo un 74% comparándola con los aislados clásicos del VHE (cepas Burma y Méjico) pero tenía una similitud del 91% al ser comparada con el aislado humano de la misma región geográfica.

Posteriormente, se han aislado secuencias genómicas del VHE porcino en diferentes países industrializados como Reino Unido (Banks y col. 2004), Holanda (van der Poel y col. 2001), Japón (Takahashi y col. 2003), Corea (Choi y col. 2003) y España (Clemente-Casares y col. 2003). Recientemente, se ha aislado una cepa de VHE de origen aviar relacionada con el síndrome de hepatitis-esplenomegalia en pollos de engorde (Huang y col. 2002b).

## **1.2. ESTRUCTURA GENÓMICA DEL VHE**

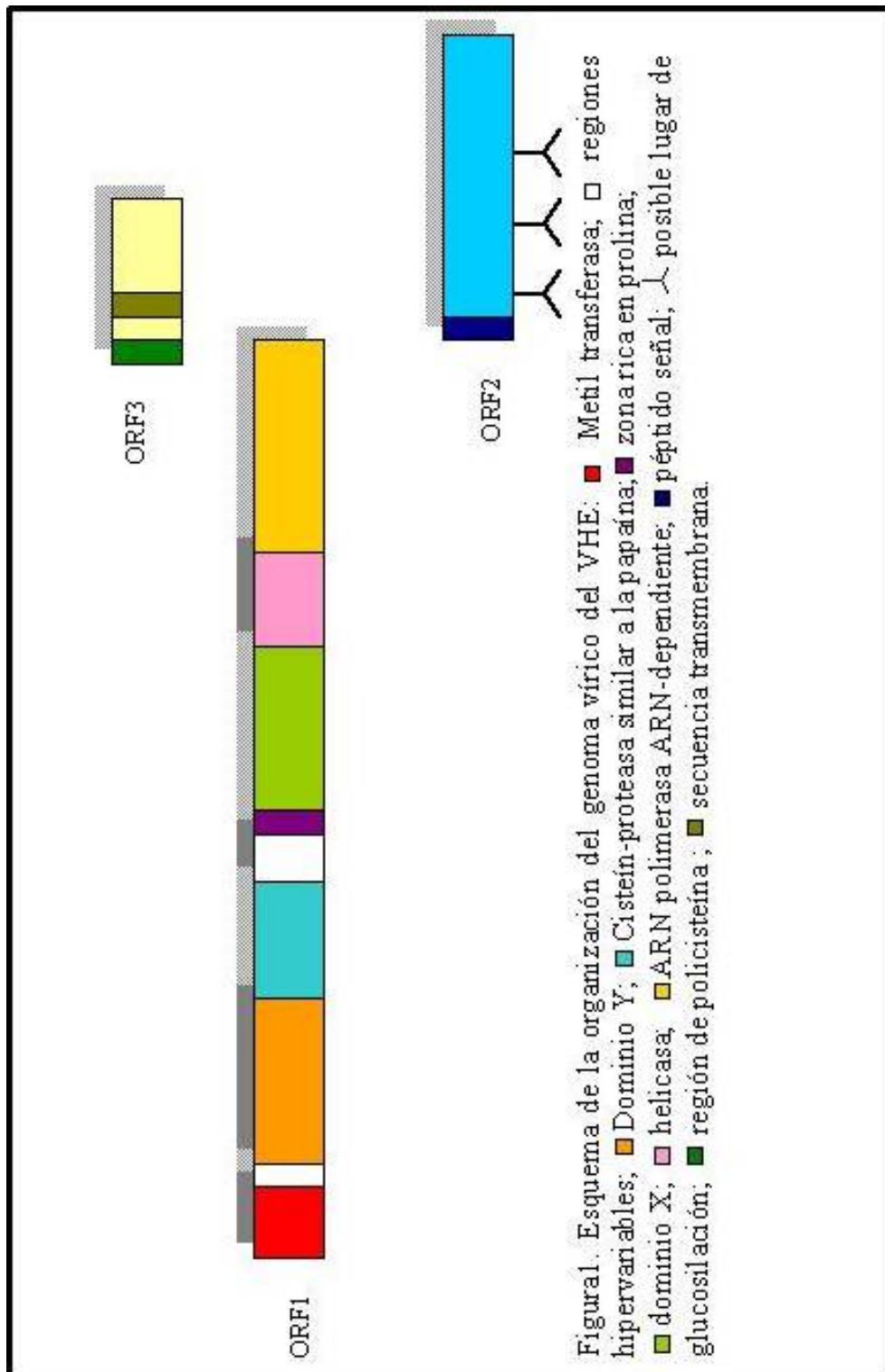
El VHE es un virus desnudo con simetría icosaédrica de aproximadamente 32 a 34 nm de diámetro (Bradley y col. 1987), cuyo genoma se compone de una única hebra de ARN de polaridad positiva con una longitud aproximada de 7,5 Kb (Reyes y col. 1990).

Comenzando desde el extremo 5', los primeros 27 nucleótidos, constituyen una región no codificante (UTR), que posee una compleja estructura secundaria en

forma de horquilla (Huang y col. 1992). El genoma del VHE posee tres regiones de lectura abierta (ORFs) (Tam y col. 1991) que se distribuyen de la siguiente forma (Figura 1):

- El ORF1 se extiende desde el nucleótido 28 hasta el 5107, es el fragmento más extenso y tiene una longitud de 5 kb. Existe una gran heterogeneidad en esta región cuando se comparan las secuencias nucleotídicas de distintos aislados del VHE (Fry y col. 1992). Esta región codifica una poliproteína de 1693 aminoácidos que posteriormente dará lugar a las proteínas no estructurales involucradas en la replicación y en el procesamiento de las proteínas víricas. Estas proteínas no estructurales son una ARN-polimerasa ARN dependiente, una ARN helicasa, una metiltransferasa, una cisteín proteasa similar a la papaína y además contiene 2 regiones denominadas dominios X e Y, de función desconocida (Koonin y col. 1992).
- El ORF2 se extiende desde el nucleótido 5147 hasta el 7127, y se encuentra separado por 37 pb después del ORF1 en sentido 3'. Esta región posee una longitud de unas 2 kb y codifica la principal proteína estructural que dará lugar a la cápside vírica. Dicha proteína tiene una longitud de 660 aminoácidos (88 kDa) y se expresa tanto a nivel intracelular como en la membrana celular. Esta macromolécula se sintetiza en forma de precursor y por escisión posterior de un péptido señal, pasa a una forma madura, la cual es capaz de autoensamblarse y glicosilarse (Khudyakov y col. 1993).
- El ORF3 se extiende desde el nucleótido 7128 hasta el 7497 y tiene una longitud de 369 pb. Este fragmento se solapa parcialmente con el ORF1

y el ORF2, comenzando en su extremo 5' tan solo 1 nucleótido antes del final del ORF1 y solapándose durante 368 pb con el ORF2. El ORF 3 codifica una fosfoproteína estructural de 123 aminoácidos (13,5 kDa), que se expresa intracelularmente, se asocia con el citoesqueleto de la célula hepática y no sufre modificaciones posteriores en su estructura. Se ha sugerido que esta proteína cumple múltiples funciones en la patogénesis debido a la interacción de su forma fosforilada con la forma no glicosilada de la proteína estructural codificada por el ORF2. Asimismo, esta fosfoproteína es capaz de formar dímeros y de unirse a varios tipos de proteínas que contienen dominios SH<sub>3</sub> (Zafrullah y col. 1997).





### **1.3. CLASIFICACIÓN Y FILOGENIA**

En un principio, se clasificó al VHE dentro de la familia *Caliciviridae*, género *Calicivirus*, basándose en su estructura y propiedades bioquímicas (Berke y col. 1997). Tras los análisis filogenéticos de la región que codifica para la helicasa y la polimerasa, se excluyó de dicha familia trasladándose a un grupo provisional denominado “*HEV-like*” (Berke y col. 2000). Actualmente, se encuentra incluido en una nueva familia denominada *Hepeviridae* como único integrante del género *Hepevirus* (Emerson y col. 2004a).

Aunque se conoce un único serotipo, se ha observado una gran diversidad en las secuencias genómicas de las cepas identificadas de VHE. Hasta el momento, se han propuesto varias clasificaciones (Schlauder y col. 1999; Schlauder y col. 2001; Tsarev y col. 1999), siendo la más aceptada la que distribuye el VHE en 4 genotipos principales (Schlauder y col. 2001) (Fig. 2). Sin embargo, no existe consenso en cuanto a la clasificación de estos genotipos en subtipos. Recientemente, Lu y col., en 2005 han realizado un análisis filogenético comparando distintos fragmentos del genoma de un total de 421 aislados del VHE y han clasificado al VHE en 4 genotipos principales, que se dividen en diferentes subtipos. Estos autores analizaron un fragmento de la región 5' del ORF2, que se extiende desde el nucleótido 5994 hasta el 6294, observando una menor variabilidad genética de los distintos aislados. Lu y col., clasifican el VHE en los siguientes genotipos y subtipos:

#### **I. GENOTIPO 1:**

Se divide en 5 subtipos, casi la totalidad de ellos de origen humano.

- SUBTIPO 1a

Es el subtipo que se ha identificado con más frecuencia dentro del genotipo 1. Es el responsable de epidemias en diferentes lugares de la India (Arankalle y col. 1999), Nepal (Shrestha y col. 2003), Myanmar (cepa prototipo Burma) (Aye y col. 1993), Pakistán (Cuyck-Gandre y col. 2000), Vietnam y Japón. Además, en este subtipo se localiza una cepa, probablemente importada, hallada en aguas residuales de Barcelona (Pina y col. 1998).

- SUBTIPO 1b

Es el subtipo predominante identificado en las epidemias sufridas en Xinjiang (China) (Aye y col. 1992). Se ha encontrado en Pakistán, Bangladesh y Haití. Según los análisis filogenéticos realizados, se cree que de Xinjiang pasó a Pakistán y Bangladesh, exportándose de este último país a Haití (Drabick y col. 1997).

- SUBTIPO 1c

Este subtipo se ha encontrado en pacientes con hepatitis esporádica de India y China. Además, es el responsable de la epidemia de 1987 de Kyrgyzstan (Usmanov y col. 1991b).

- SUBTIPOS 1d y 1e

Se han identificado exclusivamente en África. El 1d se localiza únicamente en Marruecos y Algeria (Cuyck-Gandre y col. 1997), mientras que en el 1e se agrupan cepas humanas de distintas áreas del centro, norte y sur del continente africano, y cepas equinas halladas en Egipto (Saad y col., 2006). En España se aisló una cepa perteneciente a este último subtipo obtenida de un paciente que había visitado Etiopía (Buti y col. 2004).

## II. GENOTIPO 2

El genotipo 2 únicamente se compone de cepas de origen humano. Está integrado por la cepa prototipo mejicana (Huang y col. 1992) y cepas de hepatitis esporádica procedentes de pacientes de Nigeria (Buisson y col. 2000).

## III. GENOTIPO 3

Es el genotipo que aglutina el mayor número de secuencias publicadas en la base de datos del Genbank. En él podemos encontrar secuencias de origen humano, en su mayoría procedentes de países en los que el VHE no ha producido epidemias, y secuencias obtenidas de aislados del VHE en cerdos, así como en jabalíes y ciervos (Takahashi y col. 2004).

- SUBTIPO 3a

Se trata del subtipo más numeroso, y está integrado por cepas humanas y porcinas procedentes mayoritariamente de Estados Unidos (Huang y col. 2002a), Japón (Takahashi y col. 2002), Korea (Ahn y col. 2005) y Holanda (van der Poel y col. 2001). Según el análisis filogenético realizado por Takahashi en 2003, algunas cepas porcinas de Japón se encuentran estrechamente relacionadas con cepas porcinas de USA, posiblemente por importación de cerdos infectados desde los Estados Unidos (Takahashi y col. 2003).

- SUBTIPO 3b

Las cepas de VHE pertenecientes a este subtipo se han identificado en su totalidad en Japón. En él se incluyen aislados humanos y porcinos (Takahashi y col. 2003), así como otros hallados en un hígado de jabalí y en carne de ciervo (Takahashi y col. 2004).

- SUBTIPO 3c

Se compone de cepas porcinas aisladas exclusivamente en Holanda (van der Poel y col. 2001).

- SUBTIPO 3d

Las cepas identificadas en este subtipo se localizan en Taiwán y pertenecen a cerdas reproductoras importadas de los Estados Unidos (Wu y col. 2002).

- SUBTIPO 3e

Se han identificado en su mayoría cepas humanas autóctonas y porcinas en países europeos como Reino Unido (Banks y col. 2004), Holanda (van der Poel y col. 2001), Italia (Zanetti y col. 1999), Grecia (Schlauder y col. 1999). En España, la cepa Por1 de origen porcino hallada en Cataluña pertenece a este subtipo (Clemente-Casares y col. 2003).

- SUBTIPO 3f

En este subtipo se encuentran el resto de cepas españolas entre las que se incluyen aislados de hepatitis E humanas autóctonas como el Sp3 (Perez-Gracia y col. 2004) y las cepas VH1 y VH2 (Buti y col. 2004). Además, también comprende las cepas identificadas en aguas residuales de Barcelona (BCN2 hasta BCN16) (Clemente-Casares y col. 2003) y en aguas residuales de matadero porcino (E11) (Pina y col. 2000).

- SUBTIPO 3g

El único integrante de este subtipo es la cepa obtenida de un cerdo infectado experimentalmente, con un aislado de heces procedente de la epidemia de VHE que ocurrió en 1987 en Kyrgyzstan. Tras el análisis filogenético de dicha cepa y su comparación con otras secuencias de

pacientes afectados en la misma epidemia, se observó que pertenecían a distintos genotipos. A la vista de estos resultados, se llegó a la conclusión de que la secuencia obtenida pertenecía al cerdo y no era producto de la infección experimental (Lu y col. 2004).

#### IV. GENOTIPO 4

Se ha aislado exclusivamente en el continente asiático y se divide en 5 subtipos:

- SUBTIPOS 4a y 4b

Comprenden cepas humanas y porcinas de China (Wang y col. 2002) y Taiwán (Hsieh y col. 1999; Wu y col. 2002). Asimismo, en el 4b se ha identificado una cepa porcina de Bali (Wibawa y col. 2004), así como cepas porcinas y humanas japonesas (Nishizawa y col. 2003).

- SUBTIPO 4c

Todas las cepas de este subtipo, tanto humanas como porcinas se han detectado en Japón, excepto un aislado porcino de China. Entre ellas se incluyen cepas de pacientes que contrajeron hepatitis por consumo de hígado de cerdo poco cocinado y el aislado obtenido del propio lote de hígado (Yazaki y col. 2003).

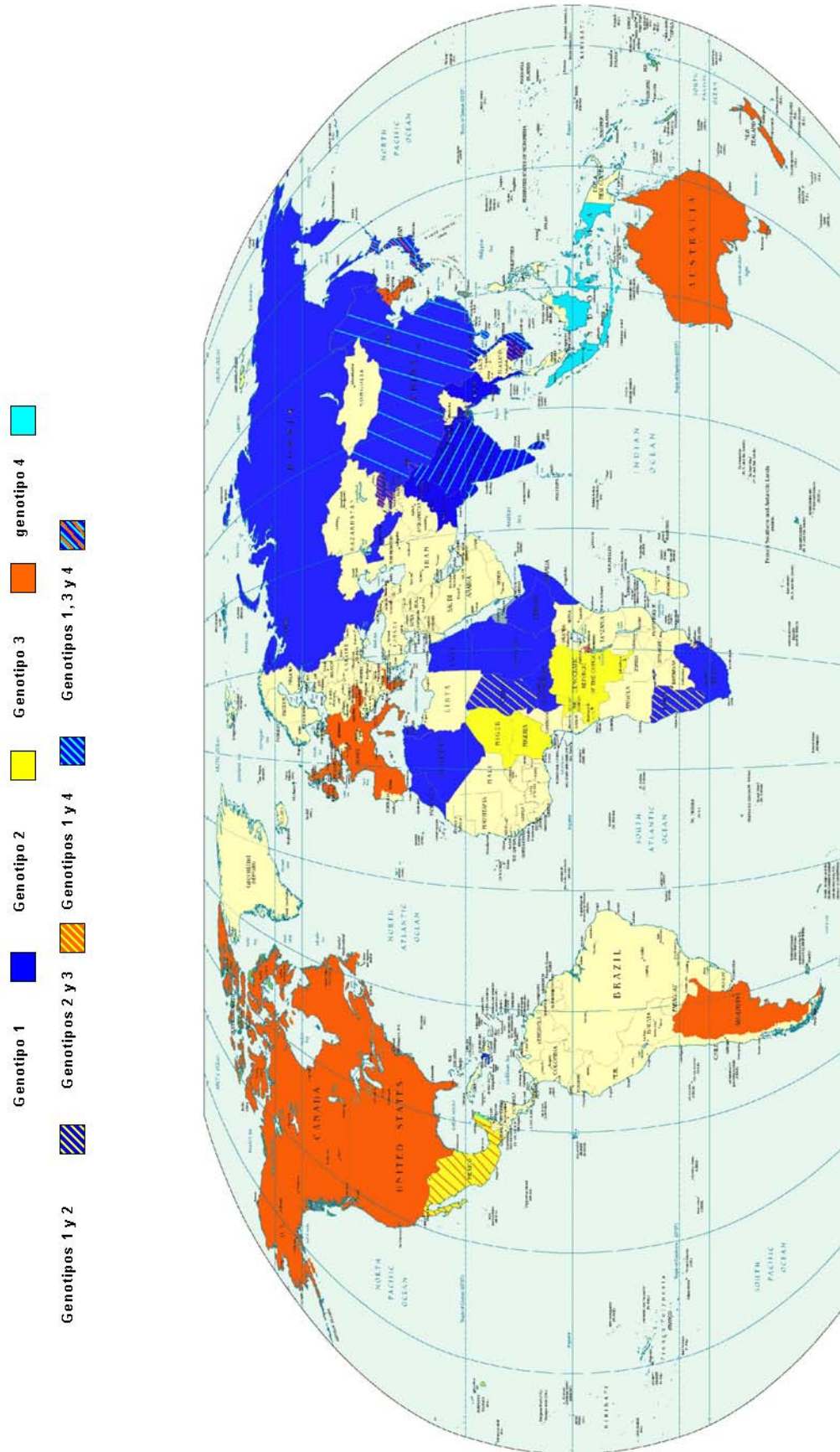
- SUBTIPO 4d

Está integrado por cepas humanas y porcinas aisladas en China (Schlauder y col. 2001).

- SUBTIPO 4e

En él se encuentran únicamente cepas porcinas aisladas en la India (Arankalle y col. 2002).

Figura 2. Distribución mundial de los 4 genotipos del VHE.



## **1.4. FORMAS DE PRESENTACIÓN**

Desde su primera aparición en 1955, la hepatitis E se ha descrito en dos formas principales de presentación: epidémica y esporádica.

### **1.4.1. Presentación epidémica**

Las epidemias descritas hasta ahora, se han producido en su mayoría por ingestión de agua de bebida contaminada con residuos fecales (Balayan y col., 1983; Rab y col., 1997). Estas deficientes condiciones de abastecimiento de agua tienen lugar en países en vías de desarrollo y en campos de refugiados (Wkly.Epidemiol.Rec., 2004b; Bryan y col., 2002; Emerson y col., 2004b).

La primera epidemia descrita ocurrió en Nueva Delhi (India) en 1955 y afectó a 29.000 personas (Viswanathan 1957; Viswanathan y col., 1957), a la cual se sucedieron otras cuatro, todas localizadas en Asia entre los años 1955-1982 con más de 100.000 personas afectadas. A partir de esta fecha se han descrito numerosos brotes epidémicos, localizados en África y Centro América además de Asia (Tabla 1), siendo los más recientes, los ocurridos en Chad (Wkly.Epidemiol.Rec., 2004a) y Sudán ( Wkly.Epidemiol.Rec., 2004c) durante el año 2004.

Tabla 1. Epidemias de hepatitis E en el mundo (modificado de Irshad 1999).

En negrita figuran las epidemias que previamente fueron atribuidas al VHA. N.D.: no descrito

Lugar	Año	Afectados
<b>Nueva Delhi, India</b>	<b>1955-56</b>	<b>29.000</b>
Kirgizstan	1955-56	10.812
Katmandú, Nepal	1973-1974	10.000
<b>Ahmedaban, India</b>	<b>1975-76</b>	<b>2.572</b>
Mandalay, Myanmar	1976-77	20.000
San José, Costa Rica	1976	5
Kashmir, India	1978-82	52000
<b>Pune, India</b>	<b>1978</b>	<b>N.D.</b>
Algeria	1980-81	788
Qatar	1981	91
Katmandú, Nepal	1981-82	6.000
Rangún, Myanmar	1982-83	399
<b>URSS</b>	<b>1982-83</b>	<b>N.D.</b>
Costa de Marfil	1983-84	623
Sudán	1985	2.012
Somalia	1986	2.000
Karachi, Pakistán	1986	N.D.
Méjico	1986	94
Xinjiang, China	1986-88	119.280
Karnal, India	1987	1.273
Sargodha, Pakistan	1987	133
Katmandú, Nepal	1987	370
Borneo, Indonesia	1987-88	2.000
Kirgizstan	1987-1989	N.D.
Yamunanagar, India	1989	N.D.
Etiopía	1990-1991	6.000
Kanpur, India	1991	79.000
Kenia	1991	1.700
Saharampur, India	12/1992 a 4/1993	3.682
Meerut, India	1996	N.D.
Darfur, Sudán	05 a 10/2004	11.277
Chad	06 a 09/2004	1.442
Bagdag, Irak	09/2004	60



#### **1.4.2. Presentación esporádica**

Este tipo de presentación se ha descrito tanto en países donde no se han producido epidemias, en los cuales constituye aproximadamente el 1% de las hepatitis víricas agudas, como en zonas endémicas, por ejemplo la India, donde del 50 al 70% de las hepatitis agudas son causadas por el VHE. Las formas esporádicas se han asociado habitualmente a pacientes que han viajado a regiones endémicas (Chapman y col., 1993; Skaug y col., 1994; Zaaier y col., 1993; Zanetti y col., 1994) o a inmigrantes procedentes de dichas zonas (Tarragó y col., 2000). No obstante, además de las formas esporádicas descritas anteriormente, se han descrito casos de hepatitis E “autóctonas”, desarrolladas en pacientes sin historial de viajes a regiones endémicas en países supuestamente no endémicos como Argentina (Schlauder y col., 2000), Austria (Worm y col., 2000), España (Jardi y col., 1993; Perez-Gracia y col., 2004), Estados Unidos (Erker y col., 1999), Grecia (Schlauder y col., 1999), Holanda (Widdowson y col., 2003), Italia (Zanetti y col., 1999), Japón (Tokita y col., 2003) y el Reino Unido (McCrudden y col., 2000).

### **1.5. VÍAS DE TRANSMISIÓN**

#### **1.5.1. Transmisión fecal-oral**

Esta ruta es la forma más importante de transmisión del VHE tanto en personas como en cerdos. La mayoría de las epidemias descritas se han relacionado con el consumo de aguas de bebida contaminadas con residuos fecales (Viswanathan 1957). Generalmente se suceden a lluvias torrenciales e inundaciones, que suelen ser responsables de la contaminación de fuentes de agua de bebida. Algunas epidemias se han manifestado durante los meses

más calurosos del verano en los que se produce una reducción del caudal de los ríos y con ello un incremento del riesgo de infección.

En países en vías de desarrollo como la India (Aggarwal y col., 1999), China (Zhuang y col., 1991) e Indonesia (Corwin y col., 1995) se han repetido estas epidemias, lo cual sugiere una contaminación continuada de los abastecimientos de agua potable como causa más probable, aunque no se puedan descartar otras vías de transmisión.

En animales, y especialmente en cerdos, que es la especie más estudiada en cuanto a las vías de transmisión de la hepatitis E, existen algunos trabajos basados en infecciones experimentales que apuntan a la vía fecal-oral como la vía más común de infección (Kasorndorkbua y col., 2004).

Por el momento, se desconoce cual es la dosis infectante del virus para producir enfermedad tanto en personas como animales, al igual que se ignora el tiempo de viabilidad del virus en el medio ambiente ya que no se dispone de un sistema eficaz de cultivo del virus. Sin embargo, las infecciones experimentales realizadas en cerdos y primates apuntan a que se necesitan elevadas cantidades de virus para producir su excreción en heces cuando la vía de inoculación es oral (Kasorndorkbua y col., 2002; Kasorndorkbua y col., 2004).

### **1.5.2. Transmisión vertical**

Existen varios estudios (Kumar y col., 2001; Singh y col., 2003) que describen la infección *in utero* por el VHE en la especie humana. En un 66% de los embarazos en los que se produce infección por el VHE se producen partos prematuros, y la infección por este virus aumenta la probabilidad de muerte

perinatal. Los datos obtenidos hasta el momento muestran tasas de transmisión madre-hijo del VHE que oscilan desde el 33% (Kumar y col., 2001) hasta el 100% (Kumar y col., 2004), en pacientes que sufren hepatitis no complicadas durante el último trimestre de la gestación. Es importante reseñar que se han descrito tasas de mortalidad de hasta el 26,9% producidas por hepatitis fulminante durante el último tercio de la gestación. La razón por la cual la hepatitis E cursa con un cuadro fulminante en un elevado porcentaje de mujeres embarazadas se desconoce. Algunos autores apuntan a un descenso de la inmunidad durante este periodo, pero dicha afirmación no ha podido ser demostrada científicamente (Kumar y col., 2004).

En animales, al contrario que en la especie humana, no ha sido posible reproducir la transmisión vertical desde hembras infectadas experimentalmente durante la gestación a la progenie. Hasta el momento, sólo se ha publicado un artículo que describe la inoculación experimental de cerdas gestantes con el VHE (Kasorndorkbua y col., 2003). En ningún lechón de las camadas resultantes se consiguió identificar el ARN vírico, a pesar de que la infección de las hembras gestantes se demostró mediante la detección del virus en las heces. La infección de las madres tampoco afectó a la mortalidad perinatal, al tamaño medio de las camadas o al peso de los lechones.

### **1.5.3. Transmisión por contacto directo**

Este tipo de transmisión parece ser poco importante; así, en el estudio más reciente llevado a cabo al respecto en zonas de hepatitis E esporádica (Somani y col., 2003), de 86 contactos intrafamiliares analizados, en tan solo 2 casos se produjo un contagio de persona a persona. En otro estudio realizado durante una epidemia en Kudal (India) (Arankalle y col., 2000a), no se encontraron

diferencias significativas entre las seroprevalencias de individuos con familiares afectados por el VHE e individuos en cuyas familias no se encontraba ningún afectado.

#### **1.5.4. Transmisión parenteral**

En los últimos años se han publicado un serie de estudios que describen la vía parenteral como una posibilidad más de transmisión del VHE en zonas hiperendémicas (Arankalle y col., 2000b; Khuroo y col., 2004). La publicación de un estudio (Xia y col., 2004) que demuestra la transmisión por vía parenteral a un mono Rhesus, a partir de 10 ml de sangre de un donante positivo al VHE, refuerza los estudios que sugerían dicha posibilidad. Recientemente, se ha descrito también esta vía de transmisión en países desarrollados y no considerados tradicionalmente endémicos, como Japón (Matsubayashi y col., 2004; Mitsui y col., 2004) y el Reino Unido (Boxall y col., 2006). Algunos estudios (Mateos y col., 1997, Mitsui y col., 2004 y Taremi y col., 2005) incluyen como posible riesgo de contraer la infección, los tratamientos de hemodiálisis. En un estudio realizado en Taiwán (Lee y col., 2005), se describió una mayor seroprevalencia en los pacientes hemodializados en comparación con las personas sanas. Este estudio se realizó sobre una población de 400 pacientes hemodializados, 400 individuos sanos y 400 pacientes hospitalizados por otras causas, siendo las seroprevalencias de 31%, 8,9% y 16% respectivamente. En España, Sánchez y col. en 2002 describieron dos casos de hepatitis E autóctonos y detectaron anticuerpos anti-VHE en el 2,8% de donantes de sangre y en el 6,3% de enfermos en tratamiento de hemodiálisis estudiados. En animales, la vía parenteral está descrita como la vía más eficiente para realizar infecciones experimentales. En ganado porcino, no sería deseable la

posibilidad de transmisión por vía parenteral debido a la práctica de algunos ganaderos de utilizar las mismas agujas en distintos cerdos en procedimientos rutinarios como la administración de vacunas. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no han conseguido demostrar esta vía (Kasorndorkbua y col., 2004).

#### **1.5.5. Transmisión sexual**

Hasta el momento, no existe evidencia de este tipo de transmisión.

#### **1.5.6 Transmisión por alimentos**

Se han descrito casos de infección alimentaria por el VHE a través de la ingestión de carne cruda de ciervo (Tei y col., 2003) e hígado crudo de jabalí (Matsuda y col., 2003).

### **1.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y MARCADORES DE INFECCIÓN.**

El periodo de incubación en la especie humana varía de 2 a 10 semanas (Balayan y col., 1983; Chauhan y col., 1993). Las manifestaciones clínicas de la hepatitis E no se pueden diferenciar de las de otras hepatitis agudas y comprenden varios cuadros clínicos (tabla 2).

La hepatitis aguda icterica constituye el cuadro clínico más común, con un prodromo de pocos días que precede a síntomas como fiebre, dolor abdominal, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, artralgia y otros (Viswanathan y col., 1957). Con posterioridad se produce ictericia, oscurecimiento de la orina, aclaración del color de las heces y en ocasiones prurito.

Los valores laboratoriales alterados incluyen: elevación de bilirrubina sérica y en orina, alanina-amino-transferasa (ALT), aspartato-amino-transferasa (AST), gamma-glutamil-transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (Dienstag, 1983).

La enfermedad normalmente es autolimitada y su duración suele ser de 1 a 4 semanas. No se han descrito secuelas del tipo de cirrosis o hepatitis crónica.

Otros individuos desarrollan un cuadro clínico moderado conocido como hepatitis anictérica, que se caracteriza por la ausencia de ictericia y la presentación de síntomas inespecíficos como la fiebre, que lo asemejan a otras enfermedades víricas.

También existe la forma de presentación subclínica, sin síntomas y que pasa totalmente desapercibida. Esta forma, difícil de cuantificar en los estudios de prevalencia, suele corresponder a individuos con elevado nivel de anticuerpos VHE de clase IgG y sin historia previa de enfermedad hepática.

Un pequeño porcentaje de individuos pueden desarrollar la forma más grave que cursa con fallo hepático fulminante. Este cuadro clínico se describe especialmente en zonas endémicas.

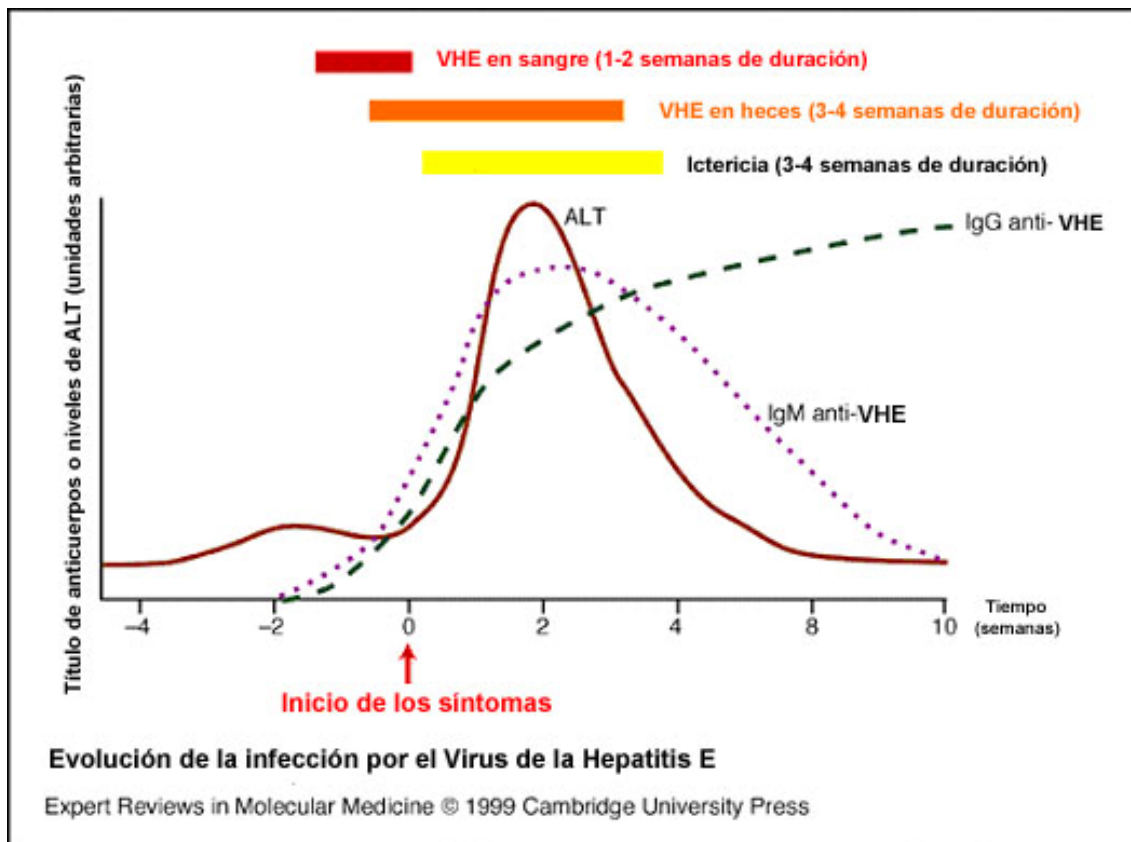
**Tabla 2. Cuadros clínicos de hepatitis E en el hombre.**

Hepatitis icterica
Hepatitis anictérica
Infección asintomática
Hepatitis grave que evoluciona a fallo hepático fulminante

La mortalidad debida a esta infección varía de 0,4 al 4% según fuentes hospitalarias (Hla y col., 1985). Este porcentaje aumenta hasta un 25% en mujeres embarazadas, especialmente durante el 2º y 3º trimestre de gestación (Khuroo y col., 2003).

Durante la infección aguda por el VHE, las IgM preceden a las IgG en pocos días y aparecen al inicio de la sintomatología clínica, para disminuir a lo largo de los 4-5 meses siguientes (Pérez-Gracia y col., 2001). La respuesta de IgG aparece tras las IgM y su título aumenta desde la fase aguda hasta la de convalecencia, pudiendo permanecer a niveles elevados de 1 a 4 años después de la fase aguda de la enfermedad. El aumento de la ALT alcanza un pico aproximadamente al final de la primera semana y los niveles alcanzados no se correlacionan con la gravedad del daño hepático. El virus se puede aislar en bilis y heces al final del periodo de incubación y permanece durante 1-2 semanas después de la aparición de los síntomas (Aggarwal y col., 2000). La viremia se presenta también en la última fase de incubación, pero desaparece justo antes de las manifestaciones clínicas (Chauhan y col., 1993)(Fig. 3).

Figura 3.- Esquema de la evolución de la infección por el VHE en el hombre.

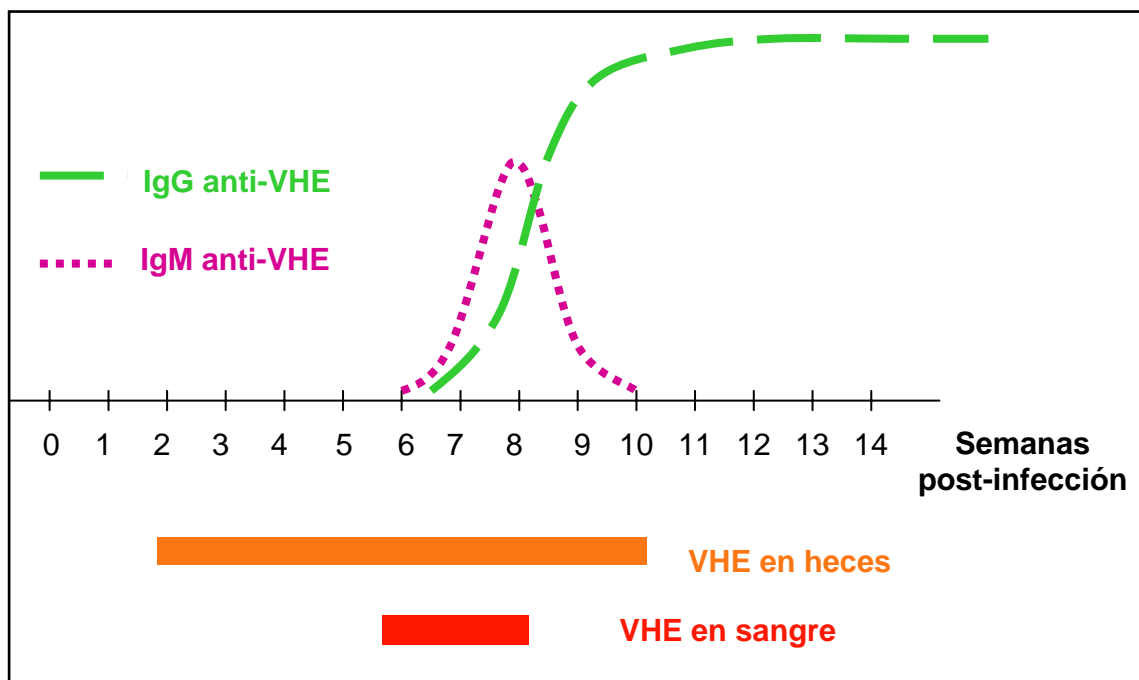


En la especie porcina, la forma de presentación de la hepatitis E es la subclínica. En ninguna de las infecciones experimentales realizadas con el VHE en cerdos, se observaron síntomas o elevación de las enzimas hepáticas (Kasorndorkbua y col., 2002; Kasorndorkbua y col., 2003; Kasorndorkbua y col., 2004; Meng y col., 1998). El comienzo de la excreción del VHE en heces es bastante precoz, observándose tan sólo dos semanas tras la inoculación vía parenteral (Fig. 4). La duración de la excreción es variable, observándose durante una media de 8 semanas. La viremia aparece entre las 5 y las 6 semanas post-inoculación y tiene una permanencia media de dos semanas (Meng y col. 1998a). La aparición de anticuerpos anti-VHE comienza sobre las



6 semanas tras la inoculación y tiene una duración media de 2 semanas para los anticuerpos anti-VHE de clase IgM. La aparición de los anticuerpos anti-VHE de clase IgG se produce aproximadamente a las 7 semanas post-inoculación, pero su duración no se ha podido definir con exactitud puesto que en los estudios experimentales realizados, los animales inoculados fueron eutanasiados antes de que los niveles de estas inmunoglobulinas comenzaran a descender (Meng y col., 1998a).

Figura 4. Esquema de la evolución de la infección por el VHE en el cerdo.



## **1.7. PATOGENIA**

La patogenia del VHE está todavía pendiente de esclarecer, se sabe que la principal vía de entrada del virus es oral, pero los mecanismos por los cuales el virus alcanza el hígado son inciertos. Se cree que, tras una replicación en células intestinales, llega al hígado a través de la vena porta.

Se han realizado infecciones experimentales en primates (Krawczynski y col., 1989), en las que, tras la infección por vía intravenosa u oral, el tiempo medio de incubación es de 21 días. La expresión del VHE en hepatocitos, indicadora de la replicación vírica, se inicia a los 7 días post-infección y alcanza un nivel máximo coincidiendo con el pico de ALT, detectándose el virus en el 70-90% de los hepatocitos.

En el 25% de las mujeres embarazadas se produce hepatitis fulminante. Existe una hipótesis para explicar el daño tan severo que causa el VHE durante el embarazo (Purcell y col., 1997). Según ésta, el VHE podría dañar las células de Kupffer, lo cual disminuiría la función de protección de los hepatocitos contra las endotoxinas que originan las bacterias Gram negativas en el intestino. Los hepatocitos podrían verse afectados por dichas endotoxinas, o de manera indirecta por las consecuencias de la liberación de eicosanoides, produciéndose la agregación plaquetaria, inflamación, etc. Además, la liberación de prostaglandinas podría dar lugar a la quimiotaxis de neutrófilos. Todo ello conduciría a la inflamación y edema del tejido hepático y a la obstrucción de las vías biliares (colestasis). Las mujeres embarazadas son muy sensibles al efecto de estas endotoxinas, lo cual podría explicar la elevada tasa de mortalidad.

## **1.8. HOSPEDADORES**

El VHE se considera enzoótico en una amplia variedad de especies animales, tanto domésticas como silvestres. Además de la infección en humanos, identificada en primer lugar, se ha detectado el genoma del VHE en aves de corral (Haqshenas y col., 2001), caballos (Saad y col., 2006), cerdos (Meng y col., 1997), ciervos, jabalíes (Takahashi y col., 2004) y ratas (Karetnyi y col., 1993). Asimismo, se han detectado anticuerpos anti-VHE tanto en áreas endémicas como no endémicas, en aves de corral (Sun y col., 2004), cánidos (Arankalle y col., 2001; Vitral y col., 2005), cérvidos (Sonoda y col., 2004), félidos (Kuno y col., 2003), ganado vacuno (Arankalle y col., 2001; Vitral y col., 2005), roedores (Favorov y col., 2000; Kabrane-Lazizi y col., 1999; Vitral y col., 2005), suidos (Chandler y col., 1999; Fernandez-Barredo y col., 2006; Hsieh y col., 1999; Meng y col., 1997; Sonoda y col., 2004) y vivérridos (Nakamura y col., 2006).

Tras el hallazgo del VHE en humanos, se realizaron infecciones experimentales para encontrar un modelo animal de estudio de la hepatitis E. De este modo se consiguió reproducir la excreción del virus en heces tras su inoculación parenteral en distintas especies animales como cerdos (Meng y col., 1998b; Usmanov y col., 1991a), corderos (Usmanov y col., 1994), ratas (Maneerat y col., 1996) y primates (Cuyck-Gandre y col., 1998; Meng y col., 1998b). Se ha estimado que la dosis infectante para los macacos es 10.000 veces menor cuando se infectan por vía intravenosa que cuando se utiliza la vía oral (Tsarev y col., 1994). Por lo tanto, mientras que la infección se adquiere normalmente por vía oral en infecciones naturales, en las experimentales es más efectiva la vía parenteral. Además, el desarrollo de los signos clínicos en los animales

infectados experimentalmente es dependiente de la dosis. En este sentido, la dosis que se necesita para producir la enfermedad es 1.000 veces mayor que la requerida para lograr la infección (Tsarev y col., 1994).

Las lesiones histopatológicas se observan fundamentalmente en el hígado. La gravedad de éstas depende principalmente de la cepa de virus empleada, así la cepa mejicana se ha mostrado como la más virulenta, seguida de la Sar55 (Pakistán) y de la US 2 (Estados Unidos) (Tsarev y col., 1994).

En los animales infectados experimentalmente, la enfermedad no se cronifica y produce un cuadro moderado con síntomas apenas detectables (Arankalle y col., 1999a; Balayan y col., 1990; Kasorndorkbua y col., 2003; Krawczynski y col., 1989; Maneerat y col., 1996; Meng y col., 1998a; Meng y col., 1998b; Tsarev y col., 1995).

Hasta el momento, no se ha podido reproducir la elevada mortalidad sufrida durante las infecciones naturales en mujeres embarazadas, cuando se inocula el VHE a hembras preñadas de macaco (Arankalle y col., 1993; Tsarev y col., 1995) o a cerdas gestantes (Kasorndorkbua y col., 2003).

### **1.9. EL VHE COMO AGENTE ZONÓTICO**

La secuenciación genómica y el posterior estudio filogenético de los diferentes aislados del VHE han mostrado una relación estrecha entre los virus de origen porcino y los de origen humano de la misma zona geográfica (Fig.5) en países como Japón (Takahashi y col., 2003), Korea (Ahn y col., 2005), Reino Unido (Ijaz y col., 2005), Taiwán (Hsieh y col., 1999) y USA (Meng y col., 1997), mientras que el porcentaje de homología se reduce entre cepas de diferentes zonas. De forma paralela a estos hallazgos, se han descrito casos de transmisión directa por ingestión de hígado crudo o poco cocinado de cerdo, en

los que dos cepas aisladas de un estudio en hígados vendidos en carnicerías coincidían en un 100% a nivel nucleotídico con las cepas halladas en dos pacientes con hepatitis E autóctona (Yazaki y col., 2003). Asimismo, en este estudio se encontró que el 1,9% de los hígados estudiados contenían el ARN del VHE. También se han descrito casos de HE en personas que habían ingerido carne de ciervo e hígado de jabalí poco cocinados (Takahashi y col., 2004; Tei y col., 2003). Estos hallazgos y los niveles de seroprevalencia encontrados en población sana de países industrializados han conducido a la aceptación cada vez mayor del VHE como un agente zoonótico. Sin embargo, las vías por las cuales el VHE permanece en el medio ambiente y llega al hombre se desconocen. Aunque se ha demostrado la posibilidad de infección cruzada entre especies mediante infecciones experimentales con aislados humanos del VHE en cerdos y con aislados porcinos en primates (Meng y col., 1998b), no existe evidencia de la transmisión directa del VHE desde el ganado porcino al hombre. Parece ser que los genotipos 3 y 4, que son los que se han identificado en el cerdo y en el hombre con una elevada homología entre sí, serían los genotipos zoonóticos, mientras que el 1 y el 2 se encontrarían únicamente en la especie humana. Dicha teoría se ve avalada por el trabajo realizado por Arankalle y col. en 2002, en el que en un país hiperendémico por el VHE como la India, solamente el genotipo 1 se ha identificado en humanos mientras que en el ganado porcino únicamente se ha descrito el genotipo 4. Este mismo patrón se ha observado en Méjico y Tailandia, países en los que se han producido casos de HE en humanos por el genotipo 2 y 1 respectivamente, y sin embargo, las secuencias porcinas de dichos países pertenecen al genotipo 3 (Cooper y col., 2005).



## **1.10. DIAGNÓSTICO**

En las áreas endémicas, el VHE se considera una de las principales causas de hepatitis (Irshad, 1999). En áreas no endémicas, se considera su diagnóstico cuando el paciente ha viajado recientemente a zonas endémicas y si se han descartado previamente las causas más comunes de hepatitis y colestasis.

El método de diagnóstico más utilizado en la actualidad es el enzimo-inmunoensayo (EIA) para detectar anticuerpos anti-VHE de clase IgG (anti-VHE IgG) e IgM (anti-VHE IgM) en suero (Favorov y col., 1994), siendo conveniente realizar este tipo de técnica en la fase aguda de la enfermedad para evitar falsos negativos. Los antígenos que se utilizan son proteínas recombinantes o péptidos sintéticos que se corresponden con epítomos inmunodominantes de proteínas estructurales del VHE (ORF2 y ORF3) pertenecientes a las cepas Burma (genotipo 1) y México (genotipo 2) (Favorov y col., 1992). No obstante, las técnicas inmunoenzimáticas se muestran más sensibles en el caso de individuos con cuadros sintomáticos que en asintomáticos (Myint y col., 2006).

Recientemente, se ha desarrollado un método rápido (Chen y col., 2005) de detección de anticuerpos de tipo IgM en suero mediante una técnica de inmunocromatografía, usando un anticuerpo monoclonal adherido a una membrana. Dicha técnica presentó una sensibilidad del 96,7% y una especificidad del 98,6% cuando fue comparada con un ELISA comercial en sueros de pacientes procedentes de epidemias. Éste método, que se realiza en 15 minutos, resultaría especialmente útil en epidemias, puesto que se puede realizar por personal no sanitario en el lugar de la toma de muestras, permitiendo acortar el tiempo de diagnóstico. La detección de anti-VHE IgM constituye un buen indicador de la fase aguda de la infección. Sin embargo, la

especificidad no es demasiado elevada puesto que se han producido falsos positivos en pacientes con elevación del factor reumatoide, el cual tiene afinidad por la fracción constante de las inmunoglobulinas. Por otra parte, también pueden darse falsos negativos por la presencia de un exceso de inmunoglobulinas anti-VHE de clase G o A, ya que éstas compiten por el mismo lugar de unión antigénico que las de clase M (Hermann y col., 1995).

A principios de los 90, se propuso utilizar la detección de los anticuerpos anti-VHE de clase IgA (anti-VHE IgA) para confirmar la infección reciente por el VHE (Chau et al 1993). Existe un estudio reciente (Takahashi y col., 2005a) en el que se ha observado que la duración de los anti-VHE IgA tienen una duración similar a los anti-VHE IgM en la infección por el VHE, y además presentan una especificidad del 100%, por lo que podría constituir una alternativa a la detección de anti-VHE IgM. La detección de anti-VHE IgG puede indicar una infección por VHE previa, mientras que los títulos muy elevados de anti-VHE IgG, incluso sin detección de anti-VHE IgM, sugieren una infección en fase aguda (Favorov y col., 1994). El método confirmatorio de elección es la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR), tanto en suero como en heces. El ARN del virus se ha encontrado en heces una semana antes del inicio de los síntomas y persiste una media de dos semanas (Ticehurst y col., 1992).

La inmunomicroscopía electrónica solamente se realiza en laboratorios altamente especializados, por lo que no se suele recurrir a esta técnica de forma rutinaria.

En ganado porcino, el diagnóstico de la infección se ha realizado únicamente con el fin de realizar estudios epidemiológicos y en infecciones experimentales,



ya que la infección por el VHE es asintomática en cerdos. Los métodos de detección se basan en detección de inmunoglobulinas principalmente de clase G, y en menor proporción, de clase M y clase A. Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre la detección de anti-VHE IgG o la de IgM con la presencia de viremia en cerdos, mientras que sí se ha observado para los anti-VHE IgA (Takahashi y col., 2005b). Por ello, hasta el momento la única manera de detectar la infección activa en cerdos es la detección del ARN vírico o de los anticuerpos anti-VHE IgA.

## **1.11. PROFILAXIS**

### **1.11.1. Medidas de control**

Las medidas de control de la infección por el VHE se circunscriben a la desinfección adecuada del agua potable en regiones endémicas, así como el cumplimiento de las normas generales de higiene para la población. La falta de medidas más específicas se debe a que existe todavía un gran desconocimiento de las vías por las cuales el virus llega a la población, sobre todo en países industrializados, en los que el abastecimiento de agua cumple los requisitos de salubridad para consumo.

### **1.11.2. Vacunas**

En la actualidad no existe ninguna vacuna comercializada para prevenir la infección por el VHE. La producción de vacunas muertas o atenuadas es inviable ya que no existe un sistema eficiente de cultivo del virus. Por ello, las investigaciones que se están llevando a cabo se centran fundamentalmente en la producción de vacunas basadas en la obtención mediante diferentes técnicas de proteínas recombinantes a partir de fragmentos del ORF2

(Emerson y col., 2001). De todas estas técnicas, la que ha resultado más eficiente ha sido el sistema de producción en *Baculovirus*. Se ha demostrado que el ORF2 en los cuatro genotipos conocidos es la zona diana de los anticuerpos neutralizantes (Tam y col., 1991), y que éstos son suficientes para inmunizar frente a la infección por el VHE (Tsarev y col., 1994a). Entre las regiones evaluadas dentro del ORF2, el fragmento que corresponde a los aminoácidos 112 a 607 es el que mejor resultado ha proporcionado en los ensayos de inmunización realizados en macacos (Robinson y col., 1998; Zhang y col., 2002). En ensayos pre-clínicos en monos Rhesus (Purcell y col., 2003; Zhang y col., 2002), se ha observado que la aplicación de dos dosis de 1 µg de esta proteína recombinante confiere una inmunidad durante 6 meses frente a cepas virulentas de los genotipos 1, 2 y 3.

Recientemente, se han publicado varios trabajos que describen la formación de "Virus-Like Particles" (VLPs), las cuales se constituyen de manera espontánea a partir de la agrupación de monómeros de un ORF2 truncado en su extremo N-terminal en el aminoácido 111 (Li y col., 2005). Las VLPs inducen la producción de inmunoglobulinas anti-VHE de clase M, G y A, no sólo cuando son inoculadas por vía parenteral en animales de experimentación, sino también cuando se administran por vía oral, ya que resisten al pH gástrico (Li y col., 2001).

De todos los antígenos obtenidos hasta el momento, el único que se encuentra en fase de ensayo clínico como vacuna es el 56 ku. Esta proteína ha sido obtenida con un sistema de *Baculovirus* por el NIH (National Institutes of Health) en los Estados Unidos. En una primera fase se evaluó en 88 voluntarios norteamericanos y 22 voluntarios nepalíes observándose la

aparición de una respuesta inmune y la ausencia de efectos adversos (Stevenson 2000). En la actualidad, dicha vacuna se encuentra en fase II y está siendo probada en unos 2000 voluntarios en Nepal.



## **2. OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS**

Con los antecedentes descritos en la introducción, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Investigar la prevalencia del ARN del VHE tanto en heces como en suero de una población porcina perteneciente a la Comunidad Valenciana en sus diferentes etapas productivas.
2. Determinar el riesgo de contraer la infección por el VHE en cada una de las etapas productivas estudiadas.
3. Averiguar la prevalencia del VHE existente en granjas porcinas de la Comunidad Valenciana.
4. Determinar la prevalencia del VHE en las fosas de purines de las explotaciones porcinas estudiadas.
5. Identificar nuevas cepas de VHE de origen porcino en España, analizando el grado de relación filogenética que existe entre éstas y otras cepas tanto humanas como porcinas pertenecientes a áreas geográficas diferentes.





### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

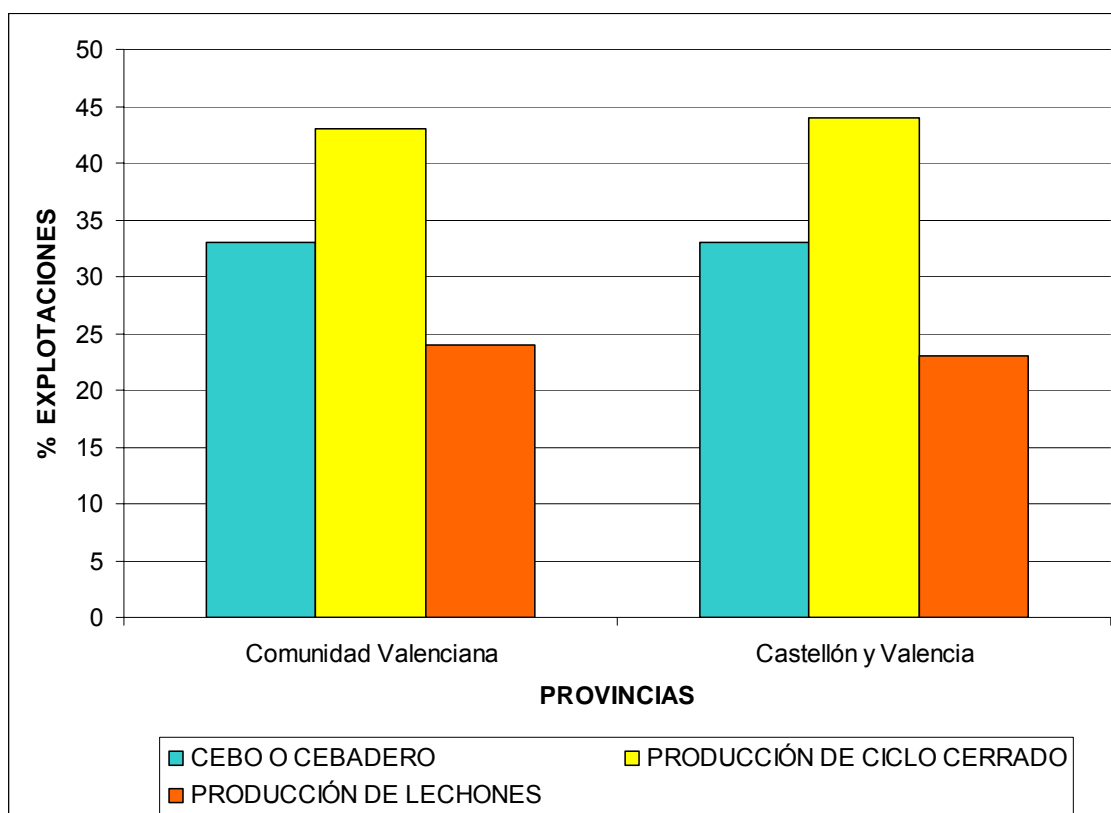


### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. ZONA DE ESTUDIO

El trabajo se desarrolló dentro del ámbito de la Comunidad Valenciana. Tras el estudio del censo porcino obtenido a partir de los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en diciembre de 2002, se seleccionaron para el muestreo las provincias de Castellón y Valencia, ya que entre ambas agrupan el 94% de la producción porcina de la Comunidad Valenciana. No obstante con el fin de evitar sesgos en el estudio, se evaluaron las distribuciones de los tipos de explotaciones en ambas provincias. Las distribuciones en Castellón y Valencia fueron similares a las existentes en el conjunto de la Comunidad Valenciana según puede observarse en la fig. 6.

**Figura 6. Comparación de la distribución de las explotaciones de la Comunidad Valenciana con respecto a las provincias seleccionadas para realizar el muestreo.**



### **3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y TAMAÑO MUESTRAL**

En el momento del inicio del estudio, el censo porcino en la Comunidad Valenciana estaba compuesto por un total de 1.129.053 animales (Servicio de Estadística del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), distribuidos en función de su etapa productiva según muestra la tabla 3.

**Tabla 3. Distribución de la cabaña porcina en diciembre de 2002 en la Comunidad Valenciana, en función de la etapa productiva.**

<b>ETAPA PRODUCTIVA</b>	<b>Nº ANIMALES</b>	<b>% DEL CENSO</b>
LECHONES Y TRANSICIÓN	580.334	51,4%
CEBO	422.266	37,4%
REPRODUCTORAS	112.905	10%
VERRACOS	13.548	1,2%
<b>TOTAL</b>	<b>1.129.053</b>	<b>100%</b>

Para la determinación del tamaño de la muestra, se estableció como población el número de animales reseñado en el censo porcino de la Comunidad Valenciana del año 2002, así como los únicos datos disponibles en el momento del inicio del estudio, que cifraban la seroprevalencia de la infección por el VHE en cerdos en un 13,7% (Clemente-Casares y col., 2003). Con estas premisas, el tamaño muestral se calculó utilizando el programa Win Episcopo® versión 2.0, estableciendo un nivel de confianza del 95% y una precisión del 5%. El número mínimo de animales a muestrear se fijó en 185. Finalmente, el número de cerdos muestreados fue de 191. Los animales se distribuyeron para su estudio en función de la etapa productiva en la que se hallaban en ese momento en diferentes estratos, los cuales abarcan desde el parto hasta el

sacrificio de los cerdos cebados (tabla 4). Dichos estratos se definen a continuación:

- Lechones: en esta etapa se incluyeron los animales que en el momento del muestreo se encontraban entre el nacimiento y el destete. Habitualmente, los lechones en esta etapa se hallan lactando con la madre hasta las 3-4 semanas de edad.
- Transición: esta etapa incluye cerdos que en el momento del muestreo ya habían sido destetados y trasladados a otro tipo de instalaciones donde normalmente confluyen animales de varias camadas distintas ampliándose así el tamaño de los lotes. El periodo de transición suele abarcar desde las 3 hasta las 8 o 12 semanas de vida, dependiendo del tipo de granja.
- Cebo: esta etapa comprende animales que en el momento del muestreo habían finalizado la fase de transición, aproximadamente a las 8 o 12 semanas de vida, hasta el momento del sacrificio a los 6 meses de edad. Considerando que el cebo es la etapa de mayor duración, se ha dividido en 3 sub-etapas para su mejor estudio. Así, se han distribuido los cerdos en aquellos que se encontraban en el primer, segundo o tercer mes de cebo.
- Reproductoras: dentro de esta etapa se incluyeron las cerdas adultas que se encontraban en el momento del muestreo criando lechones. Todas ellas superaban los 6 meses de edad.
- Verracos: en esta categoría se incluyeron los machos mayores de 6 meses utilizados como sementales.

**Tabla 4. Distribución de los animales muestreados en función de la etapa productiva en que se encontraban en el momento del muestreo.**

<b>ETAPA PRODUCTIVA</b>	<b>Nº ANIMALES</b>	<b>PORCENTAJE</b>
LECHONES	34	17,8%
TRANSICIÓN	49	25,6%
CEBO	66	34,5%
REPRODUCTORAS	38	19,9%
VERRACOS	4	2,1%
<b>TOTAL</b>	<b>191</b>	<b>100%</b>

El muestreo se realizó de forma aleatoria y estratificada en 21 granjas pertenecientes al área reseñada en el apartado 3.1. La distribución de las granjas en función del tipo de producción, se detalla en la tabla 5.

**Tabla 5. Distribución de las granjas en función del tipo de producción y número de animales muestreados en cada tipo de granja.**

<b>TIPO DE EXPLOTACIÓN</b>	<b>Nº DE GRANJAS</b>	<b>% DE GRANJAS</b>	<b>Nº DE ANIMALES</b>
PRODUCTORA DE LECHONES	7	35,0%	57
CICLO CERRADO	3	15,0%	76
CEBADERO	11	50,0%	58
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>100%</b>	<b>191</b>

Las granjas se clasificaron atendiendo al tipo de producción en:

- Granjas productoras de lechones: albergan hembras reproductoras y lechones en la misma nave. Cuando los lechones son separados de las madres se trasladan a una nave diferente durante la fase de transición.
- Cebaderos: albergan cerdos que ya han finalizado la fase de transición hasta que alcanzan el peso definitivo para ser llevados al matadero.

- Granjas de ciclo cerrado: este tipo de granjas alberga todas las etapas productivas, desde el nacimiento de los lechones hasta su envío al matadero, además de hembras reproductoras.

El número mínimo de animales muestreados en cada granja se determinó de manera proporcional al número de animales que albergaba y en función del tipo de explotación:

- Productoras de lechones con un número menor de 250 animales: 3 madres y 3 lechones.
- Productoras de lechones con un número mayor de 250 animales: 4 madres y 4 lechones.
- Cebaderos con un número menor de 250 animales: 3 cerdos
- Cebaderos con un número mayor de 250 animales: 4 cerdos
- Cebaderos con un número mayor de 500 animales: 8 cerdos
- Granjas de ciclo cerrado con un número menor de 250 animales: 3 animales de cada etapa productiva.
- Granjas de ciclo cerrado con un número mayor de 250 animales: 4 animales de cada etapa productiva.

Cada muestra se seleccionó de forma aleatoria de corrales diferentes.

### **3.3. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Con el fin de investigar el efecto de la etapa productiva en la excreción del VHE en heces porcinas o su presencia en el suero de los animales muestreados, se aplicó la técnica de regresión logística binomial. Adicionalmente, se calcularon los Odds Ratio (OR) asociados a cada etapa con sus correspondientes intervalos de confianza. La bondad de ajuste del modelo obtenido se determinó

mediante la prueba de Hosmer-Lemeshow. Todos los cálculos estadísticos se realizaron usando el programa SPSS® versión 12.0.

### **3.4. TOMA DE MUESTRAS**

En todos los animales objeto de este estudio, se obtuvieron muestras de heces y sangre simultáneamente. De forma adicional, se tomaron muestras de la fosa de purines de cada granja. Todas las muestras fueron remitidas en el mismo día de su recogida al laboratorio y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

#### **3.4.1. Muestras de heces**

Las muestras fueron tomadas directamente del recto en envases estériles de boca ancha en animales adultos. En los cerdos cuyo tamaño no permitió este tipo de manipulación, la muestra fecal se obtuvo mediante un bastoncillo estéril introducido en el recto.

#### **3.4.2. Muestras de sangre**

Las muestras de suero se obtuvieron mediante punción aséptica de la vena cava anterior en animales en la fase de transición, cebo y reproductores. Para ello, se inmovilizó al animal con un lazo de metal colocado en la mandíbula superior. Tras la desinfección de la zona más baja del canal yugular con etanol 70°, se procedió a la punción con vacutainer y posterior recolección de 5 mL de sangre en un tubo de vidrio sin anticoagulante. En lechones, la toma de sangre se realizó colocando al animal en decúbito supino para realizar la extracción a partir de la vena yugular en condiciones asépticas.



### 3.4.3. Muestras de fosas de purines

Se recogió una muestra de 100 mL de la superficie de la fosa de purines de cada granja en envases estériles de boca ancha.

### 3.4.4. Datos de las explotaciones

En todas las explotaciones se elaboró un breve cuestionario (fig. 7) para conocer el tipo de explotación, edad, sexo de los animales muestreados y número de cerdos en la granja.

Figura 7. Cuestionario a rellenar durante la toma de muestras en la explotación

#### FICHA DE IDENTIFICACIÓN DE LA EXPLOTACIÓN

Tipo de explotación:

Nº animales machos:

Hembras:

Raza:

	EDAD	SEXO	Nº IDENTIFICACIÓN
<i>Muestra 1</i>			
<i>Muestra 2</i>			
<i>Muestra 3</i>			
<i>Muestra 4</i>			
<i>Muestra 5</i>			
<i>Muestra 6</i>			
<i>Muestra 7</i>			
<i>Muestra 8</i>			

### **3.5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.**

#### **3.5.1. Muestras de heces**

Las heces se diluyeron al 10% (P/V) en PBS estéril pH 7,2 sin calcio ni magnesio en un tubo estéril de fondo cónico de 15 mL y se agitaron vigorosamente en un vórtex hasta su total disolución.

Posteriormente, se sometieron a una centrifugación (Centrífuga DIGICEN-R; ORTO ALRESA, España) a 2000xg, durante 10 minutos a temperatura ambiente con objeto de que el material más grosero así como todo el material celular descendiera al fondo del tubo.

El sobrenadante así obtenido, fue sometido inmediatamente a la extracción del ARN VHE o bien se alicuotó en tubos estériles de 1,5 mL y se conservó a -80°C hasta su procesamiento.

#### **3.5.2. Muestras de sangre**

Las muestras de sangre obtenidas se centrifugaron a 2000xg, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras este procedimiento, el suero obtenido se alicuotó en tubos estériles de 1,5 mL y fue sometido inmediatamente a la extracción del ARN VHE o bien se conservó a -80°C hasta su procesamiento.

#### **3.5.3. Muestras de fosas de purines**

Los purines se sometieron directamente a una centrifugación a 2000xg, durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue sometido inmediatamente a la extracción del ARN VHE o bien se alicuotó en tubos estériles de 1,5 mL y se conservó a -80°C hasta su procesamiento.

### **3.6. EXTRACCIÓN DEL ARN VÍRICO DE LAS MUESTRAS**

Para la extracción del ARN vírico se utilizó un método comercial (QIAamp® Viral Mini Kit; Qiagen, USA) cuyo principio se basa en la adhesión del ARN a una membrana de sílica gel ubicada en una mini columna para posteriormente ser eluído con un tampón específico. Durante todo el proceso de extracción se siguieron las siguientes medidas de seguridad para evitar la contaminación cruzada de las muestras: uso de guantes, pipetas con filtro, desinfección de guantes con hipoclorito sódico 40g/L entre la manipulación de cada muestra, y descontaminación del espacio de trabajo, pipetas, centrifugas, rotuladores y demás utensilios antes y después de cada extracción. El procedimiento de extracción fue el que se describe a continuación:

- Se añadieron 140 µL de muestra (sobrenadante alicuotado anteriormente) a 560 µL de tampón de lisis a temperatura ambiente, con objeto de crear unas condiciones desnaturalizantes que inactivaran las ARNasas y degradasen todo lo que no fuera ARN (células, envoltura vírica, etc.). La composición de dicho tampón optimiza la unión del ARN a la membrana de la columna. La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex (MS2 minishaker; IKA®, Dinamarca) durante 15 segundos y se permitió actuar el tampón de lisis durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- A continuación se realizó una centrifugación a 6000xg durante 30 segundos en una centrífuga (mini spin; Eppendorf, Alemania) para tubos de 1,5 mL, con el objetivo de desplazar las gotas de muestra desde la tapa del tubo y evitar así contaminaciones de un tubo a otro al pipetear.

- Se añadieron 560  $\mu$ L de etanol absoluto (Panreac, España) y se agitó vigorosamente el tubo en el vórtex durante 15 segundos para conseguir la precipitación del ARN.
- Se añadió la mezcla anterior a una mini columna compuesta de una membrana de sílica gel; el ARN y todos los componentes precipitados quedaron así adheridos a dicha membrana.
- Se centrifugó durante 1 minuto a 6000xg la mini columna para poder eliminar el líquido y mantener solamente el filtro y su contenido adherido.
- Seguidamente, se hicieron pasar por el filtro 2 tipos de tampón de lavado con unas características específicas de pH y concentración de sales, que eliminan los restos de enzimas y detritus que pudieran permanecer en la membrana, mediante centrifugaciones sucesivas a 6000xg durante un minuto para el tampón de lavado nº 1 y a máxima velocidad durante 3 minutos para el tampón de lavado nº 2.
- Se añadió un tampón de elución a la membrana, permitiendo su actuación durante un minuto a temperatura ambiente para separar el ARN de la membrana. Finalmente, el ARN se eluyó de la mini columna mediante una centrifugación a 6000xg durante un minuto a temperatura ambiente.
- El ARN obtenido se procesó inmediatamente para evitar su degradación por las RNAsas. El ARN restante, después de ser usado, se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.7. TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL ARN VÍRICO**

El método de transcripción inversa seguido fue el descrito por el fabricante de la ARN polimerasa (Invitrogen, USA):

- Se mezclaron 10µL del ARN extraído (1ng-5µg), 1µL de una mezcla de dinucleótidos (dTTP, dATP, dCTP, dGTP; Geneamp® Applied Biosystems, USA) a una concentración de 10 mM y 1 µL del cebador 3157N (Tabla 5) en un tubo de 0,2 mL de capacidad.
- Se colocó el tubo con la mezcla en el termociclador (GeneAmp® PCR System 2700, Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA), y se incubó a 65°C durante 5 minutos para permitir que el cebador se uniera a la secuencia diana.
- Inmediatamente tras la incubación, se dispusieron los tubos sobre hielo picado para evitar plegamientos de la hebra de ARN sobre sí misma y detener la reacción.
- Se centrifugó el tubo para asegurar la mezcla adecuada de todos los reactivos.
- Se añadieron a los tubos 4 µL de tampón 5X (5X first strand buffer, Invitrogen, USA) específico para la retrotranscripción, 2 µL de una disolución 0,1 M de ditioneitol (DTT Invitrogen, USA) que estabiliza la mezcla favoreciendo la unión del cebador a la secuencia diana y 1 µL de un inhibidor recombinante de ribonucleasas (RNaseOUT®, Invitrogen, USA) a una concentración de 40 U/µL.
- Se incubó durante 2 minutos a 42 °C para estabilizar la reacción y eliminar las ribonucleasas.

- Se añadió 1  $\mu$ L (200 U) de retrotranscriptasa perteneciente al virus de la leucemia murina (Superscript® II RT, Invitrogen, USA).
- Se incubó a 42 °C durante 50 minutos para permitir la formación del ADNc de la hebra de ARN.
- Tras este tiempo, se elevó la temperatura a 70°C durante 15 minutos para inactivar la polimerasa y detener la reacción.

El ADNc obtenido se almacenó a -80°C hasta su procesamiento, o se procedió a su amplificación.

### **3.8. AMPLIFICACIÓN DEL ADNc. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ANIDADA (NESTED-PCR)**

El ADNc obtenido durante la retrotranscripción se amplificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa anidada. Para ello, se utilizaron dos parejas de iniciadores degenerados (Qiagen® Operon®, USA), unos externos que amplifican un fragmento de 730 pares de bases durante una primera PCR, y otros internos que amplifican un fragmento de 348 pares de bases en una segunda PCR, ambos pertenecientes a la región ORF2 (tabla 6).

**Tabla 6.- Iniciadores utilizados en la nested-PCR**

	CEBADORES (posición <sup>a</sup> )	SECUENCIA
EXTERNOS	3156N (5728-5749)	5'-AATTATGCY CAGTAYCGRGTTG -3'
	3157N (6436-6458)	5'-GAGAATGCKCAGCARGAYAAGGG -3'
INTERNOS	3158N (6013-6034)	5'-GTWATGCTYTG CATWCATGGCT -3'
	3159N (6339-6360)	5'-GACAGAATTGATTT CGTCGGCT -3'

<sup>a</sup> La posición de los iniciadores corresponde a la alineación de estos con la cepa prototipo porcina de EEUU con número de acceso AY575859 en la base de datos de Genbank.

Los iniciadores se tomaron de la publicación realizada por Huang y col., en 2002. Éstos se diseñaron con el objeto de ser universales, es decir, que pudieran amplificar cualquier genotipo del VHE y para ello se basaron en las secuencias de 18 cepas humanas diferentes de VHE y en la cepa prototipo porcina de Estados Unidos.

Para llevar a cabo esta reacción, se utilizaron 5  $\mu$ L de ADNc en un volumen total de 50  $\mu$ L de mezcla. La composición de dicha mezcla se describe en las tablas 7 y 8. Todos los pasos para elaborar dicha mezcla se realizaron en una campana de flujo laminar con el objeto de evitar contaminaciones.

Tabla 7. Composición de la mezcla de reacción para la primera PCR.

REACTIVO	C <sub>i</sub>	VOLUMEN	C <sub>f</sub>
Agua bidestilada estéril	-	30 µL	-
Tampón de reacción sin Cloruro de Magnesio (MgCl <sub>2</sub> ) (Applied Biosystems, USA)	10X	5 µL	1X
Mezcla de dinucleótidos: dTTP, dATP, dCTP, dGTP (Applied Biosystems, USA)	10 mM	4 µL	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> (Applied Biosystems, USA)	25 mM	3 µL	1,5 mM
Taq polimerasa (Amplitaq gold®; Applied Biosystems, USA)	5 U/µL	0,5 µL	2,5 U/50 µL de reacción
Cebador 3156N (Qiagen® Operon®, USA)	20 µM	1,25 µL	0,5 µM
Cebador 3157N (Qiagen® Operon®, USA)	20 µM	1,25 µL	0,5 µM
Muestra de ADNc	-	5 µL	-
Volumen total de reacción	50 µL		
C <sub>i</sub> = Concentración inicial; C <sub>f</sub> = Concentración final			



Tabla 8. Composición de la mezcla de reacción para la segunda PCR

REACTIVO	C <sub>i</sub>	VOLUMEN	C <sub>f</sub>
Agua bidestilada estéril	-	30 µL	-
Tampón de reacción sin Cloruro de Magnesio (MgCl <sub>2</sub> ) (Applied Biosystems, USA)	10X	5 µL	1X
Mezcla de dinucleótidos: dTTP, dATP, dCTP, dGTP (Applied Biosystems, USA)	10 mM	4 µL	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> (Applied Biosystems, USA)	25 mM	3 µL	1,5 mM
Taq polimerasa (Amplitaq gold®; Applied Biosystems, USA)	5 U/µL	0,5 µL	2,5 U/50 µL de reacción
Cebador 3156N (Qiagen® Operon®, USA)	20 µM	1,25 µL	0,5 µM
Cebador 3157N (Qiagen® Operon®, USA)	20 µM	1,25 µL	0,5 µM
Muestra de producto de la primera PCR	-	5 µL	-
Volumen total de reacción	50 µL		
C <sub>i</sub> = Concentración inicial; C <sub>f</sub> = Concentración final			

Tabla 9. Protocolo de amplificación del ADNc

DESNATURALIZACIÓN (HOT START)	95°C / 9 MINUTOS	
DESNATURALIZACIÓN	94°C / 1 MINUTO	40 CICLOS
HIBRIDACIÓN	55°C / 30 SEGUNDOS	
POLIMERIZACIÓN	72°C / 1 MINUTO	
POLIMERIZACIÓN RESIDUAL	72°C / 7 MINUTOS	

En la tabla 9 se describe el protocolo de amplificación, común tanto para la primera como para la segunda PCR. La temperatura de hibridación ( $T_a$ ) se ajustó teniendo en cuenta la temperatura melting ( $T_m$ ) proporcionada por el fabricante de los oligonucleótidos, teniendo en cuenta el porcentaje de guanina-citosina de los cebadores utilizados.

$$T_m = 81,5 - 16,6 (\log_{10} \{Na^+\} + 0,41 (\%G+C) - (600/L))$$

$$T_a = T_m - 5^\circ C$$

$T_m$ : temperatura melting. Temperatura a la cual el 50% de las cadenas de ADN se encuentran desnaturalizadas

$\{Na^+\}$ : concentración de sodio

L: número de bases que tiene el oligonucleótido

$T_a$ : temperatura de hibridación

Previamente a la amplificación, se realizó un paso denominado "hot start" a una temperatura de 95°C durante 9 minutos.

A continuación se realizaron 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y polimerización, para concluir con un paso de 7 minutos a 72°C con el objeto de permitir que las cadenas de ADN que se han creado en el último ciclo se elongaran hasta el tamaño deseado (polimerización residual).

El producto de la primera PCR, de 730 pares de bases de longitud (fig. 8), se utilizó como muestra para la segunda PCR. Se añadieron 5  $\mu$ L a la mezcla de reacción de la segunda PCR y se realizó el mismo protocolo de amplificación que para la primera PCR.

En las ocasiones en las que no fue posible realizar inmediatamente el siguiente paso, el producto de PCR se congeló a -80°C hasta su procesamiento. El producto de la segunda PCR tiene una longitud de 348 pares de bases y se almacenó a -80°C hasta su electroforesis y posterior secuenciación.

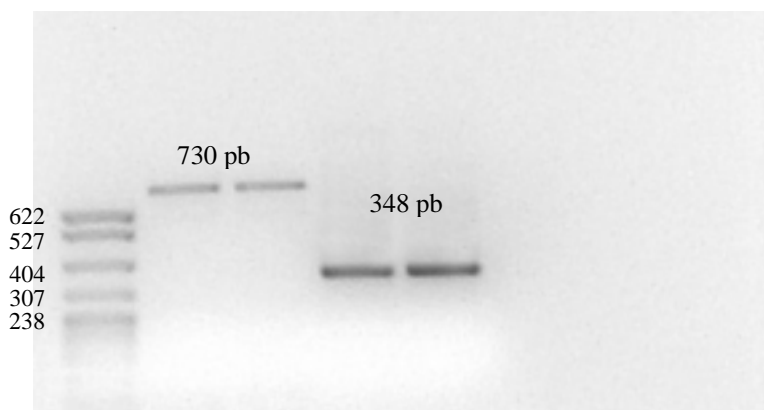
### **3.9. ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO AMPLIFICADO**

El producto de 348 pares de bases se hizo correr en un gel de agarosa al 2% (P/V) en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) (fig. 8). Para la elaboración del gel se realizó el siguiente procedimiento:

- Se pesaron 2 gramos de agarosa y se disolvieron en 100 mL de tampón TAE para elaborar un gel de 10 x 15 cm con capacidad para 20 muestras.
- Se llevó a ebullición en microondas, hasta que se hubo disuelto completamente la agarosa.
- Se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/mL.
- A continuación, se mezclaron 2  $\mu$ L de tampón de carga con 10  $\mu$ L del producto de la 2ª PCR y se depositaron en el pocillo del gel.

- En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular (pBR322 DNA-Msp I Digest; Biolabs, USA), que comprende 26 fragmentos, desde 622 hasta 67 pares de bases. Se añadieron al pocillo 1  $\mu$ L del marcador de peso molecular más 5  $\mu$ L del tampón de carga.
- En cada gel se incluyeron los controles positivo y negativo que se habían introducido desde el comienzo del proceso.
- Mediante una fuente de electroforesis (Power Pack 300 Biorad®, USA), se aplicó una corriente de 80 mV durante 1 hora a través del gel.
- La aparición de bandas se observó mediante un transiluminador (Syngene, Synoptics Ltd, United Kingdom)

**Figura 8. Productos de la primera y segunda PCR. Línea 1, marcador de peso molecular, líneas 2 y 3, productos de la 1ª PCR, líneas 4 y 5, productos de la 2ª PCR**



### **3.10. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS EN LA RT-NESTED-PCR.**

Con objeto de confirmar los productos positivos de la RT-nested PCR descrita en los apartados 3.7 y 3.8, se procedió a la secuenciación de los amplicones.

Dicha secuenciación se realizó mediante los siguientes pasos:

### **3.10.1. Purificación de los productos de PCR.**

La purificación de los productos de PCR se realizó usando dos métodos diferentes atendiendo al número de bandas observadas en el gel de agarosa.

#### **3.10.1.1. Purificación del producto de PCR directamente desde el tubo en el que realizó la segunda reacción de amplificación.**

Este tipo de purificación se realizó cuando en el gel se observaron bandas únicas con un peso molecular igual al esperado en la segunda amplificación (348 pb). Para ello, se utilizó el kit Ultraclean PCR clean-up kit® (MO BIO lab. Inc. Carlsbad CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Se añadieron 5 volúmenes del reactivo Spinbind al producto de PCR y se pipeteó hasta su completa mezcla. Tras ello, se transfirió la mezcla a una minicolumna con filtro de sílica gel dentro de un tubo de 2 mL y se centrifugó durante 30 segundos a 10000  $xg$  en una microcentrífuga. El líquido resultante de la centrifugación se eliminó por decantación y se procedió a añadir a la minicolumna un tampón de lavado, seguido de otra centrifugación durante el mismo tiempo y a la misma velocidad que la anterior. El líquido resultante se volvió a eliminar y se realizó una centrifugación adicional para retirar cualquier resto de tampón de lavado. Tras este paso, se colocó el filtro en un tubo nuevo y se procedió a la elución del ADN en 50  $\mu L$  de agua bidestilada a pH 8 mediante una última centrifugación a 10000  $xg$  durante 60 segundos. El ADN obtenido se almacenó a  $-20^{\circ} C$  hasta su uso, excepto 2  $\mu L$  que fueron utilizados para correr un gel de agarosa con objeto de comprobar que el proceso de purificación había sido realizado correctamente.

#### **3.10.1.2. Purificación del producto de PCR mediante su escisión del gel de agarosa.**

Este tipo de purificación se llevó a cabo cuando se observaron

bandas inespecíficas en el gel de agarosa, para aislar únicamente la banda de interés. Para ello se utilizó el kit Qiaquick gel extraction kit® (Qiagen, USA). Se escindió mediante un escalpelo estéril la banda de interés del gel de agarosa. Se pesó el fragmento de gel y se añadieron 300 µL de tampón QG por cada 100 mg de gel. Se incubó la mezcla a 50 °C durante 10 minutos en un baño, agitando vigorosamente mediante un vórtex cada 3 minutos para disolver completamente la agarosa. Tras la incubación, se añadieron 100 µL de isopropanol por cada 100 mg de gel inicial y se agitó vigorosamente. La mezcla se transfirió a una columna de sílica gel dentro de un tubo de 2 mL y se procedió a su centrifugación a 10000 *xg* durante 1 minuto. El líquido resultante de la centrifugación se eliminó por decantación. Se añadieron a la columna 500 µL de tampón QG para eliminar completamente cualquier resto de agarosa y se centrifugó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Tras eliminar el líquido de centrifugación, se añadieron 700 µL de tampón de lavado y se volvió a centrifugar en iguales condiciones. Se realizó tras este paso una centrifugación adicional para descartar cualquier resto de tampón de lavado y se colocó la minicolumna en un tubo de 1,5 mL estéril. Se añadieron 30 µL de tampón de elución y tras un minuto de incubación se centrifugó durante 1 minuto a 10000 *xg*. El ADN obtenido se almacenó a -20 ° C hasta su uso, excepto 2 µL que fueron utilizados para correr un gel de agarosa con objeto de comprobar que el proceso de purificación había sido realizado correctamente.

### **3.10.2. Reacción de secuenciación**

Para la reacción de secuenciación, se utilizó el kit ABI PRISM Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems, USA). Se

realizaron dos reacciones de secuenciación por cada producto de PCR para obtener las secuencias genómicas de las cadenas complementarias de ADN.

La cantidad de ADN añadida en cada reacción de secuenciación osciló entre 50 y 100 ng /mL. La cantidad de ADN presente en el producto de PCR se estimó mediante su electroforesis en gel de agarosa junto con un marcador de peso molecular calibrado y posteriormente mediante un programa de tratamiento de imágenes que permitió la cuantificación del ADN (Genetools, Syngene, USA). En algunas muestras fue necesario realizar una precipitación previa del ADN para obtener una concentración adecuada. El método de precipitación fue el siguiente:

- Se añadieron al tubo que contenía el producto de PCR 10  $\mu$ L de acetato de sodio 3M pH 5,5. Se completó el volumen con agua destilada estéril hasta alcanzar los 100  $\mu$ L.
- Se añadieron 250  $\mu$ L de etanol 100% y se mezcló vigorosamente.
- Se incubó durante 30 minutos a -20 °C o bien 10 minutos a -80 °C.
- Tras la incubación se centrifugó durante 20 minutos a 13000  $xg$  a 4 °C.
- Se eliminó el sobrenadante por aspiración y se añadieron 200  $\mu$ L de etanol 70% sin agitar el tubo.
- Se centrifugó la muestra a 13000  $xg$  durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante por aspiración.
- Se repitió la adición de etanol 70% y la centrifugación. Se eliminó la mayor cantidad posible de etanol mediante una centrifugación adicional a 13000  $xg$  durante 2 minutos.
- Se introdujeron los tubos abiertos en una estufa de 37 °C durante 5 minutos para que se secase el precipitado completamente.

- El ADN se resuspendió en el volumen de agua necesario para optimizar la concentración en la reacción de secuenciación.

La primera reacción de secuenciación para cada muestra se preparó de la siguiente manera en un volumen total de 10  $\mu\text{L}$ :

- “Terminator ready reaction mix” 2  $\mu\text{L}$
- Tampón 5X 2  $\mu\text{L}$
- DMSO 0,7  $\mu\text{L}$  (7% del volumen de reacción)
- Primer 3158N (0,8  $\mu\text{M}$ ) 2  $\mu\text{L}$
- ADN 50-100 ng/reacción
- Agua bi-distilada estéril hasta completar 10  $\mu\text{L}$  de volumen de reacción.

La segunda reacción de secuenciación para cada muestra se preparó del siguiente modo en un volumen total de reacción de 10  $\mu\text{L}$ :

- “Terminator ready reaction mix” 2  $\mu\text{L}$
- Tampón 5X 2  $\mu\text{L}$
- DMSO 0,7  $\mu\text{L}$  (7% del volumen de reacción)
- Primer 3159N (0,8  $\mu\text{M}$ ) 2  $\mu\text{L}$
- ADN 50-100 ng/reacción
- Agua bi-distilada estéril hasta completar 10  $\mu\text{L}$  de volumen de reacción.

En cada lote de muestras sometido a la reacción de secuenciación se introdujo un control positivo compuesto por el vector pGEM a una concentración final de



0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  con el primer control -21M13 a una concentración final de 0,16  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ .

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp® PCR System 9600 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA). Las condiciones de dicha reacción fueron las siguientes:

- Desnaturalización 94 ° C 3 minutos
- 25 ciclos de:
  - Desnaturalización: 96 ° C 10 segundos
  - Hibridación: 55 ° C 5 segundos
  - Polimerización: 60 °C 4 minutos

### **3.10.3. Precipitación de los productos de la secuenciación**

El protocolo de precipitación fue el siguiente:

- Se realizó una mezcla de etanol con acetato sódico 3 M pH 4,6 y agua en las siguientes proporciones por cada producto de secuenciación: 62,5  $\mu\text{L}$  de etanol 95%, 3  $\mu\text{L}$  de acetato sódico 3M pH 4,6 y 24,5  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril.
- Se añadieron los 90  $\mu\text{L}$  de esta mezcla a los 10  $\mu\text{L}$  de producto de secuenciación y se agitó vigorosamente la mezcla.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó la mezcla durante 20 minutos a 13000  $xg$  a 4° C.
- Se eliminó el sobrenadante decantándolo sobre un papel de filtro.
- Se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de etanol 70% y se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 13000  $xg$ . Se repitió la adición de etanol 70% y la centrifugación. Se eliminó la mayor cantidad posible de etanol mediante una centrifugación adicional a 13000  $xg$  durante 2 minutos.

- Se introdujeron los tubos abiertos en una estufa de 37 °C durante 5 minutos para que se secase el precipitado completamente.

#### **3.10.4. Resuspensión de los precipitados de la reacción de secuenciación**

Se añadieron 30 µL de Template Suppression Reagent® (TSR, Applied Biosystems, Foster City, CA) al precipitado obtenido en el punto anterior y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la hidratación del precipitado. Tras la incubación se agitó vigorosamente la mezcla en un vórtex y se centrifugó a 13000 xg durante 1 minuto.

Posteriormente, la mezcla se introdujo en un bloque térmico (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., MA) a 94 °C durante 3 minutos para desnaturalizar el ADN tras lo que se introdujeron los tubos en hielo y se transfirió la mezcla a tubos ABI 310 (Applied Biosystems, USA) para ser analizados en un secuenciador ABI PRISM® 310.

#### **3.11. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS**

Las secuencias complementarias obtenidas para cada producto de PCR secuenciado, se ensamblaron en el programa Lasergene Seqman® para obtener las secuencias definitivas. Dichas secuencias se introdujeron en la base de datos BLAST de Genbank con objeto de confirmar que pertenecían al fragmento del VHE que se quería amplificar. Una vez comprobada la veracidad de los datos, se realizó el alineamiento múltiple de un fragmento de 172 pares de bases de las secuencias obtenidas con un total de 131 secuencias de origen humano y porcino pertenecientes a los 4 genotipos conocidos y que se detallan

junto con sus números de acceso en la tabla 10. Para el cálculo de las distancias genéticas se usó una matriz ClustalW 1.6, mientras que el análisis filogenético se realizó siguiendo el método de “Neighbor-joining” en base al modelo de Kimura de 2 parámetros con un bootstrap de 1000 repeticiones. Todos estos cálculos se realizaron usando el programa MEGA® 3.1 (Kumar y col. 2004).

La determinación de los porcentajes de homología de nucleótidos entre las diferentes granjas muestreadas se realizó tomando un fragmento de 172 pares de bases, mientras que la comparación de la homología nucleotídica dentro de la misma granja, se realizó comparando la máxima longitud que permitieran las secuencias estudiadas.

Tabla 10.- Secuencias de la base de datos del Genbank utilizadas en el alineamiento múltiple y análisis filogenético junto con las cepas identificadas en el presente trabajo. Se detalla el genotipo al que pertenecen, y en el caso del genotipo 3, el subtipo al que pertenecen según el análisis filogenético realizado por Lu y col. en 2005. Se especifica el país de origen, el hospedador en el que se identificó y la referencia en que dicha cepa aparece citada.

Genotipo	Nº Acceso	Cepa	País de origen	Hospedador	Referencia
1	AF065061	Marruecos	Marruecos	humano	(Meng y col. 1999)
1	AY204877	T3	Chad	humano	(van Cuyck y col. 2003)
1	AF051352	94-Egypt	Egipto	humano	(Tsarev y col. 1999)
1	AF141652	China	China	humano	No publicado
1	M80581	P1 Sar-55	Pakistán	macaco	(Tsarev y col. 1992)
1	X98292	I1	India	humano	Donati y col., 1997
1	X99441	I2	India	humano	(Arankalle y col. 1999)
1	AF170450	Viet	Vietnam	humano	no publicado
1	M73218	B1	Burma	humano	(Tam y col. 1991)
1	AF076239	I3	India	humano	(Panda y col. 2000)
1	AF058684	BCN6	España	agua residual origen humano	(Pina y col. 1998)
2	M74506	M1	Méjico	humano	(Huang y col. 1992)
3a	AF466676	01-9913	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466659	01-21160-1	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466677	01-12116-2	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466685	01-14185-1	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466684	01-15025-3	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466683	01-15555A	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466675	01-16139-1	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466663	01-18356-1	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466662	01-18934C1	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466661	01-18934D1	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466681	01-18934D2	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466660	01-19248-3	USA	porcino	(Huang y col. 2002)

Genotipo	Nº Acceso	Cepa	País de origen	Hospedador	Referencia
3a	AF466680	01-22807-2	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466682	01-31692C1	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AB082560	HE-JA4	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3a	AB082563	HE-JA7	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3a	AB082564	HE-JA8	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3a	AB105891	HE-JA15	Japón	humano	(Yazaki y col. 2003)
3a	AB105892	HE-JA16	Japón	humano	(Yazaki y col. 2003)
3a	AB115541	HE-JA20	Japón	humano	(Sainokami y col. 2004)
3a	AB115543	HE-JA22	Japón	humano	(Sainokami y col. 2004)
3a	AB107366	HE-JAS1	Japón	humano	(Yamamoto y col. 2004)
3a	AB107368	HE-JAS3	Japón	humano	(Yamamoto y col. 2004)
3a	AB080579	HE-JI3	Japón	humano	(Takahashi y col. 2002)
3a	AY641398	hKOR	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	AY714270	hKOR-DYL	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	AY714272	hKOR-HJY	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	AY714268	hKOR-HSY	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	AY714267	hKOR-JMA	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	AY714271	hKOR-NAB	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	AY714269	hKOR-SGK	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	AB113309	HRC-HE5	Japón	humano	(Matsubayashi y col. 2004)
3a	AF516178	KOR1	Corea	porcino	(Choi y col. 2003)
3a	AF516179	KOR2	Corea	porcino	(Choi y col. 2003)
3a	AF527942	KOR3	Corea	porcino	(Choi y col. 2003)
3a	AF336291	NLSW22	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3a	AF336299	NLSW122	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3a	AB094203	swJ1-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3a	AB094207	swJ2-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3a	AB094212	swJ3-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)

Genotipo	Nº Acceso	Cepa	País de origen	Hospedador	Referencia
3a	AB094215	swJ4-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3a	AB094217	swJ6-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3a	AB094238	swJ10-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3a	AB094240	swJ11-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3a	AB094267	swJ16-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3a	AB094272	swJ17-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3a	AB105903	swJL234	Japón	porcino	(Yazaki y col. 2003)
3a	AB105904	swJL325	Japón	porcino	(Yazaki y col. 2003)
3a	AF466667	UMC7A	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466664	UMC7B	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466665	UMC12B	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	AF466678	UMC13A	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3b	AB082561	HE-JA5	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3b	AB082562	HE-JA6	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3b	AB082565	HE-JA9	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3b	AB082567	HE-JA11	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3b	AB115542	HE-JA21	Japón	humano	(Sainokami y col. 2004)
3b	AB115544	HE-JA23	Japón	humano	(Sainokami y col. 2004)
3b	AB112743	HE-JBD1	Japón	humano	(Fukuda y col. 2004)
3b	AB154829	HE-JBD2	Japón	humano	(Fukuda y col. 2004)
3b	AB154830	HE-JBD3	Japón	humano	(Fukuda y col. 2004)
3b	AB079763	HE-JF2	Japón	humano	(Suzuki y col. 2002)
3b	AB088418	HE-JO-1982	Japón	humano	(Aikawa y col. 2002)
3b	AB094256	swJ15-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3b	AB094275	swJ18-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3b	AB094279	swJ19-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3b	AB094296	swJ22-4	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3b	AB094305	swJ23-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)

Genotipo	Nº Acceso	Cepa	País de origen	Hospedador	Referencia
3b	AB094306	swJ24-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3b	AB094317	swJ25-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3b	AB073910	swJ681	Japón	porcino	(Okamoto y col. 2001)
3b	AB096756	swJC1990	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003b)
3b	AB105898	swJL82	Japón	porcino	(Yazaki y col. 2003)
3b	AB105899	swJL97	Japón	porcino	(Yazaki y col. 2003)
3b	AB105900	swJL98	Japón	porcino	(Yazaki y col. 2003)
3c	AF336290	NLSW20	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3c	AF336293	NLSW36	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3c	AY032756	NLSW68	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3c	AF336297	NLSW99	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3c	AF336298	NLSW105	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3d	AF296167	TW3SW	Taiwán	porcino	(Wu y col. 2002)
3d	AF296165	TW12SW	Taiwán	porcino	(Wu y col. 2002)
3d	AF296166	TW13SW	Taiwán	porcino	(Wu y col. 2002)
3e	AF503512	P143/11/02	UK	porcino	(Banks y col. 2004b)
3e	AF503511	P354/1/02	UK	porcino	(Banks y col. 2004b)
3e	AB093535	Sendai	Japón	humano	(Yajima y col. 2003)
3e	AB094227	swJ8-2	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3e	AB094231	swJ8-6	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3e	AB094233	swJ8-8	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3e	AB094250	swJ12-1	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003a)
3e	AB073911	swJ791	Japón	porcino	(Okamoto y col. 2001)
3e	AY362357	UK 8734	UK	humano	(Banks y col. 2004a)
3e	AJ879566	NT1	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	AJ879569	NT3	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	AJ879571	NT5	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	AJ879572	NT6	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)

Genotipo	Nº Acceso	Cepa	País de origen	Hospedador	Referencia
3e	AJ879573	NT7	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	AJ879574	NT8	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	AJ879567	NT11	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3f	AF332620	NLSW15	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3f	AF336292	NLSW28	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3f	AY032758	NLSW50	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3f	AY032757	NLSW76	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3f	AF336294	NLSW82	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3f	AF336295	NLSW85	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3f	AY032759	NLSW91	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3f	AF336296	NLSW97	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3f	AF195061	VH1	España	humano	(Pina y col. 2000)
3f	AF195062	VH2	España	humano	(Pina y col. 2000)
3f	AF195063	E11	España	agua residual matadero porcino	(Pina y col. 2000)
3f	AY323506.2	SpswCV2	España	porcino	(Fernandez-Barredo y col. 2006)
3f	AJ879568	NT2	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3f	AJ879570	NT4	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
4	AF117280	TW32SW	Taiwán	porcino	(Wu y col. 2002)
4	AJ272108	T1	China	humano	(Wang y col. 2000)
4	AF151962	Ch-T11	China	humano	(Wang y col. 2000)
4	AF296160	TW261E	Taiwán	humano	No publicado
4	AB097811	swJ13-1	Japón	porcino	(Nishizawa y col. 2003)
4	AB097812	HE-JA1	Japón	porcino	(Nishizawa y col. 2003)



## **4. RESULTADOS**



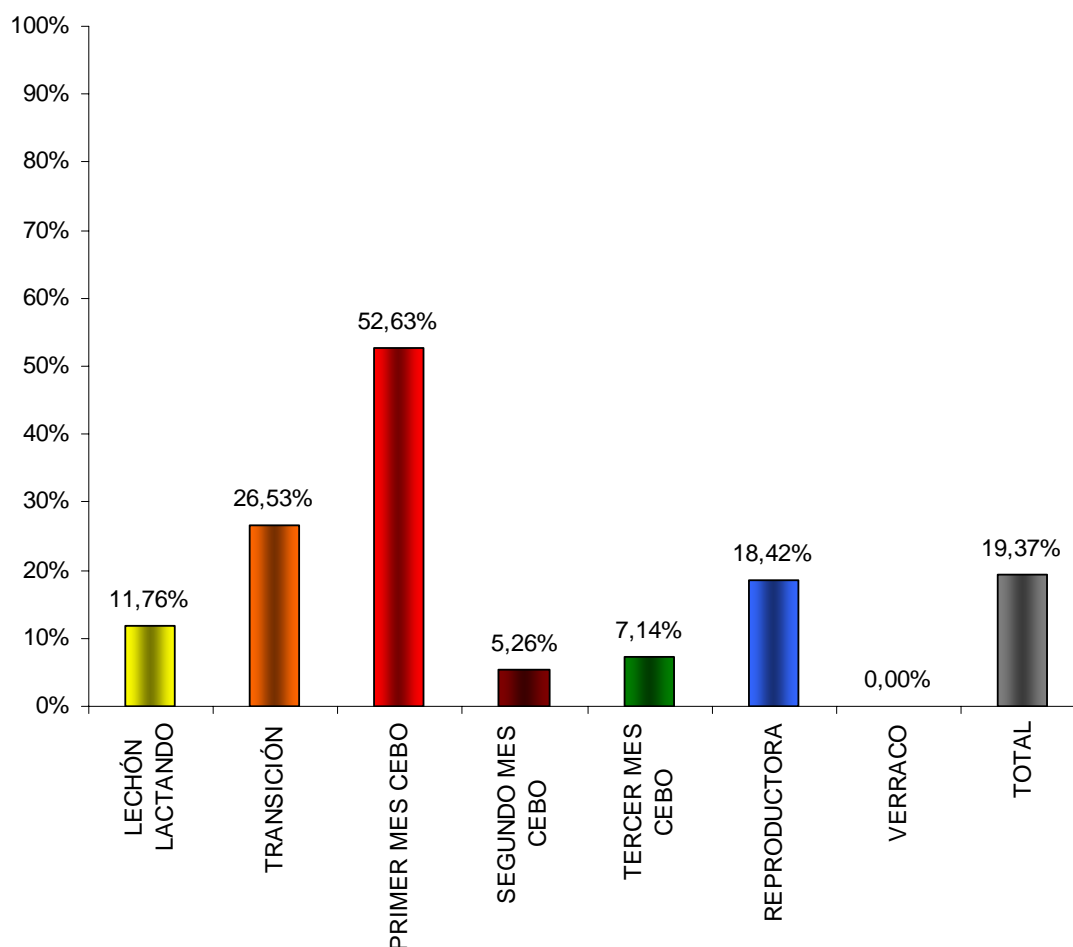
## **4. RESULTADOS**

### **4.1. PREVALENCIA DEL VHE EN CERDOS**

#### **4.1.1. Prevalencia total y por etapa productiva hallada en las muestras de heces de cerdos**

El ARN vírico se identificó en 37 (19,37%) de las 191 muestras de heces, si bien ninguno de los cerdos que fueron positivos mostraron signos clínicos de enfermedad. Los resultados en función de la etapa productiva a la que pertenecían los animales en el momento del muestreo se presentan en la figura 9. Solamente 4 (11,76%) lechones de 3 semanas de edad de los 34 muestreados fueron positivos. La prevalencia aumentó en el estrato productivo de transición al 26,53% (13 animales positivos de 49), mientras que el máximo valor obtenido se situó en la etapa del primer mes de cebo con 10 (52,63%) cerdos que excretaban el VHE en heces de 19 muestreados. A partir de dicha etapa, la prevalencia descendió a un valor 10 veces menor en el estrato de segundo mes de cebo, con tan sólo 1 (5,26%) animal positivo de 19 muestreados, para mantenerse en un valor similar durante el tercer mes de cebo con 2 (7,14%) animales positivos en heces de un total de 28. El número de animales positivos aumentó en el estrato de las cerdas reproductoras en estado de lactación con 7 (18,42%) cerdas excretando el virus de las 38 muestreadas, mientras que ninguno de los 4 verracos resultó positivo a la detección del ARN VHE en heces.

**Figura 9. Detección del ARN VHE en heces de cerdos pertenecientes a diferentes etapas productivas.**



#### **4.1.2. Determinación del riesgo de excreción del VHE en heces asociado a la etapa productiva**

Para determinar la correlación entre la presencia del VHE en heces y las diferentes etapas productivas estudiadas, se calcularon los OR con sus correspondientes intervalos de confianza fijados en el 95%. Para ello, se establecieron como valores significativos, aquellos en los que el p valor resultante fue menor de 0,05 y se definió como constante el valor obtenido en el segundo mes de cebo. La tabla 11 muestra los resultados de la regresión logística binaria realizada. En el modelo obtenido, la etapa de primer mes de

cebo fue el único valor significativo que presentó un riesgo asociado de excreción del VHE con un OR de 20,00 ( $p = 0,008$ ). Cabe destacar que se obtuvieron valores de OR de 6,50 para la etapa de transición, si bien no puede afirmarse que sean significativos puesto que el p valor se situó algo por encima del punto de corte ( $p = 0,082$ ). Ninguna de las etapas productivas restantes mostró valores significativos, mostrando p valores muy por encima del punto de corte.

**Tabla 11. Prevalencia de ARN VHE en heces de cerdos pertenecientes a diferentes etapas productivas y OR asociado a cada etapa.**

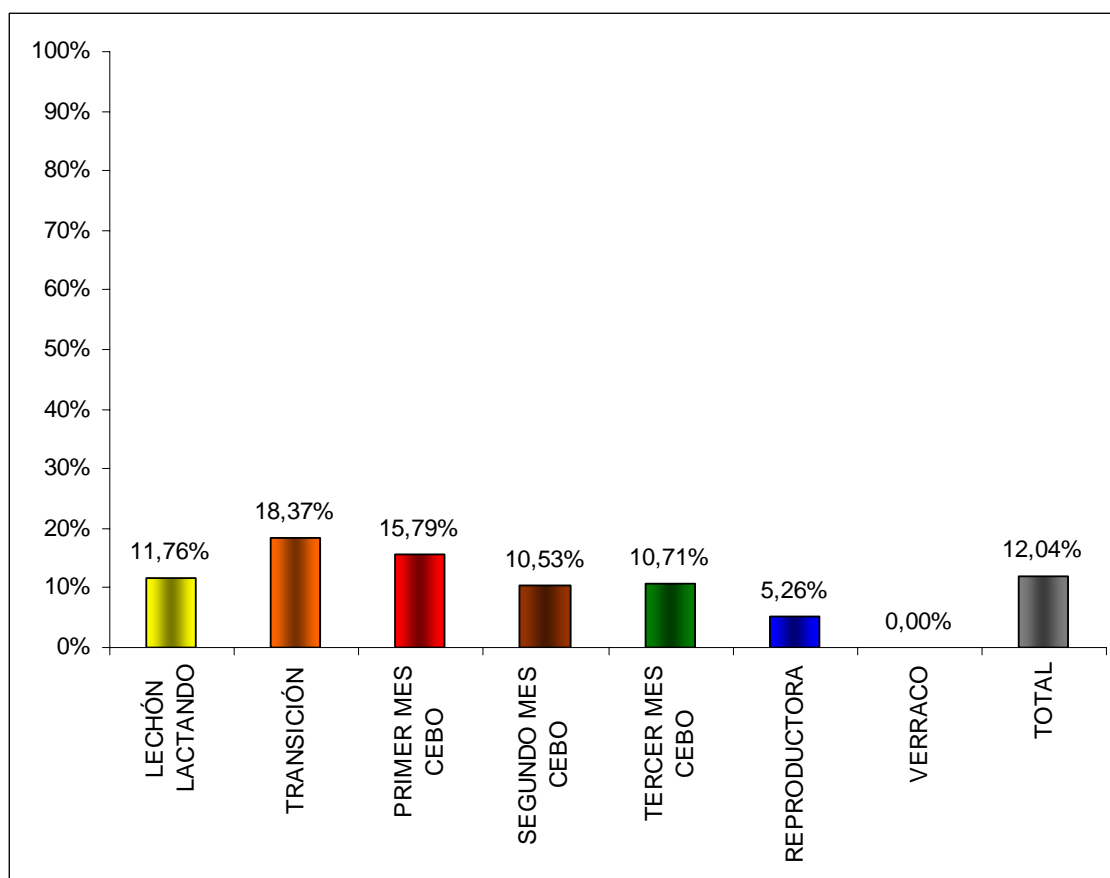
ETAPA PRODUCTIVA	VHE EN HECES	ODDS RATIO (95% IC <sup>a</sup> )	p <sup>b</sup>
	Cerdos positivos /total (% positivos)		
Lechones lactando	4 /34 (11,76%)	2,40 (0,25-23,18)	0,449
Transición	13/49 (26,53%)	6,50 (0,79-53,68)	0,082
<b>Primer mes de cebo</b>	<b>10/19 (52,63%)</b>	<b>20,00 (2,20-181,56)</b>	<b>0,008</b>
Segundo mes de cebo (Constante)	1/19 (5,26%)	1,0	0,000
Tercer mes de cebo	2/28 (7,14%)	1,39 (0,12-16,44)	0,797
Reproductoras	7/38 (18,42%)	4,07 (0,46-35,75)	0,206
Verracos	0/4 (0,00%)	0,00	0,999

<sup>a</sup>IC = intervalo de confianza; <sup>b</sup>p = el p valor < de 0,05 se consideró como significativo

#### 4.1.3. Prevalencia total y por etapa productiva hallada en las muestras de sueros de cerdos

El ARN vírico se identificó en 23 (12,04%) de las 191 muestras de sueros. Los resultados en función de la etapa productiva a la que pertenecían los animales en el momento del muestreo se muestran en la figura 10. La etapa que presentó una mayor prevalencia fue la de transición con 9 (18,37%) animales virémicos de un total de 49, seguida de la etapa de primer mes de cebo con 3 (15,79%) positivos de 19. La menor cifra de positivos correspondió a los animales adultos con 2 (5,26%) reproductoras virémicas de 38 y ningún verraco positivo. El resto de las etapas productivas muestran valores de prevalencia bastante similares entre sí, oscilando entre el 10 y el 11%.

**Figura 10. Detección del ARN VHE en sueros de cerdos pertenecientes a diferentes etapas productivas.**



#### 4.1.4. Determinación del riesgo de viremia por el VHE asociado a la etapa productiva

Para el estudio de la relación entre la presencia del VHE en sangre y la etapa productiva, se aplicó la técnica de regresión logística binomial con las mismas condiciones descritas en el apartado 4.1.2. En este caso, ninguno de los estratos mostró valores significativos, si bien en la etapa de transición se obtuvo un OR de 4,05 con un p valor ( $p = 0,086$ ) cercano a la línea de corte.

**Tabla 12. Prevalencia de ARN VHE en sueros de cerdos pertenecientes a diferentes etapas productivas y OR asociado a cada etapa.**

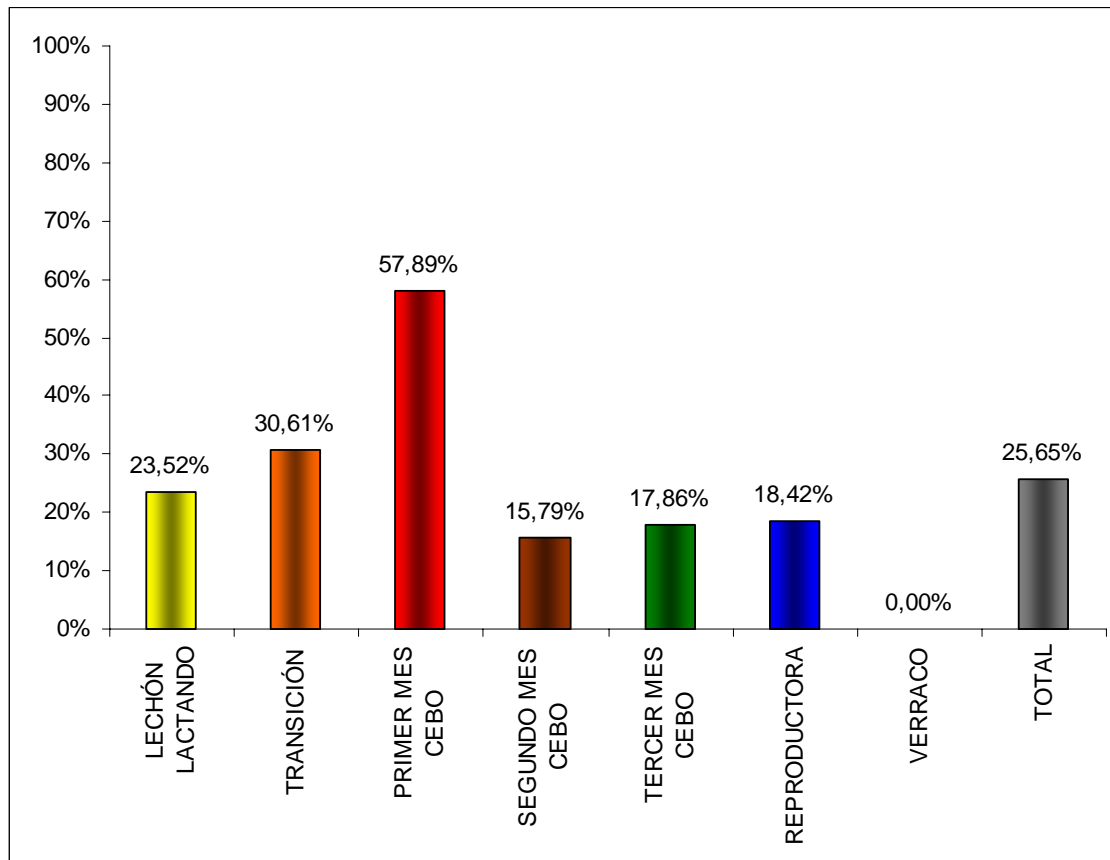
ETAPA PRODUCTIVA	VHE EN SUERO	ODDS RATIO (95% IC <sup>a</sup> )	p <sup>b</sup>
	Cerdos positivos / total (% positivos)		
Lechones lactando	4 /34 (11,76%)	2,40 (0,41-14,02)	0,331
Transición	9/49 (18,37%)	4,05 (0,82-20,00)	0,086
Primer mes de cebo	3/19 (15,79%)	3,38 (0,51-22,20)	0,206
Segundo mes de cebo	2/19 (10,50%)	2,12 (0,28-16,34)	0,472
Tercer mes de cebo	3/28 (10,70%)	2,16 (0,34-13,88)	0,417
Reproductoras (Constante)	2/38 (5,26%)	1,0	0,000
Verracos	0/4 (0,00%)	0,00	0,999

<sup>a</sup>IC = intervalo de confianza; <sup>b</sup>p = el p valor < de 0,05 se consideró como significativo

#### 4.1.5. Prevalencia total y por etapa productiva de animales portadores del VHE

Si definimos como portador a aquel animal en el que se ha detectado la presencia, ya sea en heces y/o en suero del ARN VHE, la prevalencia total de animales portadores fue de 49 (25,65%) sobre un total de 191. La distribución de animales portadores del VHE se muestra en la figura 11. Dicha distribución sigue la misma tendencia que la observada en las muestras de heces, con una prevalencia máxima obtenida en el primer mes de cebo de 57,89% (11 portadores de 19) seguida de la etapa de transición con 30,61% (15 de 49). La prevalencia mínima se observó en el estrato perteneciente al segundo mes de cebo con un valor de 15,79% (3 animales positivos de 19).

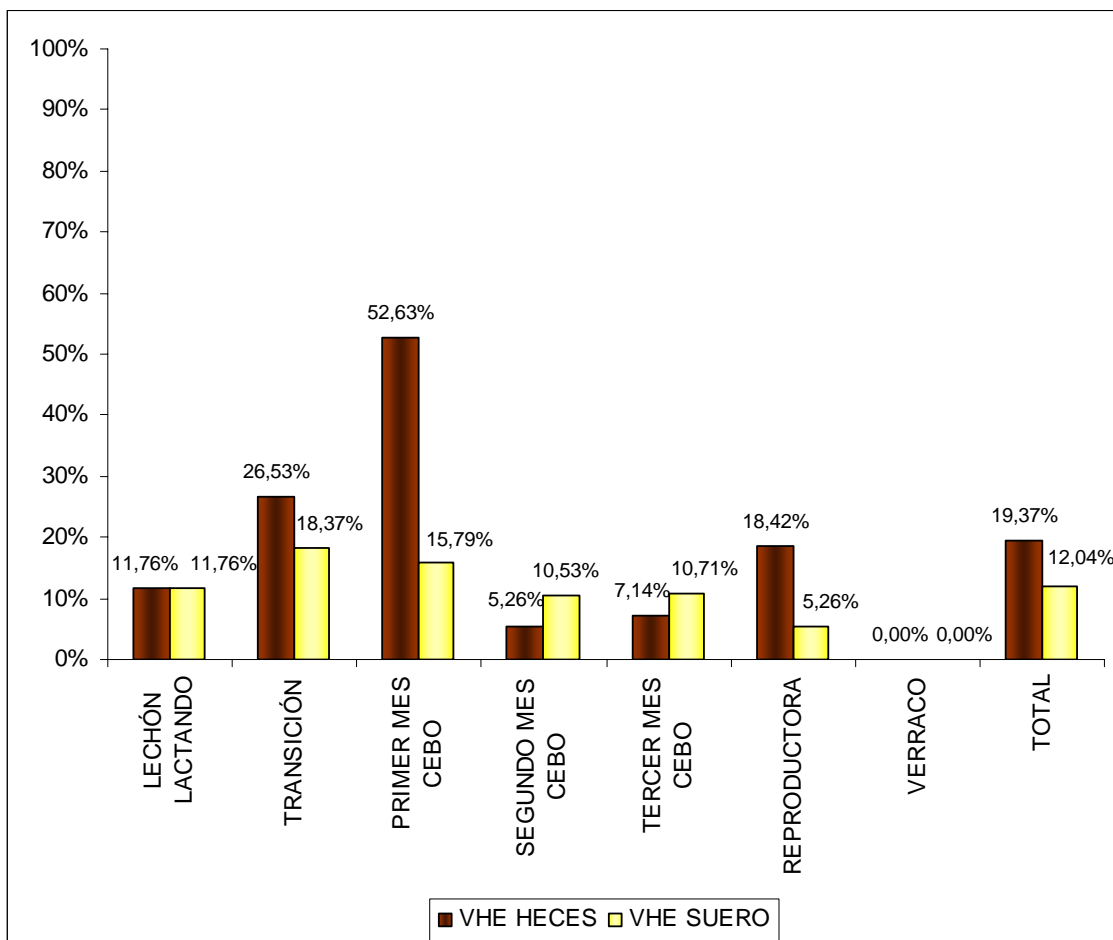
**Figura 11.- Distribución de la prevalencia de animales portadores del VHE en función de la etapa productiva.**





Cuando se realizó la comparación de los animales virémicos frente a los que se encontraban excretando el virus dentro de la misma etapa productiva (fig. 12), se observó que en las etapas de transición, primer mes de cebo y reproductoras en lactación, la proporción de animales que excretaban el virus en heces era superior a la de animales virémicos. Dicha proporción es inversa en los estratos de segundo y tercer mes de cebo, mientras que en lechones es exactamente igual.

**Figura 12. Comparación de las prevalencias obtenidas en heces y suero en cada etapa productiva.**



#### 4.1.6. Determinación del riesgo de infección por el VHE asociado a la etapa productiva

Para el estudio de la relación entre la presencia de portadores del VHE y la etapa productiva, se aplicó una técnica de regresión logística binomial. El análisis mostró que los cerdos en el primer mes de cebo presentaron 7,33 (1,58-33,97) veces mayor riesgo de ser portadores del VHE que los cerdos en el estrato con menor prevalencia (segundo mes de cebo) con un p valor de 0,011 (tabla 13). El resto de las etapas productivas no mostró ningún OR significativo con p valores muy por encima de la línea de corte.

**Tabla 13. Prevalencia de portadores del VHE en diferentes etapas productivas y OR asociado a cada etapa.**

ETAPA PRODUCTIVA	INFECCIÓN		ODDS RATIO (95% IC <sup>a</sup> )	p <sup>b</sup>
	POR EL VHE			
	Cerdos positivos / total (% positivos)			
Lechones lactando	8 /34 (23,52%)		1,64 (0,38-7,11)	0,508
Transición	15/49 (30,61%)		2,35 (0,60-9,30)	0,222
<b>Primer mes de cebo</b>	<b>11/19 (57,89%)</b>		<b>7,33 (1,58-33,97)</b>	<b>0,011</b>
Segundo mes de cebo (Constante)	3/19 (15,79%)		1,0	0,000
Tercer mes de cebo	5/28 (17,86%)		1,16 (0,24-5,56)	0,853
Reproductoras	7/38 (18,42%)		1,20 (0,27-5,30)	0,806
Verracos	0/4 (0,00%)		0,00	0,999

<sup>a</sup>IC = intervalo de confianza; <sup>b</sup>p = el p valor < de 0,05 se consideró como significativo

## **4.2. PREVALENCIA DEL VHE EN GRANJAS**

En 12 (57,14%) de las 21 granjas muestreadas en el presente estudio se encontró al menos un animal positivo, ya fuera en heces o en suero (tabla 14). El porcentaje de granjas en las que el virus se identificó en la fosa de purines fue del 38,10% (8 granjas positivas de 21). Si definimos como granja positiva aquella en la que se ha encontrado el VHE, ya sea en cerdos y/o en fosa de purines, el número de granjas en las que se detectó el virus fue de 15 (71,43%).

De las 12 granjas que presentaron algún animal excretando el VHE en heces o virémico, tan sólo 5 (41,67%) fueron positivas a la presencia del virus en la fosa de purines. Asimismo, de las 9 granjas cuyos animales muestreados fueron negativos, 6 (66,67%) presentaron fosas de purines negativas. Para determinar si existía relación entre la presencia de animales positivos en una granja y la presencia del VHE en la fosa de purines de la misma granja, se realizó una prueba de Chi-Cuadrado, no evidenciándose ninguna asociación significativa entre ambas variables. De hecho, el porcentaje de cerdos positivos encontrados en las 13 granjas negativas en fosas de purines fue de 36 sobre 129 (27,91%), mientras que la prevalencia de VHE en cerdos provenientes de granjas con fosas de purines positivas fue de 13 (20,96%) sobre 62.

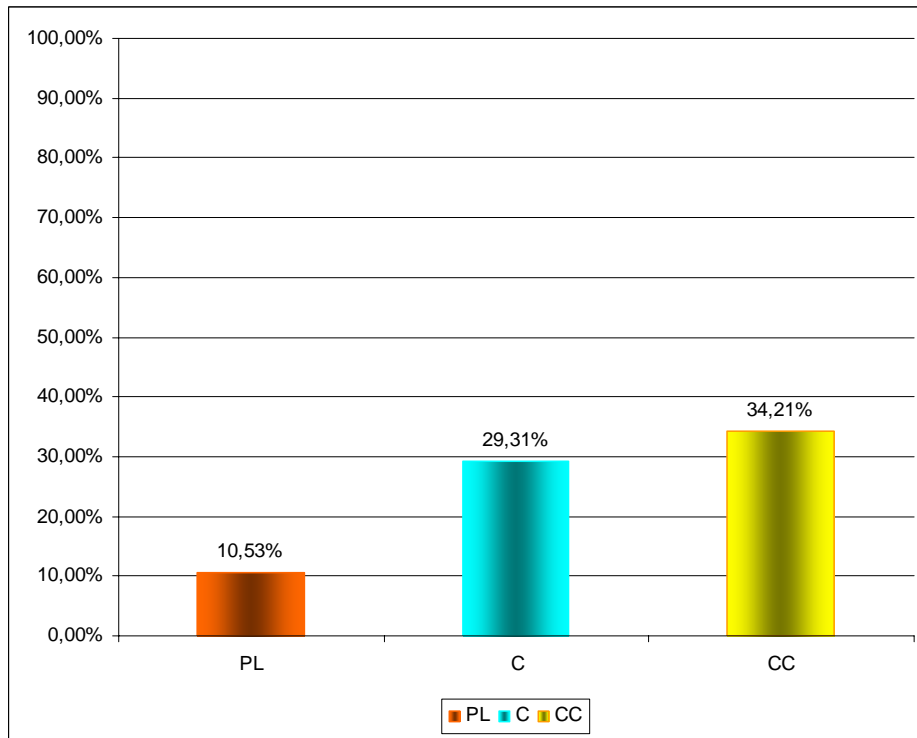
Con respecto a la prevalencia del virus en cerdos hallada según el tipo de granja, en las productoras de lechones se observó un porcentaje de animales positivos del 10,53% (6 positivos de 57), mientras que en los cebaderos y explotaciones de ciclo cerrado fue del 29,31% (17 positivos de 58) y 34,21% (26 de 76) respectivamente (fig. 13). El porcentaje de granjas de producción de lechones, cebaderos y de ciclo cerrado en las que se identificó el VHE en

alguna de las muestras tomadas fue de 42,85%, 81,82% y 100%, respectivamente (fig. 14).

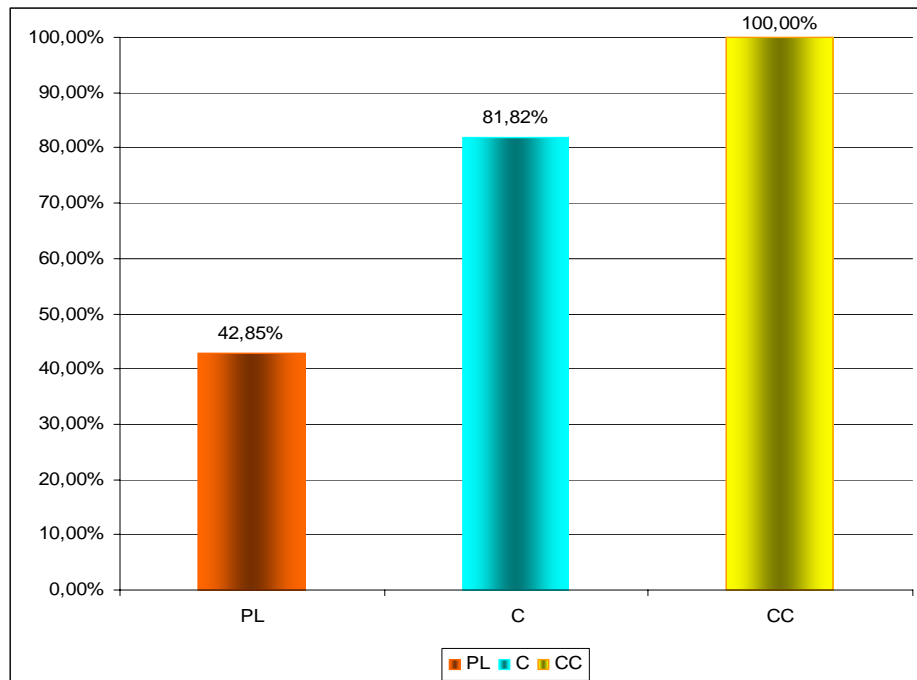
**Tabla 14. Distribución de animales positivos en las granjas muestreadas y presencia o ausencia del ARN vírico en las fosas de purines de dichas granjas. (PL: productora de lechones, CC: ciclo cerrado, C: cebadero. POS: positivo a la presencia del ARN VHE, NEG: negativo a la presencia del ARN VHE.)**

Granja	Tipo de granja	Cerdos positivos/ muestreados (%)	Fosa de purines
1	PL	1/15 (6,66)	NEG
2	CC	13/20 (65)	NEG
3	PL	0/8 (0)	NEG
4	CC	9/34 (26,47)	POS
5	C	0/4 (0)	POS
6	C	1/4 (25)	POS
7	C	2/4 (50)	NEG
8	C	1/4 (25)	POS
9	C	0/3 (0)	NEG
10	C	0/4 (0)	NEG
11	C	1/4 (25)	POS
12	C	0/4 (0)	POS
13	C	0/4 (0)	POS
14	C	1/4 (25)	POS
15	PL	4/10 (40)	NEG
16	CC	4/22 (18,18)	NEG
17	PL	0/11 (0)	NEG
18	PL	1/7 (14,29)	NEG
19	PL	0/3 (0)	NEG
20	PL	0/3 (0)	NEG
21	C	11/19 (57,90)	NEG
<b>Total</b>		<b>49/191 (25,65%)</b>	<b>8/21 (38,10%)</b>

**Figura 13. Porcentaje de animales positivos hallados en cada tipo de explotación muestreada. PL: productora de lechones, C: cebadero, CC: ciclo cerrado.**



**Figura 14. Porcentaje de granjas positivas según el tipo de producción. PL: productora de lechones, C: cebadero, CC: ciclo cerrado.**



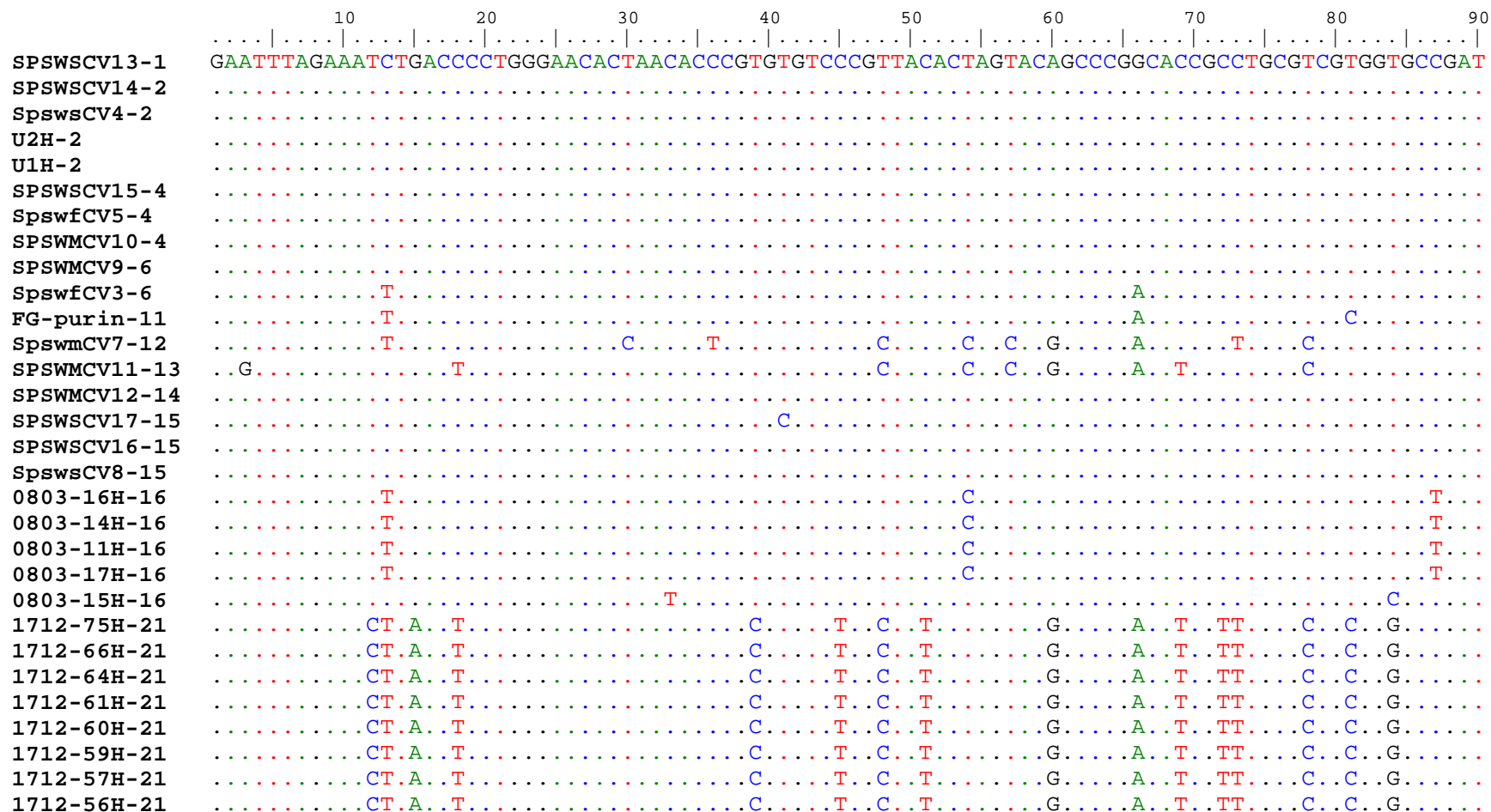
### **4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLADOS PORCINOS DEL VHE**

Se secuenciaron un total de 30 aislados que se identificaron en 11 granjas de las 15 halladas positivas a la presencia del VHE (fig. 15). Se realizó un alineamiento previo con un fragmento de 172 pb, de la mayoría de cepas que Lu y col. en 2005 usaron en la mayor revisión de la filogenia del VHE realizada hasta el momento. El objetivo de este alineamiento fue comprobar si la comparación de un fragmento de menor longitud producía un árbol con la misma topología obtenida por este autor usando un fragmento de 301 nucleótidos. Tras verificar que la distribución de subtipos obtenida con el fragmento de 172 pb era prácticamente idéntica a la alcanzada con el fragmento de 301 pb (fig. 16), se llevó a cabo el alineamiento múltiple y la comparación filogenética de las 30 secuencias halladas en este estudio con un total de 131 secuencias del VHE distribuidas entre los 4 genotipos conocidos (fig.17) de la siguiente manera:

- 113 secuencias humanas y porcinas pertenecientes al genotipo 3
- 11 secuencias humanas pertenecientes al genotipo 1
- 1 secuencia humana perteneciente al genotipo 2
- 6 secuencias humanas y porcinas pertenecientes al genotipo 4.

Los números de acceso del Genbank, el hospedador y el origen geográfico de las cepas han sido detallados anteriormente en la sección 3.11 (tabla 10) del capítulo de "Material y Métodos".

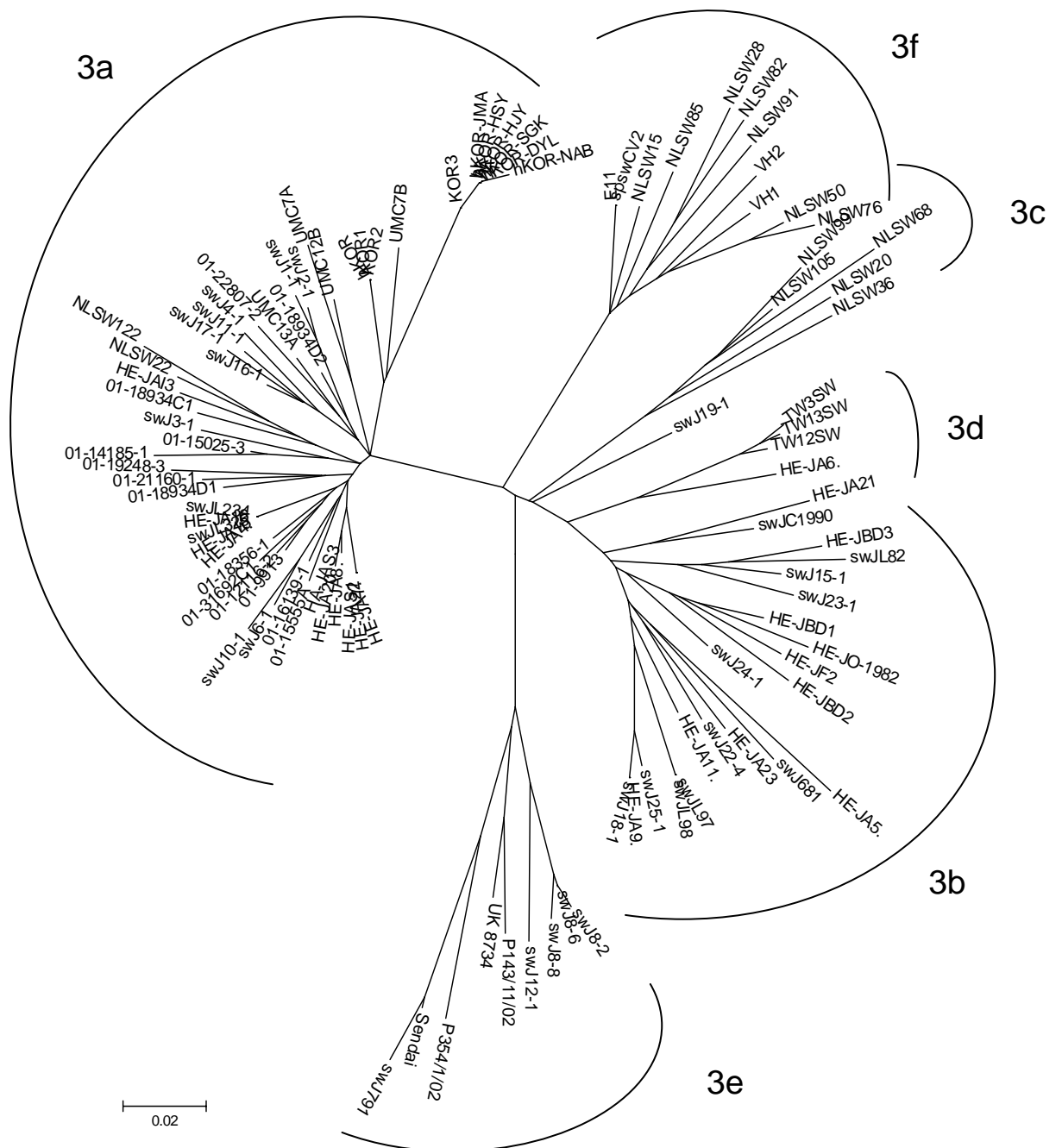
Figura 15. Alineamiento de un fragmento de 172 nucleótidos de los 30 aislados hallados en este estudio. Los puntos hacen referencia a los sitios conservados con respecto a la secuencia SPSWSCV13-1. (Los números que aparecen al final de cada secuencia hacen referencia al número de granja).



	100	110	120	130	140	150	160	170
SPSWSCV13-1	GGGACAGCTGAGCTTACAACCACCTGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACTTGCAATTCACCGGGACAAATGGTGTGGTGAGG							
SPSWSCV14-2	.....							
Spswscv4-2	.....							
U2H-2	.....							
U1H-2	.....							
SPSWSCV15-4	.....							
Spswfcv5-4	.....							
SPSWMCV10-4	.....							
SPSWMCV9-6	.....							
Spswfcv3-6	.....							
FG-purin-11	.....							
Spswmcv7-12	.....							
SPSWMCV11-13	.....							
SPSWMCV12-14	.....							
SPSWSCV17-15	.....							
SPSWSCV16-15	.....							
Spswscv8-15	.....							
0803-16H-16	.....							
0803-14H-16	.....							
0803-11H-16	.....							
0803-17H-16	.....							
0803-15H-16	.....							
1712-75H-21	.....							
1712-66H-21	.....							
1712-64H-21	.....							
1712-61H-21	.....							
1712-60H-21	.....							
1712-59H-21	.....							
1712-57H-21	.....							
1712-56H-21	.....							



Figura 16. Árbol filogenético realizado a partir de fragmentos de 172 pb de las mismas cepas pertenecientes al genotipo 3 que utilizaron Lu y col. 2005. (Las distancias genéticas se calcularon mediante el método de dos parámetros de Kimura, mientras que el árbol se construyó mediante el método de neighbor-joining con unos valores de bootstrap de 1000 réplicas. Las cepas se agruparon en los mismos subtipos obtenidos por estos autores con fragmentos de 301 pb.)



Las secuencias obtenidas en este estudio se agruparon dentro del genotipo 3 (fig. 17), concretamente en el subtipo 3f (fig. 18) descrito por Lu y col. 2005.

**Figura 17. Árbol filogenético realizado a partir de fragmentos de 172 pb de secuencias pertenecientes a los 4 genotipos conocidos. (Las cepas pertenecientes al genotipo 3 se han agrupado para una mejor perspectiva de la topografía del árbol y se muestran desagrupadas en la figura 18 en un sub-árbol aparte para su mejor visualización).**

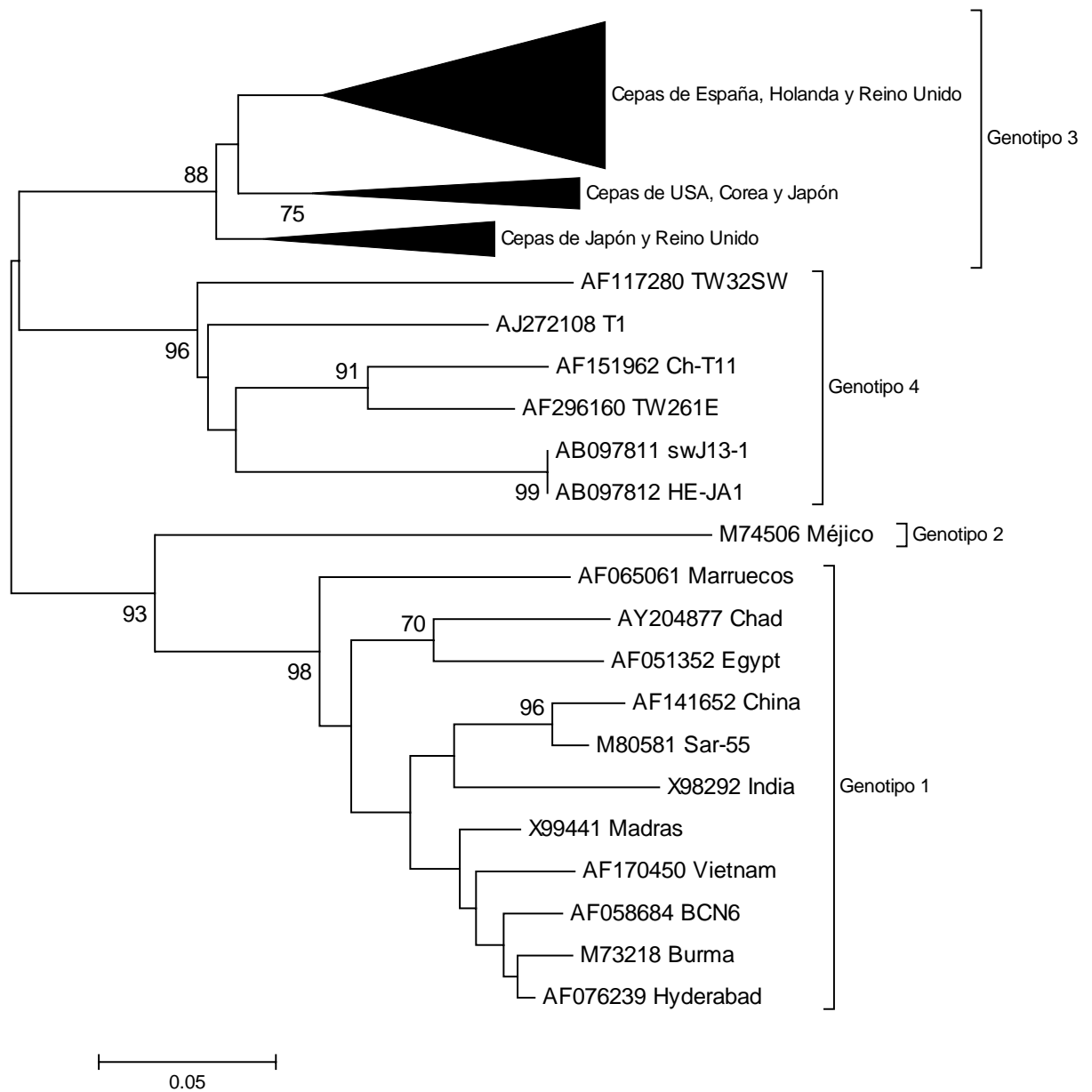
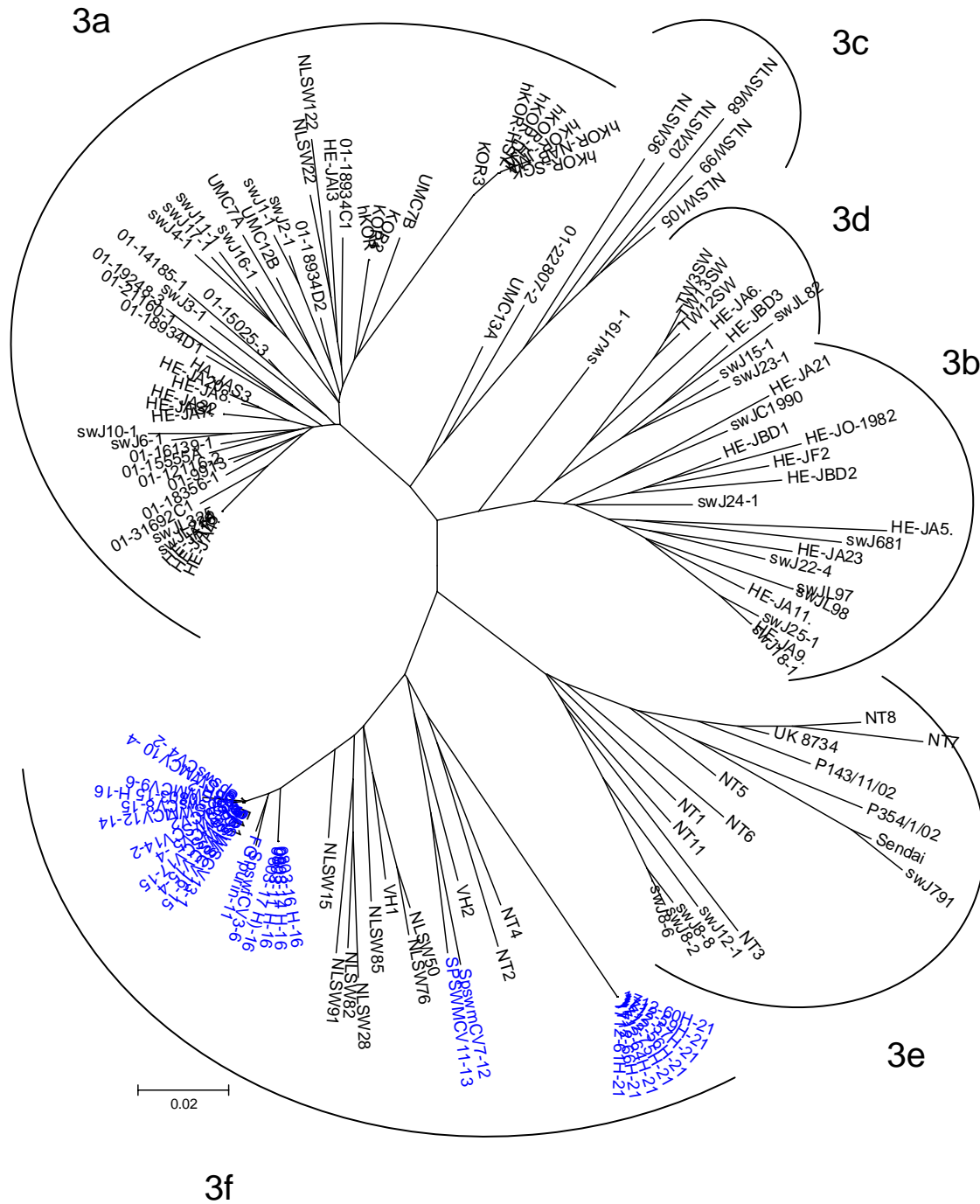


Figura 18. Árbol filogenético extraído del genotipo 3 del árbol de la figura 17. Se muestran con detalle la posición de las cepas halladas en este estudio (en azul) dentro del genotipo 3.



La distribución de las secuencias obtenidas por granja así como los porcentajes de homología dentro de la misma granja y entre distintas explotaciones se detallan en la tabla 15. En dicha tabla se puede observar que los porcentajes de homología hallados dentro de la misma granja variaron desde el 95,8% (granja 6) hasta el 100% de homología observada en el resto de explotaciones estudiadas. Las variaciones de similitud encontradas entre las diferentes granjas oscilaron desde un 84,8% hallado entre las granjas 12 y 21 hasta el 100% entre algunas de las cepas halladas en las granjas 1, 2, 4, 6, 14 y 15. En la tabla 16 se muestra la matriz de identidades nucleotídicas entre las 30 cepas secuenciadas en este estudio junto con otras cepas que se han agrupado en el mismo subtipo 3f en los árboles filogenéticos de las figuras 18 y 19.

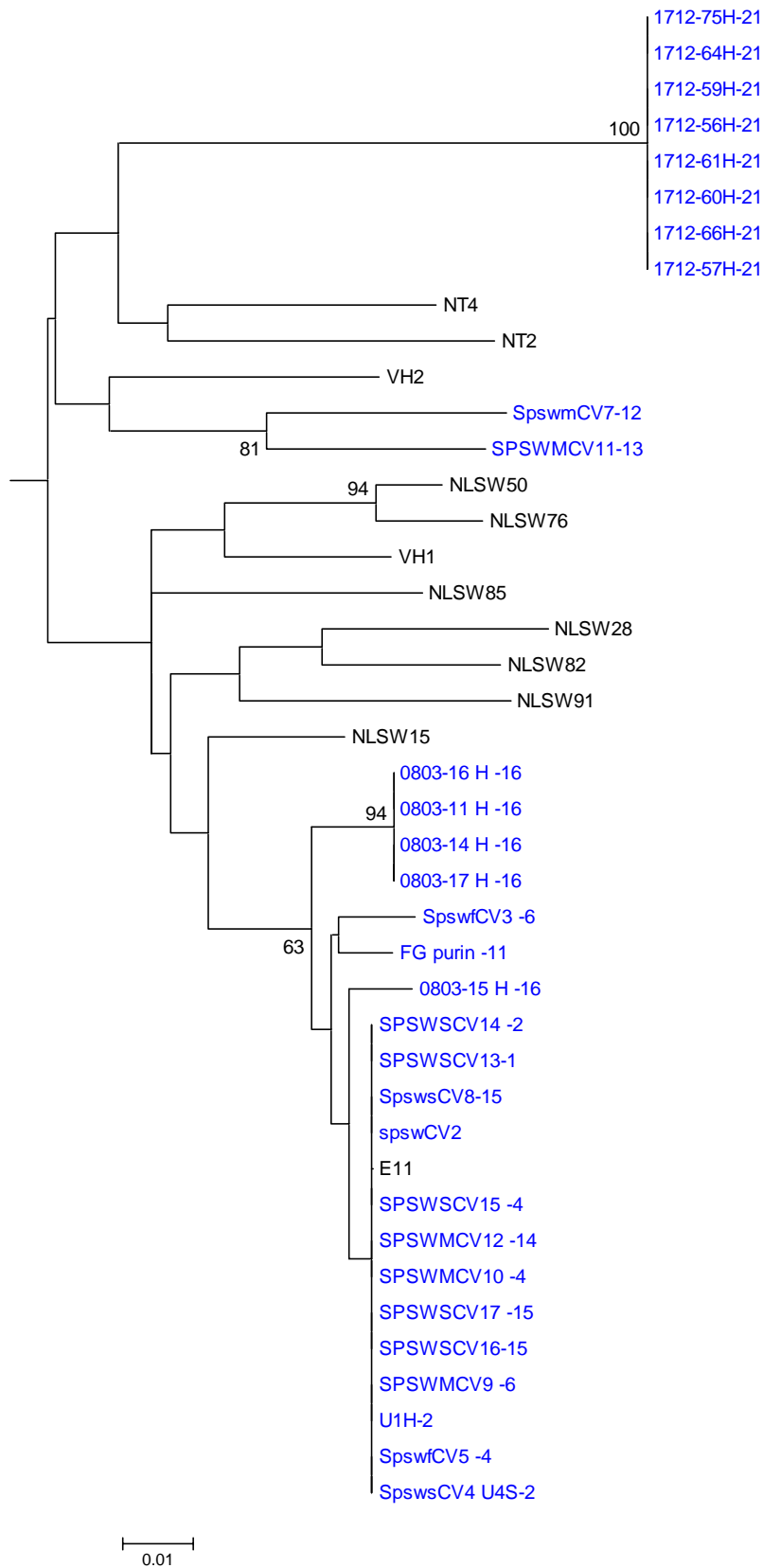
**Tabla 15. Similitud de nucleótidos intra e inter- granja y genotipo identificado en los aislados porcinos de VHE secuenciados en este estudio.**

Granja	Nº de cepas secuenciadas	Identidad de nucleótidos intra-granja	Identidad de nucleótidos inter-granja	Genotipo
1	1	-	88,3-100%	3
2	4	98,6-100%	88,3-100%	3
3	0	-	-	-
4	3	99,4-100%	88,3-100%	3
5	0	-	-	-
6	2	95,8%	88,3-100%	3
7	0	-	-	-
8	0	-	-	-
9	0	-	-	-
10	0	-	-	-
11	1	-	88,3-98,2%	3
12	1	-	84,8-92,4%	3
13	1	-	86-92,4%	3
14	1	-	86,6-100%	3
15	3	100%	86,6-100%	3
16	5	95,9-100%	85,4-98,2%	-
17	0	-	-	-
18	0	-	-	-
19	0	-	-	-
20	0	-	-	-
21	8	99,3-100%	84,8-86,6%	3



El subárbol filogenético de la figura 19 perteneciente al subtipo 3f, muestra con más detalle las relaciones filogenéticas existentes entre sus aislados. En él se puede observar que las cepas halladas en este estudio se dividieron en dos grupos principales. El primer grupo comprendió cepas pertenecientes a las granjas 12, 13 y 21 y tres aislados humanos autóctonos, uno español (VH2) y dos británicos (NT2 y NT4). El segundo grupo estuvo integrado por el resto de las cepas porcinas identificadas en el presente trabajo. Dichas secuencias se situaron muy cercanas a la secuencia de origen porcino hallada en Cataluña en aguas residuales de matadero, y a algunas cepas porcinas holandesas (NLSW15, NLSW91, NLSW82, NLSW28, NLSW85, NLSW76 y NLSW50). Asimismo, en este grupo también se ubicó la cepa humana autóctona española restante aislada en Cataluña (VH1).

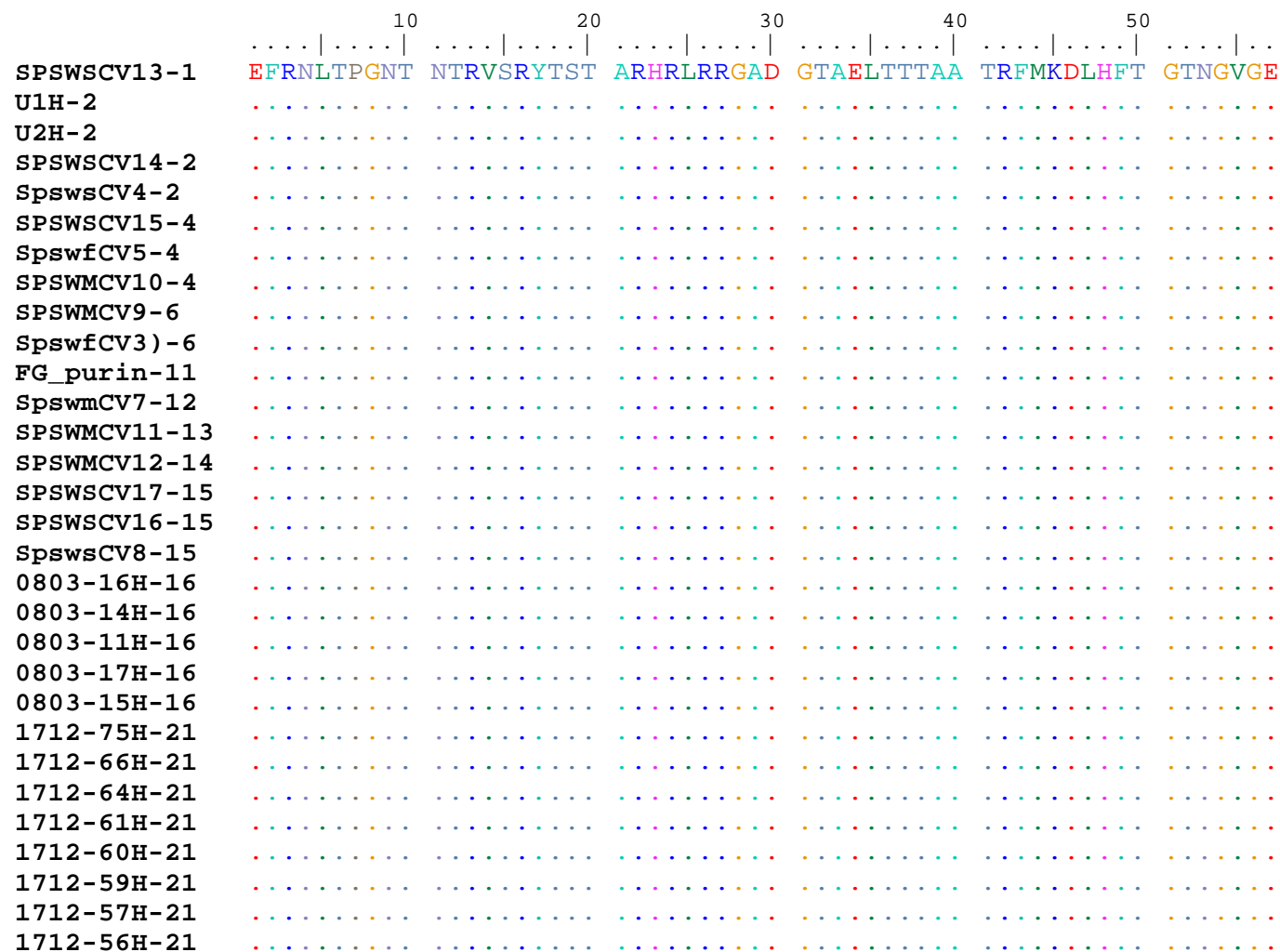
Figura 19. Árbol filogenético extraído del subtipo 3f del árbol de la figura 18. Se muestran con detalle las relaciones existentes entre las cepas halladas en el presente estudio (en azul) y el resto de las cepas pertenecientes al subtipo 3f dentro del genotipo 3.





A pesar de la variabilidad observada entre las distintas cepas obtenidas, ninguna de las sustituciones de nucleótidos dio lugar a algún cambio en la secuencia de aminoácidos, como se puede comprobar en la figura 20. Esta misma homogeneidad en las secuencias de aminoácidos para el fragmento estudiado pudo observarse en todos los aislados de origen europeo, tanto humanos como porcinos, excepto en las cepas holandesas NLSW99 y NLSW122 en las que se sustituyó en la posición 52 una glicina por una metionina.

Figura 20. Alineamiento de aminoácidos de las secuencias pertenecientes al genotipo 3 que se han usado para la comparación filogenética. (Los puntos hacen referencia a los sitios conservados con respecto a la secuencia SPSWSCV13-1).







HE-JA5.	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JA6.	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JA9.	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JA11.	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JA21	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JA23	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JBD1	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JBD2	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JBD3	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JF2	.....	.....	.....	.....	.....
HE-JO-1982	.....	.....	.....	.....	.....
swJ15-1	.....	.....	.....	.....	.....
swJ18-1	.....	.....	.....	.....	.....
swJ19-1	.....	.....	.....	.....	.....
swJ22-4	.....	.....	.....	.....	.....
swJ23-1	.....	.....	.....	.....	.....
swJ24-1	.....	.....	.....	.....	.....
swJ25-1	.....	.....	.....	.....	.....
swJ681	.....	.....	.....	.....	.....
swJC1990	.....	.S	.....	.....	.....
swJL82	.....	.....	.....	.....	.....
swJL97	.....	.....	.....	.....	.....
swJL98	.....	.....	.....	.....	.....
NLSW20	.....	.....	.....	.....	.....
NLSW36	.....	.....	.....	.....	.....
NLSW68	.....	.....	.....	.....	.....
NLSW99	.....	.....	.....	.....	.M
NLSW105	.....	.....	.....	.....	.....
TW3SW	.....	.....	.....	.....	.....
TW12SW	.....	.....	.....	.....	.....
TW13SW	.....	.....	.....	.....	.....
P143/11/02	.....	.....	.....	.....	.....
P354/1/02	.....	.....	.....	.....	.....
Sendai	.....	.....	.....	.....	.....
swJ8-2	.....	.....	.....P	.....	.....

swJ8-6	.....	.....	.....	P	.....	.....	.....	.....
swJ8-8	.....	.....	.....	P	.....	.....	.....	.....
swJ12-1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M	.....
swJ791	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
UK_8734	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

## **5. DISCUSIÓN**





## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1. PREVALENCIA DEL VHE EN CERDOS**

Este es el primer estudio realizado en Europa en el que se ha determinado la prevalencia del ARN VHE en heces y sangre simultáneamente en el mismo animal incluyendo todas las etapas de la producción porcina intensiva. Asimismo, es el primer trabajo en Europa en el que se ha detectado el ARN vírico en fosas de purines de granjas porcinas.

#### **5.1.1. Prevalencia total y por etapa productiva hallada en las muestras de heces de cerdos**

Hasta el momento, no se ha publicado ningún trabajo que describa los valores de prevalencia del VHE en heces individuales de cerdos en todas las etapas de producción, por lo que no es posible la comparación de los valores totales de prevalencia (19,37%).

No obstante, se han comparado los valores de cada rango etario concreto con los obtenidos en otros estudios, observándose diferencias en los resultados obtenidos. Así, en el Reino Unido (Banks y col., 2004b), se obtuvieron valores de prevalencia en heces de 26,3% en cerdos de 12 a 15 semanas de edad, etapa que se corresponde aproximadamente con el primer mes de cebo, y cuyo valor fue sensiblemente inferior al descrito en nuestro estudio (52,6%). En Nueva Zelanda, Garkavenko y col., en 2001, en un estudio realizado en dos granjas y sobre 45 cerdos de 7 a 17 semanas, obtuvieron un patrón similar en la distribución etaria de las prevalencias. Así, en el estrato de 7 semanas de edad, no se identificó ningún animal positivo, mientras que en los estratos de 10 y 12 semanas de edad se hallaron porcentajes de animales excretando el VHE de 47,6% y 100%, respectivamente. Este patrón coincide con el

observado en nuestro trabajo, en el que se describieron valores de 26,53% y 52,63% en las etapas de transición (animales de 4 a 11 semanas) y primer mes de cebo (animales de 12 a 16 semanas), respectivamente.

En los Estados Unidos (Huang y col., 2002a), se observó que el 26,3% de 95 cerdos de edades comprendidas entre 8 y 16 semanas se encontraban excretando el VHE en heces. Dichos valores son inferiores a los descritos en nuestro estudio (33,82%) si tenemos en cuenta la prevalencia conjunta de los estratos de transición y primer mes de cebo (animales de 4 a 16 semanas).

Estos datos ponen de manifiesto que los porcentajes de animales excretando el virus son muy variables, dependiendo de la etapa productiva en que se tomen las muestras.

Según las observaciones realizadas en infecciones experimentales de cerdos con cepas porcinas del VHE (Meng y col., 1998a), el virus se excreta en heces a las 2-3 semanas después de haber ingresado en el organismo, prolongándose su eliminación hasta un máximo de 7 semanas. Teniendo en cuenta esta premisa, y situando la máxima prevalencia obtenida en este trabajo en los animales que se encontraban en el primer mes de cebo (alrededor de las 13 a 16 semanas de vida), podría deducirse que la mayoría de los cerdos muestreados adquirieron la infección en algún momento entre las 3 y las 10 semanas de vida. A las 3 semanas de edad, se suele producir el destete de los lechones, por lo que las infecciones más tempranas podrían tener su origen en las madres. Esta hipótesis se ve apoyada por el elevado porcentaje (18,42%) de madres excretando el VHE que se ha encontrado en el presente estudio. De esta forma, después de la entrada del virus y tras un periodo de incubación de 2 a 3 semanas, éste se excretaría en las heces de los lechones infectados, que

en ese momento ya se encontrarían en la etapa de transición. Los animales infectados, al eliminar el virus en heces, propagarían el VHE a otros animales, produciéndose la máxima prevalencia durante el primer mes de cebo. Esta transmisión se puede ver favorecida por la práctica de unir diferentes camadas de lechones en lotes al comenzar la etapa de transición y la etapa de cebo.

El segundo y tercer mes de cebo fueron las etapas productivas que mostraron los valores más bajos de prevalencia (5% y 7,1% respectivamente). Este hecho podría deberse al desarrollo de una respuesta inmune eficaz durante estas etapas.

Un aspecto que precisa un mayor conocimiento es cómo los lechones se infectan a partir de las madres. En el único estudio realizado en cerdas reproductoras gestantes a las que se inoculó por vía parenteral el VHE, no se observó transmisión vertical a la descendencia. Sin embargo, sí se documentó la transmisión de inmunidad pasiva a la prole, por lo que teóricamente, los lechones nacidos a partir de reproductoras infectadas recibirían anticuerpos maternos (Kasorndorkbua y col., 2003). Una posible explicación sería que sólo aquellos lechones con un estatus inmunitario deficiente se infectarían a partir de las heces de las madres, actuando como fuente de propagación del virus para el resto del lote, que sería más susceptible cuando la inmunidad maternal comenzara a descender en la etapa de transición.

La elevada prevalencia (18,42%) que se ha encontrado en reproductoras en este estudio ha sido un dato novedoso e inesperado, puesto que hasta ahora no se habían descrito niveles tan elevados de excreción en heces del VHE en cerdos adultos. La mayor prevalencia descrita en reproductoras durante la época del parto, podría explicarse por una mayor sensibilidad a la infección

por el VHE durante esta etapa. Esta mayor susceptibilidad durante el parto se ha observado frente a otros agentes infecciosos o parasitarios como *Rotavirus* o coccidios (Benfield y col., 1982; Gelberg y col., 1991). La elevada prevalencia en cerdas reproductoras en lactación suscita nuevas preguntas acerca de cómo varía la excreción del VHE en heces en diferentes fases de la gestación y lactancia en hembras reproductoras, así como si existen diferencias en la prevalencia entre primíparas y múltiparas. Dichas cuestiones necesitan ser respondidas mediante el diseño de nuevos estudios que muestren la dinámica de la infección natural por el VHE en una población de hembras preñadas.

#### **5.1.2. Determinación del riesgo de excreción del VHE en heces asociado a la etapa productiva**

En este estudio se ha determinado que los cerdos en el primer mes de cebo tienen un riesgo relativo 20 veces mayor de excretar el virus en heces que los cerdos en la segunda fase del cebo. Este dato puede ser útil a efectos prácticos para realizar muestreos dirigidos en granjas. Esta práctica lograría reducir costes a la hora de diagnosticar la presencia del virus en una explotación, puesto que el número de animales a analizar sería menor al seleccionar un determinado rango de edad. Asimismo, la determinación del riesgo de excretar el VHE en heces según la fase productiva nos ha permitido determinar en qué etapa hay un mayor número de cerdos transmisores del virus para otros cerdos e incluso para el hombre.

### **5.1.3. Prevalencia total y por etapa productiva hallada en las muestras de sueros de cerdos**

La presencia del ARN VHE (12,04%) en sueros porcinos es la más elevada descrita hasta la fecha. Arankalle y col. en 2003 en la India detectaron 6 (9,1%) sueros positivos de un total de 66 cerdos muestreados. En España, Pina y col. en el 2000, y Clemente-Casares y col. en el 2003, no encontraron ningún cerdo virémico en 73 y 48 animales muestreados, respectivamente. Choi y col. en el 2003 en Corea, encontraron un 2,34% de cerdos virémicos de un total de 128. Al comparar las cifras de prevalencia en función de la edad de los animales muestreados con los descritos en la bibliografía, se observó que los niveles hallados en este trabajo fueron también superiores. En el 2002, Wang y col. en China hallaron una prevalencia del 1,9% en cerdos mayores de 3 meses. En EEUU (Huang y col., 2002a) se detectaron 2 (12,5%) animales virémicos de 16 cerdos con edades comprendidas entre las 8 y las 16 semanas de vida. En un estudio realizado en Japón (Takahashi y col., 2003a), el 15% de 250 cerdos muestreados de 12 semanas fueron virémicos. No obstante, de los 750 animales de 6 meses que se analizaron en dicha investigación, ninguno resultó positivo.

En general, las diferencias en el número de animales virémicos en cada etapa fueron menos acusadas que las halladas en heces. Sin embargo, se observó un patrón similar al de los animales excretando el VHE con un aumento progresivo de la prevalencia desde la fase de lechón lactando hasta la de primer mes de cebo, que volvió a ser la etapa con mayor porcentaje de cerdos positivos al VHE en suero.

El porcentaje tan elevado de cerdos virémicos que se ha observado en el presente estudio indica que se debe considerar la posible transmisión alimentaria del VHE del cerdo al hombre. Según los datos obtenidos por Emerson y col. en 2005 el virus se inactiva a 60°C, lo cual podría explicar algunos casos de transmisión del VHE (Matsuda y col., 2003) en países donde existe tradición de ingerir algunos productos de origen porcino crudos o muy poco cocinados. En España, se consume una gran cantidad de productos derivados del cerdo, no sólo cocinados, sino conservados sin tratamiento térmico (embutidos curados). Por ello, sería necesario abrir nuevas vías de investigación para determinar la resistencia del virus al procesamiento de los productos de origen porcino que van a ser consumidos sin tratamiento por calor.

#### **5.1.4. Prevalencia total y por etapa productiva de animales portadores del VHE**

La elevada prevalencia de animales portadores (25,65%) no puede ser comparada con otros países puesto que no existen estudios realizados simultáneamente en heces y suero en una población porcina naturalmente infectada por el VHE en todas sus etapas. La prevalencia total (12,04%) de cerdos virémicos fue ligeramente menor a la observada en heces (19,37%). Ello puede ser debido a la corta duración (2 semanas como máximo) de la viremia descrita en infecciones experimentales (Kasorndorkbua y col., 2002; Meng y col., 1998b) en comparación con las 8 semanas que dura como máximo la excreción del VHE.

## **5.2. PREVALENCIA DEL VHE EN GRANJAS**

La mayoría de los trabajos orientados a identificar el VHE en granjas porcinas, se han centrado en la detección de anticuerpos anti-VHE. Sin embargo, apenas existen estudios que hayan obtenido datos acerca de la presencia del ARN VHE en un número suficiente de granjas que permita extraer conclusiones fiables. El porcentaje de granjas en las que se encontró el VHE en cerdos en este estudio (57,14%) ha sido ligeramente superior al descrito en Méjico y en Tailandia, obteniendo una prevalencia del 50% de un total de 10 granjas y un 42,85% de 7 granjas muestreadas, respectivamente (Cooper y col., 2005). En EEUU, Kasorndorkbua y col., en 2005 describieron una prevalencia del 25% de un total de 28 granjas muestradas. En dicho trabajo encontramos el único estudio que detecta el VHE en fosas de purines de granjas. En el muestreo de las 28 granjas se tomaron varias muestras de cada fosa de purines, además de muestras de heces de grupos de animales pertenecientes a la misma explotación. El porcentaje de fosas de purines positivas fue del 68,18% frente al 38,10% hallado en nuestro estudio. El mayor número de fosas positivas detectado por estos autores puede deberse a que realizaron una concentración vírica previa de la muestra, lo cual aumenta considerablemente la sensibilidad de la detección.

Las discrepancias observadas en nuestro estudio en la presencia del VHE entre los animales de ciertas granjas y la ausencia del mismo en las fosas de purines de esas mismas granjas, podrían deberse a un insuficiente número de muestras de la misma fosa de purines, ya que solamente se tomó una única muestra de 100 mL de cada fosa y no se realizó concentración vírica previa a la extracción de ácidos nucleicos. Asimismo, las discrepancias observadas en la

presencia del VHE en las fosas de purines de ciertas granjas y su ausencia en los animales de esas mismas granjas pueden ser debidas al escaso número de animales muestreados, ya que en todos estos casos, la muestra fue de 4 animales.

Con respecto al tipo de granja en el que se aisló más frecuentemente el VHE, el único trabajo que hace referencia a estos datos es el realizado por Kasorndorkbua y col. en 2005. En dicho estudio se observaron prevalencias menores que las descritas en el presente trabajo, con valores de 66,67% para los cebaderos y las explotaciones de ciclo cerrado, mientras que en la única granja productora de lechones muestreada no se identificó el virus. En este sentido, los datos obtenidos por estos autores en los cebaderos (no sólo determinando el VHE en heces de animales, sino en las fosas de purines de estas granjas), son congruentes con los hallazgos del presente trabajo de investigación, ya que se ha observado que la etapa productiva en la que se ha encontrado el mayor número de cerdos infectados ha sido el primer mes de cebo. La mayor presencia del VHE en las explotaciones de ciclo cerrado puede explicarse porque en dichas granjas todas las etapas productivas van rotando por las mismas naves sin que se produzca habitualmente un vacío sanitario, debido a que el flujo de producción es continuo sin separación entre lotes. La ausencia de vacío sanitario y de medidas de desinfección apropiadas, favorecería que el virus se perpetuara en la explotación.

El elevado número de granjas (71,43%) en las que se identificó el VHE (en alguno de los tipos de muestras obtenidos), también fue superior al descrito por Kasorndorkbua y col. (64,29%) y es indicativo de que el VHE se encuentra ampliamente distribuido en la población porcina de la Comunidad Valenciana.



Recientes datos sugieren que la hepatitis E es una zoonosis (Meng y col., 1998b). La detección de anticuerpos anti-VHE en países industrializados donde la hepatitis E no se considera endémica, ha conducido a establecer la hipótesis de la existencia de uno o varios reservorios animales para el VHE (Thomas y col., 1997). El aislamiento del VHE en ganado porcino de Estados Unidos (Meng y col., 1997) y su estrecha relación genética con otras cepas aisladas en humanos del mismo país permiten reforzar esta hipótesis.

El hallazgo de un 38,10% de las granjas estudiadas positivas al VHE en fosa de purines genera preocupación debido a la posible utilización de dichos purines como fertilizantes. Además, mediante la lixiviación por lluvias se podría producir la contaminación de acuíferos, pudiendo alcanzar, en último lugar a la población humana, con el consiguiente problema de salud pública que ello supone, ya que se ha demostrado experimentalmente que el VHE puede atravesar la barrera de la especie. En este sentido, se han infectado primates con el VHE porcino (Meng y col., 1998b), y cerdos, corderos (Usmanov y col., 1994) y ratas con el VHE humano (Maneerat y col., 1996). Los cerdos inoculados con el aislado VHE humano americano rápidamente fueron virémicos y seroconvirtieron, sugiriendo que esta variante está perfectamente adaptada en el cerdo y quizás su origen sea realmente porcino. Todas estas demostraciones del cruce de la barrera interespecie sugieren que la infección por el VHE constituye un importante problema en salud pública, en el que se ven implicadas aquellas personas que trabajan con cerdos y que presentarían un alto riesgo de padecer la infección por el VHE. Así, se han publicado diferentes estudios en los que se demuestra una elevada prevalencia de anti-VHE en personas que tenían una exposición

ocupacional con cerdos (Withers y col., 2002). Si se confirma la posibilidad de que el VHE se transmita del cerdo al hombre, la utilización de tejidos y órganos animales como xenotrasplante puede ser un problema a tener en cuenta y se debería considerar a este virus como un agente xenogénico potencial.

### **5.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLADOS PORCINOS DEL VHE**

Hasta la realización de este trabajo, solamente se habían identificado 2 cepas de origen porcino en España, una de ellas proveniente de aguas residuales de un matadero de porcino (Pina y col., 2000) y la otra de una mezcla de heces en una granja (Clemente-Casares y col., 2003), ambas en Cataluña. Muy recientemente, se han publicado tres estudios que aportan nuevas secuencias porcinas en España. Los dos primeros han sido realizados por nuestro grupo de investigación en la Comunidad Valenciana identificando 16 secuencias que han sido incluidas en esta tesis. Entre estos aislados se encuentran las primeras cepas europeas halladas en fosas de purines (Fernández-Barredo y col., 2006 y Fernández-Barredo y col., 2007 en prensa). El tercero es un estudio que detecta el ARN VHE en diferentes tipos de órganos de cerdos sacrificados debido a otras enfermedades infecciosas diferentes a la HE en Cataluña (de Deus y col., 2007). En todas estas publicaciones, los aislados se situaron dentro del genotipo 3.

Las 30 secuencias halladas en el presente estudio han permitido ampliar el conocimiento de las cepas de VHE que se hallan circulando en España y su relación con las cepas identificadas en pacientes españoles sin historial de viaje al extranjero. Tras su análisis filogenético, todas las secuencias detectadas se agruparon dentro del subtipo 3f (genotipo 3) descrito por Lu y col., en 2005, junto con cepas autóctonas humanas españolas. Estos datos son similares a los obtenidos en otros países desarrollados en los que las cepas porcinas y humanas de la misma región mostraron más homología entre ellas que entre otras de su misma especie pertenecientes a áreas diferentes (Ahn y col., 2005; Hsieh y col., 1999; Ijaz y col., 2005; Meng y col., 1997; Takahashi y col., 2003a).

La presencia de dos agrupaciones de las secuencias identificadas en este estudio en el árbol filogenético, sugiere la existencia de dos orígenes diferentes en las cepas del VHE que se encuentran circulando en las granjas estudiadas. En una de las agrupaciones se situaron las cepas NT2 y NT4, identificadas en pacientes británicos (Ijaz y col., 2005) junto con otra identificada en un paciente de Barcelona (Pina y col., 2000). Ijaz y col., señalaron que dos de los pacientes clasificados sin historia de viaje a zona endémica (NT) habían viajado previamente a España, por lo que ésta podría ser la causa de que estas dos cepas se sitúen en la misma agrupación que las cepas porcinas españolas (si bien en la publicación no se especificaron qué cepas pertenecían a los pacientes que viajaron a España). En el otro grupo, se dispusieron el resto de cepas porcinas de este estudio junto con cepas porcinas de Holanda y una secuencia perteneciente a un paciente con hepatitis E de Barcelona.

La importación de lechones de Holanda (principal exportador europeo de ganado porcino vivo) podría ser la causa más probable de que algunas de las cepas identificadas en este estudio muestren una elevada homología nucleotídica con cepas identificadas en Holanda que oscila entre el 84,80% de la cepa SpswmCV7 con la cepa holandesa NLSW28 hasta el 94,70% de homología de las cepas SpswsCV16, SpswsCV8, SpswsCV15, SpswfCV5, SpswmCV10, SpswsCV14, SpswsCV4, U1-H, SpswCV2 y SpswsCV13 con la cepa holandesa NLSW15. En este sentido, cabe destacar que la producción de lechones en España es del todo insuficiente para las plazas de engorde existentes, siendo nuestro país el tercer importador de lechones de Europa.

La presencia de aislados estrechamente relacionados dentro de una misma granja pero diferenciados de otras granjas puede indicar que una o varias cepas predominantes se han mantenido dentro de la misma granja durante un largo periodo de tiempo. No obstante, existe una gran homología entre un número elevado de las granjas muestreadas que sugiere que la mayoría de las cepas se hallan circulando entre las distintas granjas. Una posible explicación de esta circulación de las mismas cepas podría ser el origen común de muchos de los lechones que se engordan en estas granjas, pero sería interesante investigar acerca de otras posibles vías de transmisión de estas cepas, por ejemplo mediante profesionales que suelen visitar diferentes granjas (veterinarios, controladores) y los vehículos de transporte de estos, roedores que pueden entrar y salir libremente de las granjas, etc.

El elevado porcentaje de homología hallado entre las cepas porcinas de este estudio y las humanas autóctonas españolas viene a sumarse a los trabajos publicados por los autores de diferentes países industrializados (Ahn y col.,

2005; Hsieh y col., 1999; Ijaz y col., 2005; Meng y col., 1997; Takahashi y col., 2003a), y que sitúan al VHE como un agente zoonótico. El aumento en la detección de casos de HE autóctona tras la mejora de las técnicas de diagnóstico de esta patología, revela que el VHE debería empezar a considerarse en España como un problema emergente de salud pública.



## **6. CONCLUSIONES**





## **6. CONCLUSIONES**

1. La prevalencia del ARN VHE hallada ha sido elevada tanto en muestras de suero como de heces. Estos valores variaron sensiblemente dependiendo de la etapa productiva seleccionada para realizar el estudio. El número de individuos infectados por el VHE aumentó desde las primeras semanas de vida hasta alcanzar el máximo hacia el comienzo del cebo. Asimismo, la elevada prevalencia del ARN VHE hallada en las heces de cerdas en lactación sugiere que éstas pueden ser una fuente importante de infección del VHE para los lechones.
2. Los animales que se encuentran en el primer mes de cebo tienen un riesgo mayor de excretar el VHE en heces que en el resto de etapas productivas.
3. El elevado número de granjas en las que se ha encontrado el VHE demuestra que este virus se encuentra ampliamente distribuido entre las explotaciones porcinas de la Comunidad Valenciana.
4. La elevada prevalencia del VHE hallada en las fosas de purines de las granjas estudiadas unido al carácter zoonótico de este virus, puede constituir un problema emergente en salud pública debido a las prácticas de uso de los purines porcinos como fertilizantes agrícolas.
5. Las cepas porcinas secuenciadas mostraron unos porcentajes mayores de homología dentro de la misma granja en comparación a los observados entre granjas, lo cual sugiere que una o varias cepas predominantes se mantienen dentro de una misma explotación.

6. Estas secuencias aisladas mostraron una mayor homología con las cepas autóctonas humanas identificadas hasta el momento en España, que con las cepas porcinas pertenecientes a otros países europeos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- Aggarwal R, Naik SR. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J.Hepatol.* 1994; 21:718-723.
- Aggarwal, R., McCaustland, K. A., Dilawari, J. B., Sinha, S. D., and Robertson, B. H. Genetic variability of hepatitis E virus within and between three epidemics in India. *Virus Res.* 1999; 1(59): 35-48.
- Aggarwal, R., Kini, D., Sofat, S., Naik, S. R., and Krawczynski, K. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet* 2000; 9235(356): 1081-1082.
- Ahn, J. M., Kang, S. G., Lee, D. Y., Shin, S. J., and Yoo, H. S. Identification of novel human hepatitis E virus (HEV) isolates and determination of the seroprevalence of HEV in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 7(43): 3042-3048.
- Aikawa, T., Kojima, M., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Identification of indigenous hepatitis E virus from a Japanese patient who contracted sporadic acute hepatitis in 1982. *J. Infect. Dis.* 2002; 10(186): 1535-1536.
- Arankalle, V. A., Chadha, M. S., Banerjee, K., Srinivasan, M. A., and Chobe, L. P. Hepatitis E virus infection in pregnant rhesus monkeys. *Indian J. Med. Res.* 1993; 97: 4-8.
- Arankalle, V. A., Chadha, M. S., and Chobe, L. P. Long-term serological follow up and cross-challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus. *J. Hepatol.* 1999a; 2(30): 199-204.

- Arankalle, V. A., Paranjape, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Walimbe, A. M. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). *J. Gen. Virol.* 1999b; 80 ( Pt 7): 1691-1700.
- Arankalle, V. A., Chadha, M. S., Mehendale, S. M., and Tungatkar, S. P. Epidemic hepatitis E: serological evidence for lack of intrafamilial spread. *Indian J. Gastroenterol.* 2000a; 1(19): 24-28.
- Arankalle, V. A. and Chobe, L. P. Retrospective analysis of blood transfusion recipients: evidence for post-transfusion hepatitis E. *Vox Sang.* 2000b; 2(79): 72-74.
- Arankalle, V. A., Joshi, M. V., Kulkarni, A. M., Gandhe, S. S., Chobe, L. P., Rautmare, S. S., Mishra, A. C., and Padbidri, V. S. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J. Viral Hepat.* 2001; 3(8): 223-227.
- Arankalle, V. A., Chobe, L. P., Joshi, M. V., Chadha, M. S., Kundu, B., and Walimbe, A. M. Human and swine hepatitis E viruses from Western India belong to different genotypes. *J. Hepatol.* 2002; 3(36): 417-425.
- Arankalle, V. A., Chobe, L. P., Walimbe, A. M., Yergolkar, P. N., and Jacob, G. P. Swine HEV infection in south India and phylogenetic analysis (1985-1999). *J. Med. Virol.* 2003; 3(69): 391-396.
- Aye, T. T., Uchida, T., Ma, X. Z., Iida, F., Shikata, T., Zhuang, H., and Win, K. M. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res.* 1992; 13(20): 3512

- Aye, T. T., Uchida, T., Ma, X., Iida, F., Shikata, T., Ichikawa, M., Rikihisa, T., and Win, K. M. Sequence and gene structure of the hepatitis E virus isolated from Myanmar. *Virus Genes* 1993; 1(7): 95-109.
- Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P., and Poleschuk, V. F. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 1(20): 23-31.
- Balayan, M. S., Usmanov, R. K., Zamyatina, N. A., Djumaliev, D. I., and Karas, F. R. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J. Med. Virol.* 1990; 1(32): 58-59.
- Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J., and Dalton, H. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2004a; 5(10): 953-955.
- Banks, M., Heath, G. S., Grierson, S. S., King, D. P., Gresham, A., Gironés, R., Widen, F., and Harrison, T. J. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 2004b; 8(154): 223-227.
- Benfield, D. A., Stotz, I., Moore, R., and McAdaragh, J. P. Shedding of rotavirus in feces of sows before and after farrowing. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 1(16): 186-190.
- Berke, T., Golding, B., Jiang, X., Cubitt, D. W., Wolfaardt, M., Smith, A. W., and Matson, D. O. Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *J. Med. Virol.* 1997; 4(52): 419-424.

- Berke, T. and Matson, D. O. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch. Virol.* 2000; 7(145): 1421-1436.
- Boxall, E., Herborn, A., Kochethu, G., Pratt, G., Adams, D., Ijaz, S., and Teo, C. G. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus.Med.* 2006; 2(16): 79-83.
- Bradley, D. W., Krawczynski, K., Cook, E. H., Jr., McCaustland, K. A., Humphrey, C. D., Spelbring, J. E., Myint, H., and Maynard, J. E. 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 viruslike particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1987; 17(84): 6277-6281.
- Bradley, D., Andjaparidze, A., Cook, E. H., Jr., McCaustland, K., Balayan, M., Stetler, H., Velazquez, O., Robertson, B., Humphrey, C., Kane, M., and . Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J. Gen. Virol.* 1988; 69 ( Pt 3): 731-738.
- Bryan, J. P., Iqbal, M., Tsarev, S., Malik, I. A., Duncan, J. F., Ahmed, A., Khan, A., Khan, A., Rafiqi, A. R., Purcell, R. H., and Legters, L. J. Epidemic of hepatitis E in a military unit in Abbotrabad, Pakistan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 6(67): 662-668.
- Buisson, Y., Grandadam, M., Nicand, E., Cheval, P., Cuyck-Gandre, H., Innis, B., Rehel, P., Coursaget, P., Teyssou, R., and Tsarev, S.



- Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria. *J. Gen. Virol.* 2000; Pt 4(81): 903-909.
- Buti, M., Jardí, R., Cotrina, M., Rodríguez-Frias, F., Troonen, H., Viladomiu, L., Esteban, J. I., Esteban, R., and Guardia, J. Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. *J. Virol. Methods* 1995; 1(55): 49-54.
  - Buti, M., Clemente-Casares, P., Jardí, R., Formiga-Cruz, M., Schaper, M., Valdes, A., Rodríguez-Frias, F., Esteban, R., and Girones, R. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J. Hepatol.* 2004; 1(41): 126-131.
  - Chandler, J. D., Riddell, M. A., Li, F., Love, R. J., and Anderson, D. A. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet. Microbiol.* 1999; 1-2(68): 95-105.
  - Chapman, B. A., Burt, M. J., Wilkinson, I. D., and Schousboe, M. I. Community acquired viral hepatitis in New Zealand: a case of sporadic hepatitis E virus infection. *Aust. N. Z. J. Med.* 1993; 6(23): 722-723.
  - Chauhan, A., Jameel, S., Dilawari, J. B., Chawla, Y. K., Kaur, U., and Ganguly, N. K. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 1993; 8838 (341): 149-150.
  - Chen, H. Y., Lu, Y., Howard, T., Anderson, D., Fong, P. Y., Hu, W. P., Chia, C. P., and Guan, M. Comparison of a new immunochromatographic test to enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of immunoglobulin m antibodies to hepatitis e virus in human sera. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 2005; 5(12): 593-598.

- Choi, I. S., Kwon, H. J., Shin, N. R., and Yoo, H. S. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea. *J.Clin.Microbiol.* 2003; 8(41): 3602-3608.
- Clayson, E. T., Myint, K. S., Snitbhan, R., Vaughn, D. W., Innis, B. L., Chan, L., Cheung, P., and Shrestha, M. P. Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG responses in patients with hepatitis E. *J. Infect. Dis.* 1995; 4(172): 927-933.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., and Girones, R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 4(9): 448-454.
- Cooper, K., Huang, F. F., Batista, L., Rayo, C. D., Bezanilla, J. C., Toth, T. E., and Meng, X. J. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 4(43): 1684-1688.
- Corwin, A., Jarot, K., Lubis, I., Nasution, K., Suparmawo, S., Sumardiati, A., Widodo, S., Nazir, S., Orndorff, G., Choi, Y., and . Two years' investigation of epidemic hepatitis E virus transmission in West Kalimantan (Borneo), Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1995; 3(89): 262-265.
- Cuyck-Gandre, H., Zhang, H. Y., Tsarev, S. A., Clements, N. J., Cohen, S. J., Caudill, J. D., Buisson, Y., Coursaget, P., Warren, R. L., and Longer, C. F. Characterization of hepatitis E virus (HEV) from Algeria

- and Chad by partial genome sequence. *J. Med. Virol.* 1997; 4(53): 340-347.
- Cuyck-Gandre, H., Cockman-Thomas, R., Caudill, J. D., Asher, L. S., Armstrong, K. L., Hauroeder, B., Clements, N. J., Binn, L. N., and Longer, C. F. Experimental African HEV infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Virol.* 1998; 3(55): 197-202.
  - Cuyck-Gandre, H., Zhang, H. Y., Tsarev, S. A., Warren, R. L., Caudill, J. D., Snellings, N. J., Begot, L., Innis, B. L., and Longer, C. F. Short report: phylogenetically distinct hepatitis E viruses in Pakistan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 2(62): 187-189.
  - de Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martín, M., and Segalés, J. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet. Microbiol.* 2007; 31(119):105-114.
  - Dienstag, J. L. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology* 1983; 2(85): 439-462.
  - Donati M.C., Fagan E.A., Harrison T.J. Sequence analysis of full length HEV clones derived directly from human liver in fulminant hepatitis E. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G (eds). Edizioni Minerva Medica: Torino, 1997; 313–316.
  - Drabick, J. J., Gambel, J. M., Gouvea, V. S., Caudill, J. D., Sun, W., Hoke, C. H., Jr., and Innis, B. L. A cluster of acute hepatitis E infection in United Nations Bangladeshi peacekeepers in Haiti. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1997; 4(57): 449-454.

- Emerson, S. U. and Purcell, R. H. Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol. Med.* 2001; 10(7): 462-466.
- Emerson, S. U. and Purcell, R. H. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 2003; 3(13): 145-154.
- Emerson, S. U., Anderson, D., Arankalle, V. A., Meng, X. J., Purdy, M., Schlauder, G. G., and Tsarev, S. A. Hepevirus. 2004a 851-855.
- Emerson, S. U. and Purcell, R. H. Running like water--the omnipresence of hepatitis E. *N. Engl. J. Med.* 2004b; 23(351): 2367-2368.
- Emerson, S. U., Arankalle, V. A., and Purcell, R. H. Thermal stability of hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* 2005; 5(192): 930-933.
- Erker, J. C., Desai, S. M., Schlauder, G. G., Dawson, G. J., and Mushahwar, I. K. A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J.Gen.Virol.* 1999;80 ( Pt 3): 681-690.
- Favorov, M. O., Fields, H. A., Purdy, M. A., Yashina, T. L., Aleksandrov, A. G., Alter, M. J., Yarasheva, D. M., Bradley, D. W., and Margolis, H. S. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* 1992; 4(36): 246-250.
- Favorov, M. O., Khudyakov, Y. E., Fields, H. A., Khudyakova, N. S., Padhye, N., Alter, M. J., Mast, E., Polish, L., Yashina, T. L., Yarasheva, D. M., and . Enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus based on synthetic peptides. *J. Virol. Methods* 1994; 2(46): 237-250.

- Favorov, M. O., Kosoy, M. Y., Tsarev, S. A., Childs, J. E., and Margolis, H. S. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J. Infect. Dis.* 2000; 2(181): 449-455.
- Fernández-Barredo, S., Galiana, C., García, A., Vega, S., Gómez, M. T., and Pérez-Gracia, M. T. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest* 2006; 5(18): 462-465.
- Fernández-Barredo, S., Galiana, C., García, A., Vega, S., Gómez, M. T., Rodríguez-Iglesias M., and Pérez-Gracia, M. T. Prevalence and Genetic Characterization of Hepatitis E Virus (HEV) in Paired Samples of Feces and Serum from Naturally Infected Pigs. *Can. J. Vet. Res.* 2007. In press.
- Fry, K. E., Tam, A. W., Smith, M. M., Kim, J. P., Luk, K. C., Young, L. M., Piatak, M., Feldman, R. A., Yun, K. Y., Purdy, M. A., and . Hepatitis E virus (HEV): strain variation in the nonstructural gene region encoding consensus motifs for an RNA-dependent RNA polymerase and an ATP/GTP binding site. *Virus Genes* 1992; 2(6): 173-185.
- Fukuda, S., Sunaga, J., Saito, N., Fujimura, K., Itoh, Y., Sasaki, M., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among Japanese blood donors: identification of three blood donors infected with a genotype 3 hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 2004; 4(73): 554-561.
- Garkavenko, O., Obriadina, A., Meng, J., Anderson, D. A., Benard, H. J., Schroeder, B. A., Khudyakov, Y. E., Fields, H. A., and Crosson, M. C.

- Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J.Med.Virol.* 2001; 3(65): 525-529.
- Gelberg, H. B., Woode, G. N., Kniffen, T. S., Hardy, M., and Hall, W. F. The shedding of group A rotavirus antigen in a newly established closed specific pathogen-free swine herd. *Vet. Microbiol.* 1991; 3(28): 213-229.
  - 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. Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis.* 2000;181 (Suppl 2): S322-S330.
  - Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H., and Meng, X. J. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* 2001; Pt 10(82): 2449-2462.
  - He, J., Innis, B. L., Shrestha, M. P., Clayson, E. T., Scott, R. M., Linthicum, K. J., Musser, G. G., Gigliotti, S. C., Binn, L. N., Kuschner, R. A., and Vaughn, D. W. Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 12(40): 4493-4498.
  - Hepatitis E, Chad. *Wkly.Epidemiol.Rec.* 2004a; 35(79): 313
  - Hepatitis E, Sudan--update. *Wkly.Epidemiol.Rec.* 2004b; 38(79): 341-342.
  - Hepatitis E: Chad, Sudan. *Wkly.Epidemiol.Rec.* 2004c; 36(79): 321
  - Hermann et al 1995 in *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial infections*, 7th ed.

- Hla, Myint, Myint, Myint Soe, Tun, Khin, Thein-Maung, Myint, and Khin, Maung Tin. A clinical and epidemiological study of an epidemic of non-A non-B hepatitis in Rangoon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1985; 6(34): 1183-1189.
- Hsieh, S. Y., Meng, X. J., Wu, Y. H., Liu, S. T., Tam, A. W., Lin, D. Y., and Liaw, Y. F. 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; 12(37): 3828-3834.
- Huang, C. C., Nguyen, D., Fernández, J., Yun, K. Y., Fry, K. E., Bradley, D. W., Tam, A. W., and Reyes, G. R. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 1992; 2(191): 550-558.
- Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., Toth, T. E., and Meng, X. J. 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.* 2002a; 4(40): 1326-1332.
- Huang, F. F., Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Guenette, D. K., Woolcock, P. R., Larsen, C. T., Pierson, F. W., Elvinger, F., Toth, T. E., and Meng, X. J. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2002b; 11(40): 4197-4202.
- Ijaz, S., Arnold, E., Banks, M., Bendall, R. P., Cramp, M. E., Cunningham, R., Dalton, H. R., Harrison, T. J., Hill, S. F., Macfarlane, L.,

- Meigh, R. E., Shafi, S., Sheppard, M. J., Smithson, J., Wilson, M. P., and Teo, C. G. Non-travel-associated hepatitis e in England and wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J. Infect. Dis.* 2005; 7(192): 1166-1172.
- Inoue, J., Takahashi, M., Yazaki, Y., Tsuda, F., and Okamoto, H. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J. Virol. Methods* 2006; 2(137): 325-333.
  - Irshad, M. Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics. *Intervirol* 1999; 4(42): 252-262.
  - Jardi, R., Buti, M., Rodríguez-Frias, F., and Esteban, R. Hepatitis E infection in acute sporadic hepatitis in Spain. *Lancet* 1993; 8856(341): 1355-1356.
  - Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X. J., and Hill, V. R. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 2006; 1(131): 65-71.
  - Kabrane-Lazizi, 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. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 2(61): 331-335.
  - Karetnyi, IuV, Dzhumaliev, D. I., Usmanov, R. K., Titova, I. P., Litvak, I. I., and Balaian, M. S. [The possible involvement of rodents in the



- spread of viral hepatitis E]. *Zh.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol.* 1993; 4: 52-56.
- Kasorndorkbua, C., Halbur, P. G., Thomas, P. J., Guenette, D. K., Toth, T. E., and Meng, X. J. Use of a swine bioassay and a RT-PCR assay to assess the risk of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J. Virol. Methods* 2002; 1-2(101): 71-78.
  - Kasorndorkbua, C., Thacker, B. J., Halbur, P. G., Guenette, D. K., Buitenwerf, R. M., Royer, R. L., and Meng, X. J. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can. J. Vet. Res.* 2003; 4(67): 303-306.
  - Kasorndorkbua, C., Guenette, D. K., Huang, F. F., Thomas, P. J., Meng, X. J., and Halbur, P. G. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 11(42): 5047-5052.
  - Kasorndorkbua, C., Opriessnig, T., Huang, F. F., Guenette, D. K., Thomas, P. J., Meng, X. J., and Halbur, P. G. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 12(71): 7831-7837.
  - Khudyakov, Y. E., Khudyakova, N. S., Fields, H. A., Jue, D., Starling, C., Favorov, M. O., Krawczynski, K., Polish, L., Mast, E., and Margolis, H. Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology* 1993; 1(194): 89-96.
  - Khudyakov, Y.E., Favorov, M.O., Khudyakova, N.S., Cong, M.E., Holloway, B.P., Padhye, N., Lambert, S.B., Jue, D.L., Fields, H.A.

- Artificial mosaic protein containing antigenic epitopes of hepatitis E virus. *J.Virol.* 1994; 68:7067-74.
- Khuroo, M. S. 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. *Am. J. Med.* 1980; 6(68): 818-824.
  - Khuroo, M. S. and Kamili, S. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J.Viral Hepat.* 2003; 1(10): 61-69.
  - Khuroo, M. S., Kamili, S., and Yattoo, G. N. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 7(19): 778-784.
  - Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E., Purdy, M. A., Rozanov, M. N., Reyes, G. R., and Bradley, D. W. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1992; 17(89): 8259-8263.
  - Krawczynski, K. and Bradley, D. W. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J. Infect. Dis.* 1989; 6(159): 1042-1049.
  - Kumar, R. M., Uduman, S., Rana, S., Kochiyil, J. K., Usmani, A., and Thomas, L. Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2001; 1(100): 9-15.

- Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J. B., and Murthy, N. S. Hepatitis E in pregnancy. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2004a; 3(85): 240-244.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 2004b; 2(5): 150-163.
- Kuno, A., Ido, K., Isoda, N., Satoh, Y., Ono, K., Satoh, S., Inamori, H., Sugano, K., Kanai, N., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Sporadic acute hepatitis E of a 47-year-old man whose pet cat was positive for antibody to hepatitis E virus. *Hepatology Research* 2003; 3(26): 237-242.
- Lee CC, Shih YL, Laio CS, Lin SM, Huang MM, Chen CJ et al. Prevalence of Antibody to Hepatitis E Virus among Haemodialysis Patients in Taiwan: Possible Infection by Blood Transfusion. *Nephron Clin. Pract.* 2005; 99(4):122-127.
- Li, T., Takeda, N., and Miyamura, T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 2001; 25-26(19): 3476-3484.
- Li, T. C., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y., Wang, J. C., Engvall, H., Hammar, L., Xing, L., and Cheng, R. H. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* 2005; 20(79): 12999-13006.
- Lin, C. C., Wu, J. C., Chang, T. T., Chang, W. Y., Yu, M. L., Tam, A. W., Wang, S. C., Huang, Y. H., Chang, F. Y., and Lee, S. D. Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests

- based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 11(38): 3915-3918.
- Lu, L., Drobeniuc, J., Kobylnikov, N., Usmanov, R. K., Robertson, B. H., Favorov, M. O., and Margolis, H. S. Complete sequence of a Kyrgyzstan swine hepatitis E virus (HEV) isolated from a piglet thought to be experimentally infected with human HEV. *J. Med. Virol.* 2004; 4(74): 556-562.
  - Lu, L., Li, C., and Hagedorn, C. H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev.Med.Virol.* 2005
  - Maneerat, Y., Clayson, E. T., Myint, K. S., Young, G. D., and Innis, B. L. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 1996; 2(48): 121-128.
  - Mansuy, J. M., Peron, J. M., Abravanel, F., Poirson, H., Dubois, M., Miedouge, M., Vischi, F., Alric, L., Vinel, J. P., and Izopet, J. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J. Med. Virol.* 2004; 3(74): 419-424.
  - Mateos, M.L., Teruel, J.L., Sierra, M.P., Gazapo, E., High prevalence of hepatitis E virus antibodies in Spanish hemodialysis patients. *Nephron* 1997; 76(2):231-232.
  - Matsubayashi, K., Nagaoka, Y., Sakata, H., Sato, S., Fukai, K., Kato, T., Takahashi, K., Mishiro, S., Imai, M., Takeda, N., and Ikeda, H. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous

- hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004; 6(44): 934-940.
- Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K., and Mishiro, S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 2003; 6(188): 944
  - Mayo, M. A. Changes to virus taxonomy 2004. *Arch. Virol.* 2005; 150 (1): 189-198.
  - McCrudden, R., O'Connell, S., Farrant, T., Beaton, S., Iredale, J. P., and Fine, D. Sporadic acute hepatitis E in the united kingdom: an underdiagnosed phenomenon? *Gut* 2000; 5(46): 732-733.
  - Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J., and Emerson, S. U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997; 18(94): 9860-9865.
  - Meng, X. J., Halbur, P. G., Haynes, J. S., Tsareva, T. S., Bruna, J. D., Royer, R. L., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch.Virol.* 1998a; 7(143): 1405-1415.
  - Meng, X. J., Halbur, P. G., Shapiro, M. S., Govindarajan, S., Bruna, J. D., Mushahwar, I. K., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J.Virol.* 1998b; 12(72): 9714-9721.
  - Meng, J., Cong, M., Dai, X., Pillot, J., Purdy, M. A., Fields, H. A., and Khudyakov, Y. E. Primary structure of open reading frame 2 and 3 of the

- hepatitis E virus isolated from Morocco. *J. Med. Virol.* 1999a; 2(57): 126-133.
- Meng, X. J., Dea, S., Engle, R. E., Friendship, R., Lyoo, Y. S., Sirinarumitr, T., Urairong, K., Wang, D., Wong, D., Yoo, D., Zhang, Y., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J. Med. Virol.* 1999b; 3(59): 297-302.
  - Meng, X. J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Toth, T. E., Engle, R. E., Emerson, S. U., and Purcell, R. H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 1(40): 117-122.
  - Mitsui, T., Tsukamoto, Y., Yamazaki, C., Masuko, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J. Med. Virol.* 2004; 4(74): 563-572.
  - Mizuo, H., Suzuki, K., Takikawa, Y., Sugai, Y., Tokita, H., Akahane, Y., Itoh, K., Gotanda, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 9(40): 3209-3218.
  - Myint, K. S., Endy, T. P., Gibbons, R. V., Laras, K., Mammen, M. P., Jr., Sedyaningsih, E. R., Seriwatana, J., Glass, J. S., Narupiti, S., and

- Corwin, A. L. Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 4(44): 1581-1583.
- Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., Taira, M., Ohno, A., Sakugawa, H., Arai, M., and Mishiro, S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatology Res.* 2006
  - Nishizawa, T., Takahashi, M., Mizuo, H., Miyajima, H., Gotanda, Y., and Okamoto, H. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome. *J. Gen. Virol.* 2003; Pt 5(84): 1245-1251.
  - Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U., and Yoshikawa, A. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 5(289): 929-936.
  - Panda, S. K., Ansari, I. H., Durgapal, H., Agrawal, S., and Jameel, S. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J. Virol.* 2000; 5(74): 2430-2437.
  - Pavia, M., Iiritano, E., Veratti, M. A., and Angelillo, I. F. Prevalence of hepatitis E antibodies in healthy persons in southern Italy. *Infection* 1998; 1(26): 32-35.
  - Pérez-Gracia, M.T., García-Valdivia S., Galan F., López-Barba J., Rodríguez-Iglesias M. Detection of Acute Hepatitis E by PCR and IgM Anti-HEV in Southern Spain. Limited Usefulness of Viremia Due to Its Transitory Nature and Long-Term Persistence of IgM Antibodies.

- Proceedings of 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ASM's Annual Meeting on Infectious Diseases). Chicago, Illinois, USA December 2001
- Perez-Gracia, M. T. and Rodriguez-Iglesias, M. [Hepatitis E virus: current status]. *Med. Clin. (Barc.)* 2003; 20(121): 787-792.
  - Pérez-Gracia, M. T., García-Valdivia, M. S., Galan, F., and Rodríguez-Iglesias, M. A. Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol.* 2004; 3(48): 197-200.
  - Pina, S., Jofre, J., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Girones, R. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 11(64): 4485-4488.
  - Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J., and Girones, R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J. Hepatol.* 2000; 5(33): 826-833.
  - Piper-Jenks, N., Horowitz, H. W., and Schwartz, E. Risk of hepatitis E infection to travelers. *J. Travel. Med.* 2000; 4(7): 194-199.
  - Purcell, R.H. and Ticehurst, J.R. (1997) Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: epidemiology and clinical characteristics. En *Viral Hepatitis and Liver Disease* (Zuckerman, A.J., ed.), pp. 131-137, Allan R Liss Press, New York, USA.
  - Purcell, R. H., Nguyen, H., Shapiro, M., Engle, R. E., Govindarajan, S., Blackwelder, W. C., Wong, D. C., Prieels, J. P., and Emerson, S. U. Pre-



- clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine* 2003; 19-20(21): 2607-2615.
- 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. Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan: A common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997; 2(57): 151-157.
  - Reyes, G. R., Purdy, M. A., Kim, J. P., Luk, K. C., Young, L. M., Fry, K. E., and Bradley, D. W. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 4948(247): 1335-1339.
  - Robinson, R. A., Burgess, W. H., Emerson, S. U., Leibowitz, R. S., Sosnovtseva, S. A., Tsarev, S., and Purcell, R. H. Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* 1998; 1(12): 75-84.
  - Saad, M. D., Hussein, H. A., Bashandy, M. M., Kamel, H. H., Earhart, K. C., Fryauff, D. J., Younan, M., and Mohamed, A. H. Hepatitis E virus Infection in Work Horses in Egypt. *Infect. Genet. Evol.* 2006 (in press)
  - Sainokami, S., Abe, K., Kumagai, I., Miyasaka, A., Endo, R., Takikawa, Y., Suzuki, K., Mizuo, H., Sugai, Y., Akahane, Y., Koizumi, Y., Yajima, Y., and Okamoto, H. Epidemiological and clinical study of sporadic acute hepatitis E caused by indigenous strains of hepatitis E virus in Japan compared with acute hepatitis A. *J. Gastroenterol.* 2004; 7(39): 640-648.

- Sanchez, M.A., Moreno, M.E., García, A.A., and Mateos, M.L. Two new cases of autochthonous hepatitis E. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2002; 20(3):138.
- 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. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J. Gen. Virol.* 1998; 79 ( Pt 3): 447-456.
- Schlauder, G. G., Desai, S. M., Zanetti, A. R., Tassopoulos, N. C., and Mushahwar, I. K. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J. Med. Virol.* 1999; 3(57): 243-251.
- Schlauder, G. G., Frider, B., Sookoian, S., Castano, G. C., and Mushahwar, I. K. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J. Infect. Dis.* 2000; 1(182): 294-297.
- Schlauder, G. G. and Mushahwar, I. K. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 2001; 2(65): 282-292.
- Shrestha, S. M., Shrestha, S., Tsuda, F., Nishizawa, T., Gotanda, Y., Takeda, N., and Okamoto, H. Molecular investigation of hepatitis E virus infection in patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. *J. Med. Virol.* 2003; 2(69): 207-214.
- Singh, S., Mohanty, A., Joshi, Y. K., Deka, D., Mohanty, S., and Panda, S. K. Mother-to-child transmission of hepatitis E virus infection. *Indian J. Pediatr.* 2003; 1(70): 37-39.

- Skaug, K., Hagen, I. J., and von der, Lippe B. Three cases of acute hepatitis E virus infection imported into Norway. *Scand. J. Infect. Dis.* 1994; 2(26): 137-139.
- Somani, S. K., Aggarwal, R., Naik, S. R., Srivastava, S., and Naik, S. A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepat.* 2003; 6(10): 446-449.
- Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T., Sato, Y., Bando, M., Fukui, E., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 11(42): 5371-5374.
- Stevenson, P. Kathmandu - Nepal calls the shots in hepatitis E virus vaccine trial. *Lancet* 2000; 9215(355): 1623-1623.
- Sun, Z. F., Larsen, C. T., Dunlop, A., Huang, F. F., Pierson, F. W., Toth, T. E., and Meng, X. J. Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *J. Gen. Virol.* 2004; Pt 3(85): 693-700.
- Suzuki, K., Aikawa, T., and Okamoto, H. Fulminant hepatitis E in Japan. *N. Engl. J. Med.* 2002; 18(347): 1456
- Sylvan, S. P., Jacobson, S. H., and Christenson, B. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among hemodialysis patients in Sweden. *J. Med. Virol.* 1998; 1(54): 38-43.

- Takahashi, K., Kang, J. H., Ohnishi, S., Hino, K., and Mishiro, S. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J. Infect. Dis.* 2002a; 9(185): 1342-1345.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Yoshikawa, A., Sato, S., Isoda, N., Ido, K., Sugano, K., and Okamoto, H. Identification of two distinct genotypes of hepatitis E virus in a Japanese patient with acute hepatitis who had not travelled abroad. *J.Gen.Virol.* 2002b; Pt 8(83): 1931-1940.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Miyajima, H., Gotanda, Y., Iita, T., Tsuda, F., and Okamoto, H. 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.* 2003a; Pt 4(84): 851-862.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Identification of a genotype III swine hepatitis E virus that was isolated from a Japanese pig born in 1990 and that is most closely related to Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J. Clin. Microbiol.* 2003b; 3(41): 1342-1343.
- Takahashi, K., Kitajima, N., Abe, N., and Mishiro, S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 2004; 2(330): 501-505.
- Takahashi, M., Kusakai, S., Mizuo, H., Suzuki, K., Fujimura, K., Masuko, K., Sugai, Y., Aikawa, T., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Simultaneous Detection of Immunoglobulin A (IgA) and IgM Antibodies against Hepatitis E Virus (HEV) Is Highly Specific for Diagnosis of Acute HEV Infection. *J. Clin. Microbiol.* 2005a; 1(43): 49-56.

- Takahashi, M., Nishizawa, T., Tanaka, T., Tsatsralt-Od, B., Inoue, J., and Okamoto, H. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J. Gen. Virol.* 2005b; Pt 6(86): 1807-1813.
- Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K. E., and Reyes, G. R. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991; 1(185): 120-131.
- Taremi, M., Khoshbaten, M., Gachkar, L., EhsaniArdakani, M., and Zali M. Hepatitis E virus infection in hemodialysis patients: a seroepidemiological survey in Iran. *BMC Infect. Dis.* 2005; 5(1):36.
- Tarragó, D., López-Velez, R., Turrientes, C., Baquero, F., and Mateos, M. L. Prevalence of hepatitis E antibodies in immigrants from developing countries. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000; 4(19): 309-311.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., and Mishiro, S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 9381(362): 371-373.
- Thomas, D. L., Yarbough, P. O., Vlahov, D., Tsarev, S. A., Nelson, K. E., Saah, A. J., and Purcell, R. H. Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 5(35): 1244-1247.
- Ticehurst, J., Rhodes, L. L., Jr., Krawczynski, K., Asher, L. V., Engler, W. F., Mensing, T. L., Caudill, J. D., Sjogren, M. H., Hoke, C. H., Jr., LeDuc, J. W. Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus

- monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *J. Infect. Dis.* 1992; 5(165): 835-845.
- Tokita, H., Harada, H., Gotanda, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Molecular and serological characterization of sporadic acute hepatitis E in a Japanese patient infected with a genotype III hepatitis E virus in 1993. *J. Gen. Virol.* 2003; Pt 2(84): 421-427.
  - Tsarev, S. A., Emerson, S. U., Reyes, G. R., Tsareva, T. S., Legters, L. J., Malik, I. A., Iqbal, M., and Purcell, R. H. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1992; 2(89): 559-563.
  - Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Govindarajan, S., Shapiro, M., Gerin, J. L., and Purcell, R. H. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994a; 21(91): 10198-10202.
  - Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Yarbough, P. O., Legters, L. J., Moskal, T., and Purcell, R. H. Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys. *J. Med. Virol.* 1994b; 2(43): 135-142.
  - Tsarev, S. A., Binn, L. N., Gomatos, P. J., Arthur, R. R., Monier, M. K., Cuyck-Gandre, H., Longer, C. F., and Innis, B. L. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J. Med. Virol.* 1999; 1(57): 68-74.
  - Tsarev, S. A., Tsareva, T. S., Emerson, S. U., Rippey, M. K., Zack, P., Shapiro, M., and Purcell, R. H. Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring

- and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J. Infect. Dis.* 1995; 1(172): 31-37.
- Usmanov, R. K., Balaian, M. S., Dzhumaliev, D. I., Alymbaeva, D. B., Korolev, M. B., Karas', F. R., Zamiatina, N. A., Berdikozhova, S. K., Karymshakova, ChT, Kozhomkulov, E. T., and . [Experimental hepatitis E infection in piglets]. *Vopr. Virusol.* 1991a; 3(36): 212-216.
  - Usmanov, R. K., Favorov, M. O., Vasil'eva, V. I., Aidarbekova, D. S., Karas', F. R., Iashina, T. L., Mineeva, R. M., Aslanian, R. G., Zairov, G. K., Alymbaeva, D. B., and . [A comparative study of enteral hepatitis E (non-A, non-B) in the valley and mountainous areas of Kirghizia]. *Vopr. Virusol.* 1991b; 1(36): 66-69.
  - Usmanov, R. K., Balaian, M. S., Dvoynikova, O. V., Alymbaeva, D. B., Zamiatina, N. A., Kazachkov, IuA, and Belov, V. I. [An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus]. *Vopr. Virusol.* 1994; 4(39): 165-168.
  - van Cuyck, H., Juge, F., and Roques, P. Phylogenetic analysis of the first complete hepatitis E virus (HEV) genome from Africa. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003; 2(39): 133-139.
  - van der Poel, W. H., Verschoor, F., van der Heide R., Herrera, M. I., Vivo, A., Kooreman, M., and Roda Husman, A. M. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 6(7): 970-976.
  - Viswanathan, R. *Epidemiology. Indian J. Med. Res.* 1957; Suppl.(45): 1-29.

- Viswanathan, R. and SIDHU, A. S. Infectious hepatitis; clinical findings. Indian J. Med. Res. 1957; Suppl.(45): 49-58.
- Vitral, C. L., Pinto, M. A., Lewis-Ximenez, L. L., Khudyakov, Y. E., dos Santos, D. R., and Gaspar, A. M. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2005; 2(100): 117-122.
- Waar, K., Herremans, M. M., Vennema, H., Koopmans, M. P., and Benne, C. A. Hepatitis E is a cause of unexplained hepatitis in The Netherlands. J. Clin. Virol. 2005; 2(33): 145-149.
- Wang, Y., Zhang, H., Ling, R., Li, H., and Harrison, T. J. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. J. Gen. Virol. 2000; Pt 7(81): 1675-1686.
- 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., and Harrison, T. J. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. J. Med. Virol. 2002; 4(67): 516-521.
- Wibawa, I. D., Muljono, D. H., Mulyanto, Suryadarma, I. G., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: Identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus. J. Med. Virol. 2004; 1(73): 38-44.



- Widdowson, M. A., Jaspers, W. J. M., van der Poel, W. H. M., Verschoor, F., Husman, A. M. D., Winter, H. L. J., Zaaijer, H. L., and Koopmans, M. Cluster of cases of acute hepatitis associated with hepatitis E virus infection acquired in the Netherlands. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 1(36): 29-33.
- Withers, M. R., Correa, M. T., Morrow, M., Stebbins, M. E., Seriwatana, J., Webster, W. D., Boak, M. B., and Vaughn, D. W. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 4(66): 384-388.
- Wong, D. C., Purcell, R. H., Sreenivasan, M. A., Prasad, S. R., and Pavri, K. M. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 1980; 8200(2): 876-879.
- Worm, H. C., Schlauder, G. G., Wurzer, H., and Mushahwar, I. K. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. *J. Gen. Virol.* 2000; Pt 12(81): 2885-2890.
- Wu, J. C., Chen, C. M., Chiang, T. Y., Tsai, W. H., Jeng, W. J., Sheen, I. J., Lin, C. C., and Meng, X. J. Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan. *J. Med. Virol.* 2002; 4(66): 488-492.
- Xia, N. S., Zhang, J., Zheng, Y. J., Ge, S. X., Ye, X. Z., and Ou, S. H. Transfusion of plasma from a blood donor induced hepatitis E in Rhesus monkey. *Vox Sang.* 2004; 1(86): 45-47.

- Yajima, Y., Takahashi, N., Yamagishi, H., Kodama, A., Miyazaki, A., Sugiyama, K., Eda, Y., and Okamoto, H. [An acute hepatitis case domestically infected with a hepatitis E virus whose nucleotide sequence showed a high similarity to that from a domestic swine in Japan]. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 2003; 4(100): 454-458.
- Yamamoto, T., Suzuki, H., Toyota, T., Takahashi, M., and Okamoto, H. Three male patients with sporadic acute hepatitis E in Sendai, Japan, who were domestically infected with hepatitis E virus of genotype III or IV. *J. Gastroenterol.* 2004; 3(39): 292-298.
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., and Okamoto, H. 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; Pt 9(84): 2351-2357.
- Yoo, D., Willson, P., Pei, Y., Hayes, M. A., Deckert, A., Dewey, C. E., Friendship, R. M., Yoon, Y., Gottschalk, M., Yason, C., and Giulivi, A. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 2001; 6(8): 1213-1219.
- Zaaijer, H. L., Kok, M., Lelie, P. N., Timmerman, R. J., Chau, K., and van der Pal, H. J. Hepatitis E in The Netherlands: imported and endemic. *Lancet* 1993; 8848(341): 826-

- Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Panda, S. K., and Jameel, S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J. Virol.* 1997; 12(71): 9045-9053.
- Zanetti, A. R. and Dawson, G. J. Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E. *J. Med. Virol.* 1994; 3(42): 318-320.
- Zanetti, A. R., Schlauder, G. G., Romano, L., Tanzi, E., Fabris, P., Dawson, G. J., and Mushahwar, I. K. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J. Med. Virol.* 1999; 4(57): 356-360.
- Zhang, M., Emerson, S. U., Nguyen, H., Engle, R., Govindarajan, S., Blackwelder, W. C., Gerin, J., and Purcell, R. H. Recombinant vaccine against hepatitis E: duration of protective immunity in rhesus macaques. *Vaccine* 2002; 27-28(20): 3285-3291.
- Zhuang, H., Cao, X. Y., Liu, C. B., and Wang, G. M. Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol. Jpn.* 1991; 26 Suppl 3): 135-138.



## **8. GLOSARIO DE ABREVIATURAS**



## **8. GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

### **A**

A: Adenosina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico copia

ALT: alanin amino transferasa

AST: aspartato amino transferasa

Anti-VHE IgG: Anticuerpos frente al VHE de tipo IgG

Anti-VHE IgM: Anticuerpos frente al VHE de tipo IgM

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNasas: Ribonucleasas

ARN-VHE: Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis E.

### **C**

C: Citosina

Cm: centímetros

### **D**

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: Ditiotreitól

### **E**

EDTA: Ácido Etilen Diamin tetra-acético

### **G**

G: Guanina

GGT: gamma glutamil transferasa

### **H**

HE: Hepatitis E

### **M**

mV: mili Voltios

### **O**

ORF: Open Reading Frame (Fragmento de lectura abierta)

OR: Odds Ratio

**P**

Pb: Pares de bases

PBS : Phosphate Buffered Saline

PM: Peso molecular

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

P/V: Peso/Volumen

**R**

RT-PCR: Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa

RT-nested-PCR: Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada.

**T**

T: Timina

TAE: Tampón Tris base, ácido acético glacial y EDTA

T<sub>m</sub>: temperatura melting. Temperatura a la cual el 50% de los cebadores se encuentran unidos a la hebra diana de ADN.

T<sub>a</sub>: temperatura de hibridación.

**V**

VHA: Virus de la Hepatitis A

VHE: Virus de la Hepatitis E



**9. SUMMARY**

**EPIDEMIOLOGIC STUDY AND GENETIC**

**CHARACTERIZATION OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) IN**

**SWINE FARMS**



## INDEX

<b>1. INTRODUCTION</b>	165
<b>2. OBJECTIVES</b>	174
<b>3. MATERIALS AND METHODS</b>	174
3.1. Sampled population and sample size	174
3.2. Statistic analysis	176
3.3. Sampling procedure	177
3.4. Sample processing	177
3.5. RNA extraction and RT procedure	177
3.6. Primers and nested PCR	178
3.7. Sequencing and phylogenetic analysis	179
<b>4. RESULTS</b>	185
4.1. HEV PREVALENCE IN PIGS	185
4.1.1. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in pig faeces	185
4.1.2. Risk (OR) for shedding HEV in faeces associated with each production stage	186
4.1.3. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in pig sera	187
4.1.4. Risk (OR) for the presence of HEV in serum associated to each production stage	188
4.1.5. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in HEV carriers	189
4.1.6. Risk (OR) for being HEV carrier associated with each production stage	191
4.2. HEV PREVALENCE IN FARMS	192
4.3. GENETIC CHARACTERIZATION OF SWINE HEV STRAINS	196

<b>5. DISCUSSION</b>	210
5.1. HEV PREVALENCE IN PIGS	210
5.1.1. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in pig faeces	210
5.1.2. Risk (OR) for shedding HEV in faeces associated with each production stage	212
5.1.3. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in pig sera	213
5.1.4. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in HEV carriers	214
5.2. HEV PREVALENCE IN FARMS	214
5.3. GENETIC CHARACTERIZATION OF SWINE HEV STRAINS	216
<b>6. CONCLUSIONS</b>	219
<b>7. REFERENCES</b>	125

# 1. INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped virus with an icosahedral morphology and size between 27 and 34 nm diameter. The buoyant density of HEV is 1.29 g/cm<sup>3</sup> and the sedimentation coefficient is 183S. HEV is approximately 7.2 kb long and it is composed of a single-stranded positive sense RNA molecule showing three open reading frames (ORFs) (Tam *et al.* 1991). The ORF1 is the longest reading frame with 5 kb (5079 bp) at the 5'-end of the genome. The ORF1 encodes for a polyprotein including a papain-like protein, a helicase, an RNA-dependent RNA-polymerase and two domains of uncertain function (X and Y). ORF2 is 2 kb long (nt 5147 to 7127), encodes the major capsid protein and it is located at the 3' end of the genome. Three glycosylation regions have been identified in this region although the glycosylated protein function is unknown. ORF3 overlaps partially with ORF1 and ORF2 and is 369 bp long (nt 5106-5475) and encodes an immunogenic protein with an unidentified role (Zafrullah *et al.* 1997). All ORFs are expressed during viral infection since antibodies against these regions have been detected in naturally infected humans and in experimentally infected monkeys (Khudyakov *et al.* 1994). Additionally, there are two Untranslated Regions (UTRs) in 3' and 5' terminal portions of the genome of 68 and 26 nucleotides, respectively.

As HEV is similar to Norwalk virus in morphology and biophysical properties, it was classified originally in a separate genus of the *Caliciviridae* family (Green *et al.* 2000). However, the genomes from both viruses were different. After performing the phylogenetic analysis of the helicase, RNA-polymerase RNA-dependent and other positive stranded RNA virus, it was recorded that HEV

was situated in a different phylogenetic group more related to rubeola virus (*Fam. Togaviridae*) than to *Fam. Caliciviridae*. (Berke *et al.* 2000). More recently, it was classified into a different family named “*Virus-HEV-like*”. Nowadays, as the International Committee of Taxonomic Virology recommended, it is classified into the *Fam. Hepeviridae*, genus *Hepevirus* as the sole member (Mayo *et al.* 2005).

Although a single serotype has been identified, a great genetic diversity between the different HEV isolates has been widely reported (Schlauder *et al.* 2001). Recent studies have proposed several classifications of HEV in different genotypes and subtypes (Schlauder *et al.* 1999). The most accepted classification is the one that divides HEV in four genotypes. Genotype 1 comprises the Burma strain (prototype) and strains from Asia and Africa. Genotype 2 comprises a Mexican strain (prototype) and several strains isolated in Nigeria and Chad. Genotype 3 comprises strains from United States (Meng *et al.* 1997), Canada (Yoo *et al.* 2001), Argentina (Schlauder *et al.* 2000), Spain (Pérez-Gracia *et al.* 2004), France (Mansuy *et al.* 2004), UK (Banks *et al.* 2004a), Austria (Worm *et al.* 2000), the Netherlands (van der Poel *et al.* 2001), New Zealand (Garkavenko *et al.* 2001) and others. Genotype 4 includes strains identified in China, Taiwan, Japan, India and Vietnam. Genotypes 1 and 2 have been responsible for epidemics in Asia and Africa and in Mexico, Nigeria and Namibia, respectively. However, genotype 3 and 4 are responsible for the acute autochthonous cases reported in USA, Argentina, Europe, Japan and China. These four genotypes have been divided into different subtypes after the phylogenetical analysis of many HEV isolates (Lu *et al.* 2005). Thus, genotype 1 has been divided in 5 subtypes, genotype 2 in two subtypes, whereas

genotypes 3 and 4 show a greater diversity and have been divided in 10 and 7 subtypes respectively. Genotypes 1 and 2 have been isolated in all epidemic outbreaks, while genotypes 3 and 4 have been isolated not only in humans but in animals too. These data suggest that genotypes 3 and 4 have a zoonotic nature (Emerson *et al.* 2003).

The divergence among genotypes may be due to different ways of transmission: genotypes 1 and 2 may produce sporadic outbreaks but also may produce epidemic outbreaks as a result of an efficient faeco-oral transmission by means of contaminated water or food. These similar patterns of transmission might have produced similar degrees of genetic divergence. However, genotypes 3 and 4 are mainly circulating in different animal species and only occasionally infect humans. This can be due to an inefficient inter-species transmission of these subtypes. A possible explanation for this could be due to the fact that HEV has been circulating for a long time in different regions with a variable degree of evolution depending on the species infected (Emerson *et al.* 2003).

HE has been traditionally thought, as Hepatitis A (HA), to be enterically transmitted. This epidemiological pattern has been recorded in developing countries where sporadic and epidemic outbreaks linked to contaminated drinking water have been reported. However, the epidemiology of HE in industrialized countries may be changing. When it was first reported in developed countries, it was linked to travel to endemic areas, but now, it is becoming an infection linked to an animal reservoir. Moreover, the seroprevalence in these countries is greater than previously thought, especially when compared to the number of autochthonous cases reported.

HEV infection is endemic in the Centre and Southeast of Asia. Several outbreaks have been reported in Middle East, North and West of Africa and Centre of American continent (Mexico). In the rest of the world, HEV infection is considered infrequent and it is restricted to people who have travelled to zones where HEV is endemic. HEV epidemics may be long lasting, and can affect from hundreds to thousands of people. Epidemics may vary from acute outbreaks to long lasting epidemics (1 year or even more). During these outbreaks, the percentage of the affected population may vary between 1 % and 15 %. The illness is more frequent in young adults (3 %- 30 %) than in children (0.25 % up to 10 %). These numbers suggest that anicteric and/or subclinical infections may be more frequent in children. Men are more commonly infected than women, but pregnant women show the highest mortality (up to 25%). Person-to-person transmission is rare, and is more frequent for members of the same family to be infected by a common source of water (Aggarwal *et al.* 1994).

In non-epidemic countries sporadic HE is observed where it constitutes 1% of acute hepatitis cases and historically has been mainly related to travels to endemic zones (Piper-Jenks *et al.* 2000), although an increasing number of autochthonous hepatitis has been recently reported (Ijaz *et al.* 2005).

Laboratory diagnostic tests to detect HEV infection comprise molecular techniques and electronic immunomicroscopy in faeces and serum as well as serological assays to detect anti HEV IgM and IgG. HEV RNA is detected in faeces by RT PCR one week before the onset of the clinical signs and persists usually for two weeks although sometimes it has been detected up to 52 days after the beginning of the clinical signs. There are some real-time PCR assays to



quantify HEV RNA in faecal and serum samples (Inoue *et al.* 2006, Jothikumar *et al.* 2006). These techniques have the advantage to reduce the diagnostic time (3 hours) and show a high sensitivity (10 molecules DNAc/PCR). Electronic immunomicroscopy in faeces is too arduous to perform and it lacks sensitivity. Therefore, it is not used for routine diagnosis. HEV antigen has been detected in hepatic tissue from experimentally infected primates. Serologic diagnosis of HEV infection is usually carried out by means of enzyme-immuno-assays (ELISA). Synthetic peptides or recombinant proteins are used as antigens in these assays and correspond to immunodominant epitopes from ORF2 and/or ORF3 belonging to Mexico and/or Burma strains.

Anti HEV IgM antibodies can be detected during the acute phase of the illness and can last approximately 4 or 5 months. IgG antibodies appear just after the rise of IgM and they increase from the acute phase until convalescent phase. IgG have been detected up to 4.5 years after the acute phase. Therefore, IgM increased levels are indicative of acute infection, whereas IgG levels are related to a previous contact with HEV (Clayson *et al.* 1995). In industrialized countries, HEV seroprevalence rates between 1 and 17% in the healthy population have been reported (Meng *et al.* 2002). The high prevalence found in these countries does not correlate to the low incidence of HE acute cases in these areas. Therefore, whether seroreactivity in developed areas is a reflection of subclinical infections, undetected disease, cross reactions to other agents, false positives or a combination of all of them, remains uncertain. Another possibility is that the high seroprevalence found in the healthy population is related to a subclinical infection by swine HEV.

The different epidemiology pattern found in industrialized countries (genotypes 3 and 4) when compared to the pattern found in developing countries with poor sanitary controls (genotypes 1 and 2), needs further studies to evaluate the role of swine HEV in the epidemiology in developed areas.

Recent studies suggest that HE is a zoonosis (Meng *et al.* 1998b). Antibodies to HEV have been found in human population in non-endemic countries (Thomas *et al.* 1997). This data raised the suspicion of animal reservoirs for HEV. In this sense, it has been reported by means of experimental infections that HEV is capable of crossing the species-barrier. Thus, primates have been infected by swine HEV (Meng *et al.* 1998b), and pigs, lambs (Usmanov *et al.* 1994) and rats (Maneerat *et al.* 1996) with human HEV. Experimental inoculated pigs with a human isolate from USA were rapidly viremic and seroconverted. This data suggest that this strain was well adapted in pigs and maybe has a swine origin. HEV is considered enzootic in a wide range of animals, including wild and domestic species, although, with the exception of swine, Sika deer and mongoose, no HEV RNA that is closely related to swine/human HEV has been detected in these species.

Regarding serological data in animals, there are a number of studies reporting detection of antibodies against HEV in pigs from developing countries such as Nepal (Clayson *et al.* 1995) and Thailand (Cooper *et al.* 2005). Antibodies against HEV have been found in swine from industrialized countries including the USA (Meng *et al.* 1997), Canada (Yoo *et al.* 2001), Korea (Choi *et al.* 2003), Taiwan (Wu *et al.* 2002), Australia and New Zealand (Garkavenko *et al.* 2001), Spain (Clemente-Casares *et al.* 2003) and the UK (Banks *et al.* 2004b). Detection of antibodies in other species as poultry (Sun *et al.* 2004), dogs

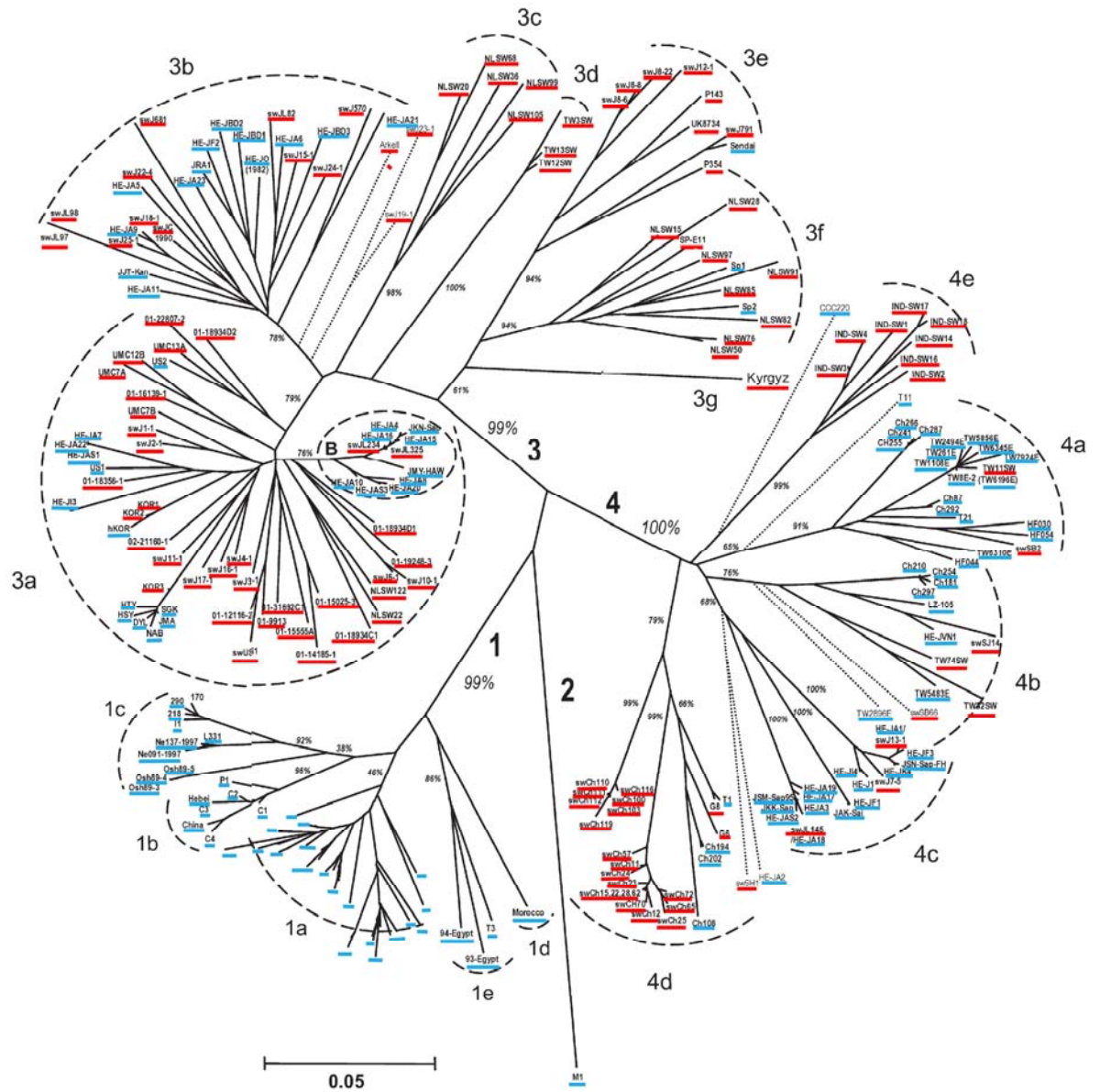
(Arankalle *et al.* 2001; Vitral *et al.* 2005), deers (Sonoda *et al.* 2004), cats (Kuno *et al.* 2003), cattle (Arankalle *et al.* 2001; Vitral *et al.* 2005), rodents (Favorov *et al.* 2000; Kabrane-Lazizi *et al.* 1999; Vitral *et al.* 2005) and mongooses (Nakamura *et al.* 2006) have been reported as well. All these serological information suggest that certain animal species are exposed to HEV (or related agent) though the epidemiology of infection remains obscure.

HEV genome has been detected in poultry (Haqshenas *et al.* 2001), horses (Saad *et al.* 2006), pigs (Meng *et al.* 1997), deers, wild boars (Takahashi *et al.* 2004) and rats (Karenyi *et al.* 1993). One of the explanations to the great genomic variability observed for HEV is a possible animal origin. The genomic sequencing and phylogenetic analysis of a high number of HEV strains have shown a close relationship between swine and human isolates belonging to the same geographic area (fig. 1) in industrialized countries as Japan (Takahashi *et al.* 2003a), Korea (Ahn *et al.* 2005), United Kingdom (Ijaz *et al.* 2005), Taiwan (Hsieh *et al.* 1999) and USA (Meng *et al.* 1997). Hepatitis E infection related to poorly cooked or raw swine liver consumption has been reported (Yakazi *et al.* 2003). There have been cases of hepatitis E infection by deer and wild boar meat ingestion as well ( Tei *et al.* 2003; Takahashi *et al.* 2004).

Occasionally, HEV from animals may be able to infect and cause disease in humans after contact with infected animals. This would be the cause for the sporadic forms, since these isolates would not be as well adapted to humans as the genotype 1 and 2 epidemic strains. If this hypothesis is correct, HEV strains circulating in those geographic areas in animal species would be responsible for autochthonous cases of HE.

Because of its ability to cross the species-barrier, HEV constitutes a Public Health problem in developed regions, especially for people working with pigs, who are at a higher risk to be infected (Withers *et al.* 2002).

Figure 1- Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 275 partial sequences (301 pb long) belonging to 5' end of ORF2 (positions 5994 to 6294 of the complete genome of Burma strain with Genbank accession n° M73218). In blue, human sequences; in red, swine sequences (modified from Lu *et al.* 2005).



## **2. OBJECTIVES**

The objectives of the present study were the following:

1. To investigate the prevalence of HEV RNA in both faeces and serum samples from a swine population comprising all the production stages.
2. To calculate the risk for a pig to be infected by HEV in each production stage studied.
3. To estimate the prevalence of HEV RNA in swine farms of Valencian Community.
4. To investigate the presence of HEV RNA in manure ditches of the farms included in this study.
5. To identify new strains of swine HEV in Spain and analyze the genetic relatedness between the swine strains identified in this study, and other human and swine sequences belonging to all known HEV genotypes.

## **3. MATERIALS AND METHODS**

### **3.1. Sampled population and sample size**

The present study was carried out in eastern Spain (Valencian Community). Sample size was established taking into account the national census of the Ministry of Agriculture of Spain in 2002, which was 1,129,053 pigs for Valencian Community (Statistics Agency of the Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Those pigs were distributed on the basis of the production stage as shown in table 1.

**Table 1. Swine population distribution in the Valencian Community in December 2002 on the basis of the production stage.**

<b>PRODUCTION STAGE</b>	<b>Nº PIGS</b>	<b>% OF CENSUS</b>
PIGLETS AND WEANERS	580,334	51.4%
GROWERS	422,266	37.40%
SOWS	112,905	10%
BOARS	13,548	1.2%
<b>TOTAL</b>	<b>1,129,053</b>	<b>100%</b>

Sample size was calculated in 185 pigs using the software pack Win Episcopo® 2.0. An expected prevalence of 13.7% was taken from the study conducted by Clemente-Casares *et al.* in 2003, with a confidence level of 95% and an accepted error of 5%. Finally, a total number of 191 pigs from 21 farms were included in this study.

The pigs included in the present work were distributed in different groups depending on their stage of production as shown in table 2. The stages of production were defined as follows:

- Piglets: this stage comprises pigs between birth and weaning. Usually piglets stay with their mother until 3-4 weeks of age.
- Weaners: this stage includes pigs already weaned and moved to other facilities where usually different litters are grouped in the same lot. Weaners' stage ranges over from 3-4 to 8 or 12 weeks of age (depending on the type of production).
- Growers: this stage encompasses pigs from 8 or 12 weeks old until they reach the appropriate weight to be sent to the slaughterhouse (usually at 6 months of age). Considering that this period is very long, it has been divided into three stages to facilitate study: first, second and third month of feeding.

- Sows: in this stage, adult female pigs which were suckling when sampled were included. All were older than 6 months of age.
- Boars: this stage comprised adult males older than 6 months of age; these boars were used as studs.

**Table 2. Distribution by production stage of the sampled animals.**

<b>PRODUCTION STAGE</b>	<b>N° PIGS</b>	<b>PERCENTAGE</b>
PIGLETS	34	17.80%
WEANERS	49	25.65%
GROWERS	66	34.56%
SOWS	38	19.90%
BOARS	4	2.1%
<b>TOTAL</b>	<b>191</b>	<b>100%</b>

The tested farms comprised the following types of production: 5 farrow-to-weaning farms (farms that keep breeder sows, piglets, and weaners, with piglets moved to nurseries from weaning at 3 weeks old up to 8 or 12 weeks old), 11 grower-to-finish farms (in these farms, 12-week-old weaners are bought and fed until they reach 5 months), and finally 5 farrow-to-finish farms (pigs of all production stages are kept on the same farm).

### **3.2. Statistic analysis**

To determine the correlation between the presence of HEV in faeces and/or serum and the different production stages, odds ratios (OR) and their corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated using binary logistic regression analysis. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. The Hosmer- Lemeshow goodness-of-fit test was used to determine the fit for the final model. All the calculations were carried out using the software package SPSS® 12.0.



### **3.3. Sampling procedure**

Faecal and serum samples were collected from the same animal at the same time among the different production stages mentioned in table 2. Additionally, samples of manure ditch from the same farms were taken. All the samples were maintained refrigerated from the collection time until their arrival to the laboratory.

### **3.4. Sample processing**

Faecal samples were obtained directly from the rectum and conserved in sterile containers. They were diluted at 10% (w/v) in sterile phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 and centrifuged to collect the supernatant for RNA extraction. The remaining supernatant was stored at -80°C.

Serum samples were obtained by venepuncture of jugular vein in tubes without anticoagulant. After spinning, the serum was used for RNA extraction and the remaining sample was stored at -80°C.

Samples of manure ditches were centrifuged directly without dilution and the supernatant was used for RNA extraction. The supernatant was either used immediately to extract RNA or stored at -80°C until used.

### **3.5. RNA extraction and RT procedure**

RNA was extracted from 140 µl of fecal, serum or manure sample by using the QlampViral RNA Kit (Qiagen, USA), according to the manufacturer's instructions.

Template cDNA was prepared by incubating the extracted RNA at 42°C for 60 minutes in a reaction volume of 20µl with a concentration of 1 µM of primer 3157N (Operon, USA), 200U of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, USA), 0.5 mM of dNTPs, 40 U of RNaseOUT (Invitrogen, USA) and 10 mM of

DTT in a 5X First-Strand buffer (Invitrogen, USA) containing 15 mM of magnesium chloride, 375 mM potassium chloride and 250 mM of Tris-HCl, pH 8.3.

### 3.6. Primers and nested PCR

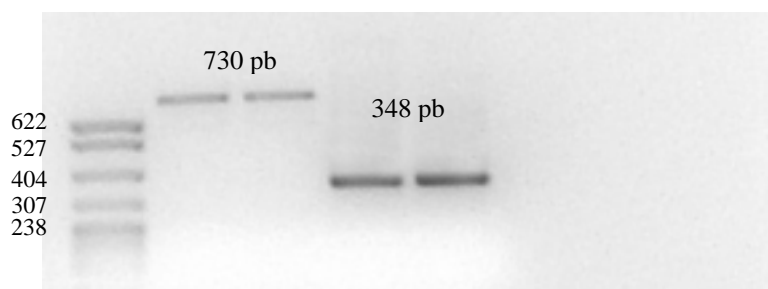
To perform the RT-nested PCR, degenerate primers described by Huang *et al.* in 2002 and displayed in table 3 were used. These primers amplify a fragment of the putative capsid protein gene (ORF2) which corresponds from position 5996 to 6343 in the complete genome of swine HEV prototype strain (Genbank accession n. AY575859).

**Table 3. Sequence of the outer and inner primers used for the nested-PCR.**

	PRIMERS (position <sup>a</sup> )	SEQUENCE
OUTER	3156N (5728-5749)	5'-AATTATGCYCAGTAYCGRGTTG -3'
	3157N (6436-6458)	5'-GAGAATGCKCAGCARGAYAAGGG -3'
INNER	3158N (6013-6034)	5'-GTWATGCTYTGCATWCATGGCT -3'
	3159N (6339-6360)	5'-GACAGAATTGATTTTCGTCGGCT -3'
<sup>a</sup> Primers position corresponds to USA swine prototype strain with Genbank accession number AY575859		

The first round of PCR yielded a product of 730 bp and the product of the second round was 348 bp (fig. 2). The conditions for both reactions were the following: a hot start at 95°C for 9 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 55°C for 30 seconds, and extension 72°C for 1 minute. Finally, a step of polymerization at 72°C for 7 minutes was carried out. All the above steps were performed in different places to avoid the possibility of cross-contamination.

**Figure 2. First and second PCR products. Lane 1, molecular weight marker, lanes 2 and 3, first PCR products, lanes 4 and 5, second PCR products.**



### 3.7. Sequencing and phylogenetic analysis

The amplification products were purified with a commercial kit (UltraClean PCR Clean-up Kit, Mo Bio Labs., USA). Sequence analysis was performed in both senses of the strand to assess the accuracy of the results. The sequencing reaction was carried out using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, CA, USA) and primers 3158N and 3159N.

Sequence analysis was performed using Bioedit Sequence Alignment Editor and sequence alignments were generated by the software MEGA 3.0 (Kumar *et al.* 2004). The swine sequences reported in this work were compared to 131 selected human and swine sequences from the four genotypes available in the Genbank database (table 4). A phylogenetic tree was constructed by the neighbour-joining method with a substitution model of Kimura 2-parameter, based on the partial nucleotide sequence of the ORF2 region (172 nt). Bootstrap values were determined on 1000 resamplings of the data sets. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA 3.0 (Kumar *et al.* 2004). A positive control from a naturally infected pig (GenBank accession number AY323506) was included in each procedure. All assays were performed in different places to avoid the possibility of cross-contamination.

**Table 4.- Sequences used in the present study for the multiple alignment and phylogenetic analysis. Genotype (and subtype for genotype 3 as described by Lu *et al.* in 2005), number of accession in the Genbank database, name of the strain, country of origin, host and bibliographic references are displayed.**

Genotype	Accession nº	Strain	Country	Host	Reference
1	AF065061	Morocco	Morocco	human	Meng <i>et al.</i> 1999
1	AY204877	T3	Chad	human	van Cuyck <i>et al.</i> 2003
1	AF051352	94-Egypt	Egypt	human	Tsarev <i>et al.</i> 1999
1	AF141652	China	China	human	No publicado
1	M80581	P1 Sar-55	Pakistan	macaco	Tsarev <i>et al.</i> 1992
1	X98292	I1	India	human	Donati <i>et al.</i> 1997
1	X99441	I2	India	human	Arankalle <i>et al.</i> 1999
1	AF170450	Viet	Vietnam	human	no publicado
1	M73218	B1	Burma	human	Tam <i>et al.</i> 1991
1	AF076239	I3	India	human	Panda <i>et al.</i> 2000
1	AF058684	BCN6	Spain	human sewage	Pina <i>et al.</i> 1998
2	M74506	M1	Mexico	human	Huang <i>et al.</i> 1992
3a	AF466676	01-9913	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466659	01-21160-1	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466677	01-12116-2	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466685	01-14185-1	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466684	01-15025-3	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466683	01-15555A	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466675	01-16139-1	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466663	01-18356-1	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466662	01-18934C1	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466661	01-18934D1	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466681	01-18934D2	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466660	01-19248-3	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466680	01-22807-2	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466682	01-31692C1	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002

<b>Genotype</b>	<b>Accession n<sup>o</sup></b>	<b>Strain</b>	<b>Country</b>	<b>Host</b>	<b>Reference</b>
3a	AB082560	HE-JA4	Japan	human	Mizuo <i>et al.</i> 2002
3a	AB082563	HE-JA7	Japan	human	Mizuo <i>et al.</i> 2002
3a	AB082564	HE-JA8	Japan	human	Mizuo <i>et al.</i> 2002
3a	AB105891	HE-JA15	Japan	human	Yazaki <i>et al.</i> 2003
3a	AB105892	HE-JA16	Japan	human	Yazaki <i>et al.</i> 2003
3a	AB115541	HE-JA20	Japan	human	Sainokami <i>et al.</i> 2004
3a	AB115543	HE-JA22	Japan	human	Sainokami <i>et al.</i> 2004
3a	AB107366	HE-JAS1	Japan	human	Yamamoto <i>et al.</i> 2004
3a	AB107368	HE-JAS3	Japan	human	Yamamoto <i>et al.</i> 2004
3a	AB080579	HE-JI3	Japan	human	Takahashi <i>et al.</i> 2002
3a	AY641398	hKOR	Korea	human	Ahn <i>et al.</i> 2005
3a	AY714270	hKOR-DYL	Korea	human	Ahn <i>et al.</i> 2005
3a	AY714272	hKOR-HJY	Korea	human	Ahn <i>et al.</i> 2005
3a	AY714268	hKOR-HSY	Korea	human	Ahn <i>et al.</i> 2005
3a	AY714267	hKOR-JMA	Korea	human	Ahn <i>et al.</i> 2005
3a	AY714271	hKOR-NAB	Korea	human	Ahn <i>et al.</i> 2005
3a	AY714269	hKOR-SGK	Korea	human	Ahn <i>et al.</i> 2005
3a	AB113309	HRC-HE5	Japan	human	Matsubayashi <i>et al.</i> 2004
3a	AF516178	KOR1	Korea	swine	Choi <i>et al.</i> 2003
3a	AF516179	KOR2	Korea	swine	Choi <i>et al.</i> 2003
3a	AF527942	KOR3	Korea	swine	Choi <i>et al.</i> 2003
3a	AF336291	NLSW22	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3a	AF336299	NLSW122	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3a	AB094203	swJ1-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3a	AB094207	swJ2-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3a	AB094212	swJ3-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3a	AB094215	swJ4-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3a	AB094238	swJ10-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3a	AB094240	swJ11-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a

Genotype	Accession n <sup>o</sup>	Strain	Country	Host	Reference
3a	AB094217	swJ6-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3a	AB094267	swJ16-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3a	AB094272	swJ17-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3a	AB105903	swJL234	Japan	swine	Yazaki <i>et al.</i> 2003
3a	AB105904	swJL325	Japan	swine	Yazaki <i>et al.</i> 2003
3a	AF466667	UMC7A	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466664	UMC7B	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466665	UMC12B	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3a	AF466678	UMC13A	USA	swine	Huang <i>et al.</i> 2002
3b	AB082561	HE-JA5	Japan	human	Mizuo <i>et al.</i> 2002
3b	AB082562	HE-JA6	Japan	human	Mizuo <i>et al.</i> 2002
3b	AB082565	HE-JA9	Japan	human	Mizuo <i>et al.</i> 2002
3b	AB082567	HE-JA11	Japan	human	Mizuo <i>et al.</i> 2002
3b	AB115542	HE-JA21	Japan	human	Sainokami <i>et al.</i> 2004
3b	AB115544	HE-JA23	Japan	human	Sainokami <i>et al.</i> 2004
3b	AB112743	HE-JBD1	Japan	human	Fukuda <i>et al.</i> 2004
3b	AB154829	HE-JBD2	Japan	human	Fukuda <i>et al.</i> 2004
3b	AB154830	HE-JBD3	Japan	human	Fukuda <i>et al.</i> 2004
3b	AB079763	HE-JF2	Japan	human	Suzuki <i>et al.</i> 2002
3b	AB088418	HE-JO-1982	Japan	human	Aikawa <i>et al.</i> 2002
3b	AB094256	swJ15-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3b	AB094275	swJ18-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3b	AB094279	swJ19-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3b	AB094296	swJ22-4	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3b	AB094305	swJ23-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3b	AB094306	swJ24-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3b	AB096756	swJC1990	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003b
3b	AB105898	swJL82	Japan	swine	Yazaki <i>et al.</i> 2003
3b	AB105899	swJL97	Japan	swine	Yazaki <i>et al.</i> 2003

Genotype	Accession n <sup>o</sup>	Strain	Country	Host	Reference
3b	AB094317	swJ25-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3b	AB073910	swJ681	Japan	swine	Okamoto <i>et al.</i> 2001
3b	AB105900	swJL98	Japan	swine	Yazaki <i>et al.</i> 2003
3c	AF336290	NLSW20	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3c	AF336293	NLSW36	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3c	AY032756	NLSW68	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3c	AF336297	NLSW99	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3c	AF336298	NLSW105	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3d	AF296167	TW3SW	Taiwan	swine	Wu <i>et al.</i> 2002
3d	AF296165	TW12SW	Taiwan	swine	Wu <i>et al.</i> 2002
3d	AF296166	TW13SW	Taiwan	swine	Wu <i>et al.</i> 2002
3e	AF503512	P143/11/02	UK	swine	Banks <i>et al.</i> 2004b
3e	AF503511	P354/1/02	UK	swine	Banks <i>et al.</i> 2004b
3e	AB093535	Sendai	Japan	human	Yajima <i>et al.</i> 2003
3e	AB094227	swJ8-2	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3e	AB094231	swJ8-6	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3e	AB094233	swJ8-8	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3e	AB094250	swJ12-1	Japan	swine	Takahashi <i>et al.</i> 2003a
3e	AB073911	swJ791	Japan	swine	Okamoto <i>et al.</i> 2001
3e	AY362357	UK 8734	UK	human	Banks <i>et al.</i> 2004a
3e	AJ879566	NT1	UK	human	Ijaz <i>et al.</i> 2005
3e	AJ879569	NT3	UK	human	Ijaz <i>et al.</i> 2005
3e	AJ879571	NT5	UK	human	Ijaz <i>et al.</i> 2005
3e	AJ879572	NT6	UK	human	Ijaz <i>et al.</i> 2005
3e	AJ879573	NT7	UK	human	Ijaz <i>et al.</i> 2005
3e	AJ879567	NT11	UK	human	Ijaz <i>et al.</i> 2005
3e	AJ879574	NT8	UK	human	Ijaz <i>et al.</i> 2005
3f	AF332620	NLSW15	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3f	AF336292	NLSW28	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001

Genotype	Accession nº	Strain	Country	Host	Reference
3f	AY032758	NLSW50	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3f	AY032757	NLSW76	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3f	AF336294	NLSW82	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3f	AF336295	NLSW85	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3f	AY032759	NLSW91	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3f	AF336296	NLSW97	Netherlands	swine	van der Poel <i>et al.</i> 2001
3f	AF195061	VH1	Spain	human	Pina <i>et al.</i> 2000
3f	AF195062	VH2	Spain	human	Pina <i>et al.</i> 2000
3f	AF195063	E11	Spain	swine slaughterhouse sewage	Pina <i>et al.</i> 2000
3f	AY323506.2	SpswCV2	Spain	swine	Fernández-Barredo <i>et al.</i> 2006
3f	AJ879568	NT2	UK	human	Ijaz <i>et al.</i> 2005
3f	AJ879570	NT4	UK	human	Ijaz <i>et al.</i> 2005
4	AF117280	TW32SW	Taiwan	swine	Wu <i>et al.</i> 2002
4	AJ272108	T1	China	human	Wang <i>et al.</i> 2000
4	AF151962	Ch-T11	China	human	Wang <i>et al.</i> 2000
4	AF296160	TW261E	Taiwan	human	No publicado
4	AB097811	swJ13-1	Japan	swine	Nishizawa <i>et al.</i> 2003
4	AB097812	HE-JA1	Japan	swine	Nishizawa <i>et al.</i> 2003

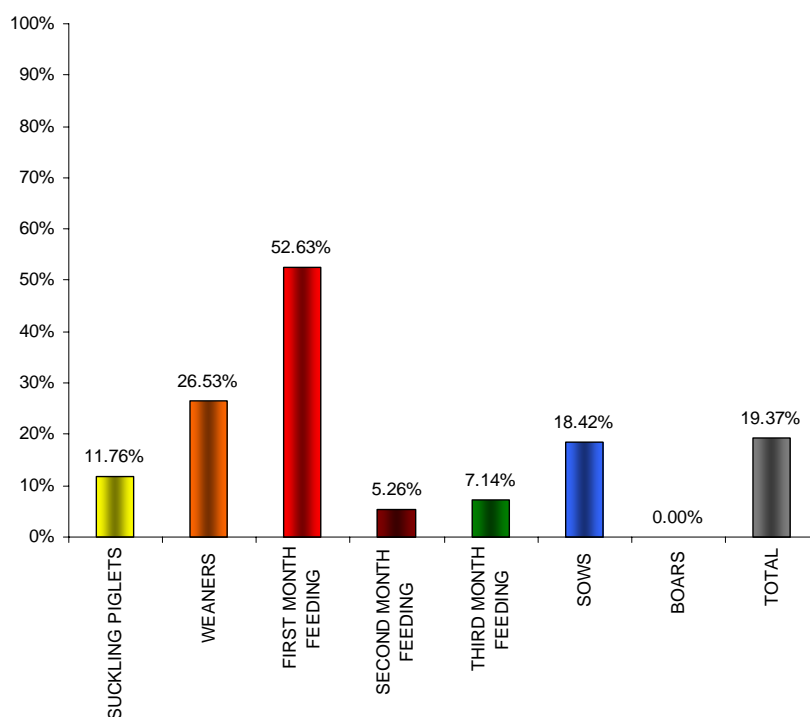


## 4. RESULTS

### 4.1. HEV PREVALENCE IN PIGS

#### 4.1.1. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in pig faeces

HEV RNA was identified in 37 (19.37%) of 191 faeces samples. None of the pigs sampled showed any clinical signs. Prevalence values of the production stage are shown in figure 3. Only 4 (11.76%) 3-week-old piglets out of 34 piglets sampled were positive to the presence of HEV. Prevalence values were higher in weaners with 26.53% (13 out of 49) animals shedding the virus. Maximum values of animals shedding HEV in faeces were observed in the first month of feeding with 52.63% (10 out of 19) positive pigs. During the next stage, the percentage of positive pigs decreased to 5.26% (1 out of 19), and this trend was maintained along the next stage with 7.14% (2 out of 28) animals positive in faeces. Of the adult pigs, none of the 4 boars tested positive for HEV RNA, but there was a prevalence of 18.42% (7 out of 38) in the breeding sows.

**Figure 3. Detection of swine HEV RNA in pig faeces at different production stages.**

#### 4.1.2. Risk (OR) for shedding HEV in faeces associated with each production stage

To determine the correlation between the presence of HEV in faeces and production stages, odds ratios (OR) and their corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated using binary logistic regression analysis. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. Table 5 shows the results of the binary logistic regression analysis. In this model, the first month of feeding (OR 20.00, 95% CI 2.20-181.56,  $p = 0.008$ ) was recorded as a significant risk stage for shedding HEV. It is worth mentioning that, although it was not significant (the p value was calculated slightly above the cut-off with a p value of 0.082, the weaners' stage showed an OR of 6.50 (CI 0.79-53.68). The rest of the stages showed p values far above the cut-off value.

The Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test yielded a good fit for the final model (chi-square 2.87,  $p = 0.897$ ).

**Table 5. Detection of swine HEV RNA in faeces from pigs at different production stages and risk (OR) associated to each production stage.**

PRODUCTION STAGE	HEV IN FAECES	ODDS RATIO (95% CI <sup>a</sup> )	p <sup>b</sup>
	Positive pigs / total (% positive)		
suckling piglets	4 /34 (11.76%)	2.40 (0.25-23,18)	0.449
Weaners	13/49 (26.53%)	6.50 (0.79-53.68)	0.082
<b>First month of feeding</b>	<b>10/19 (52.63%)</b>	<b>20.00 (2.20-181.56)</b>	<b>0.008</b>
Second month of feeding (Constant)	1/19 (5.26%)	1.0	0.000
Third month of feeding	2/28 (7.14%)	1.39 (0.12-16.44)	0.797
Breeding sows	7/38 (18.42%)	4.07 (0.46-35.75)	0.206
Boars	0/4 (0.00%)	0.00	0.999

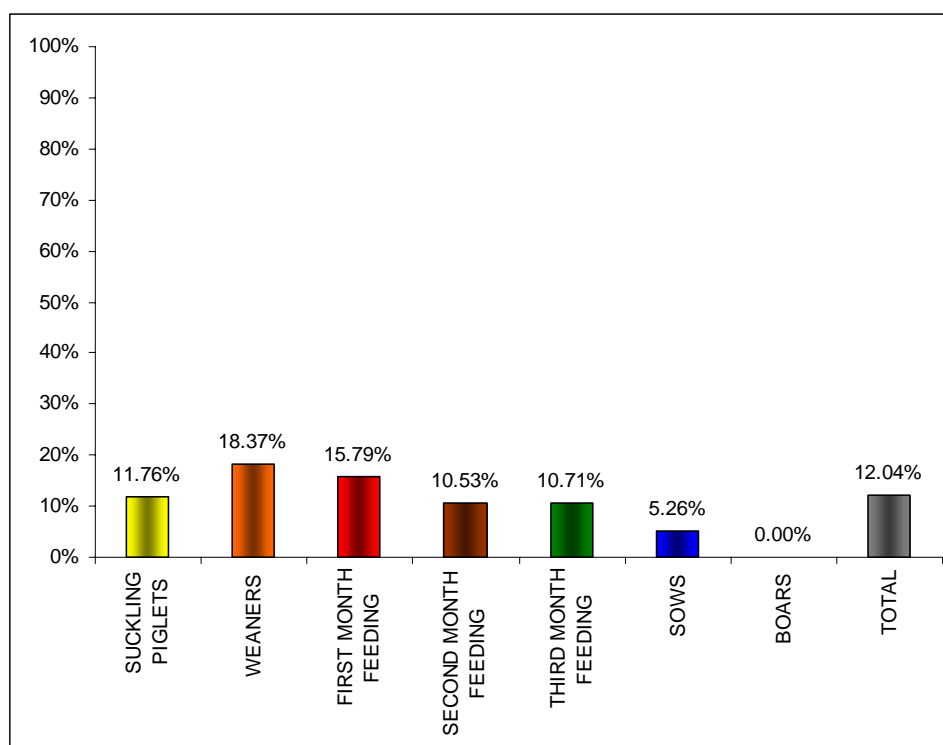
<sup>a</sup>CI = confidence interval; <sup>b</sup> p values less than 0.05 were considered significant.

#### **4.1.3. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in pig sera**

Of the 191 serum samples analyzed, 23 (12.04%) were positive for HEV RNA (fig. 4). A similar pattern to the one observed for positive animals in samples of faeces was observed for viremic pigs: the same increase of prevalence from suckling piglets (11.76%) was recorded, reaching the maximum detection rate of viremic pigs in the weaners' stage with 9 positive pigs (18.37%) out of 49. High values were recorded in the first month of feeding with 15.79% viremic

animals (3 out of 19) as well. Prevalence of HEV in serum decreased among pigs in the second (10.53%) and third (10.71%) month of feeding. In serum samples, sows showed the lowest prevalence with 2 positive out of 38 (5.26%). None of the boars tested positive for the presence of HEV in serum.

**Figure 4. Detection of swine HEV RNA in pig's serum at different production stages.**



#### **4.1.4. Risk (OR) for the presence of HEV in serum associated to each production stage**

To determine the correlation between the presence of HEV in faeces and the production stages, odds ratios (OR) and their corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated following the same procedure described in section b. Table 6 shows the results of the binary logistic regression analysis. In this analysis, none of the stages showed any significant p value. Weaners' stage

was the stage with the closest p value ( $p = 0.086$ ) to the cut-off and an OR of 4.05.

**Table 6. Detection of swine HEV RNA in serum from pigs at different production stages and risk (OR) associated to each production stage.**

PRODUCTION STAGE	HEV IN SERUM Positive pigs / total (% positive)	ODDS RATIO (95% CI <sup>a</sup> )	p <sup>b</sup>
suckling piglets	4 /34 (11.76%)	2.40 (0.41-14.02)	0.331
Weaners	9/49 (18.37%)	4.05 (0.82-20.00)	0.086
First month of feeding	3/19 (15.79%)	3.38 (0.51-22.20)	0.206
Second month of feeding	2/19 (10.50%)	2.12 (0.28-16.34)	0.472
Third month of feeding	3/28 (10.70%)	2.16 (0.34-13.88)	0.417
Breeding sows (Constant)	2/38 (5.26%)	1.0	0.000
Boars	0/4 (0.00%)	0.00	0.999

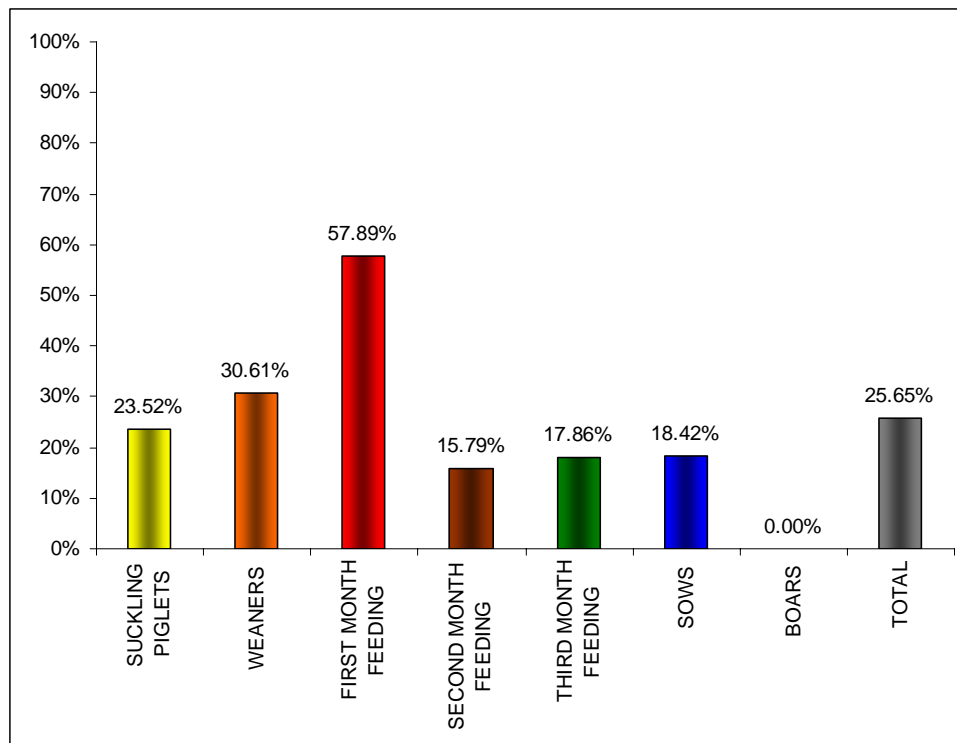
<sup>a</sup>CI = confidence interval; <sup>b</sup> p values less than 0.05 were considered significant.

#### **4.1.5. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in HEV carriers**

HEV carriers were defined as those pigs in which HEV RNA was detected, in faeces and/or in sera. The prevalence of HEV carriers was 49 (25.65%) out of 191 pigs sampled. HEV carriers' distribution attending to the production stage is shown in figure 5. The distribution of HEV carriers along the different production stages was similar to the distribution observed for the presence of HEV in faeces. Thus, the highest prevalence was observed in the first month of feeding

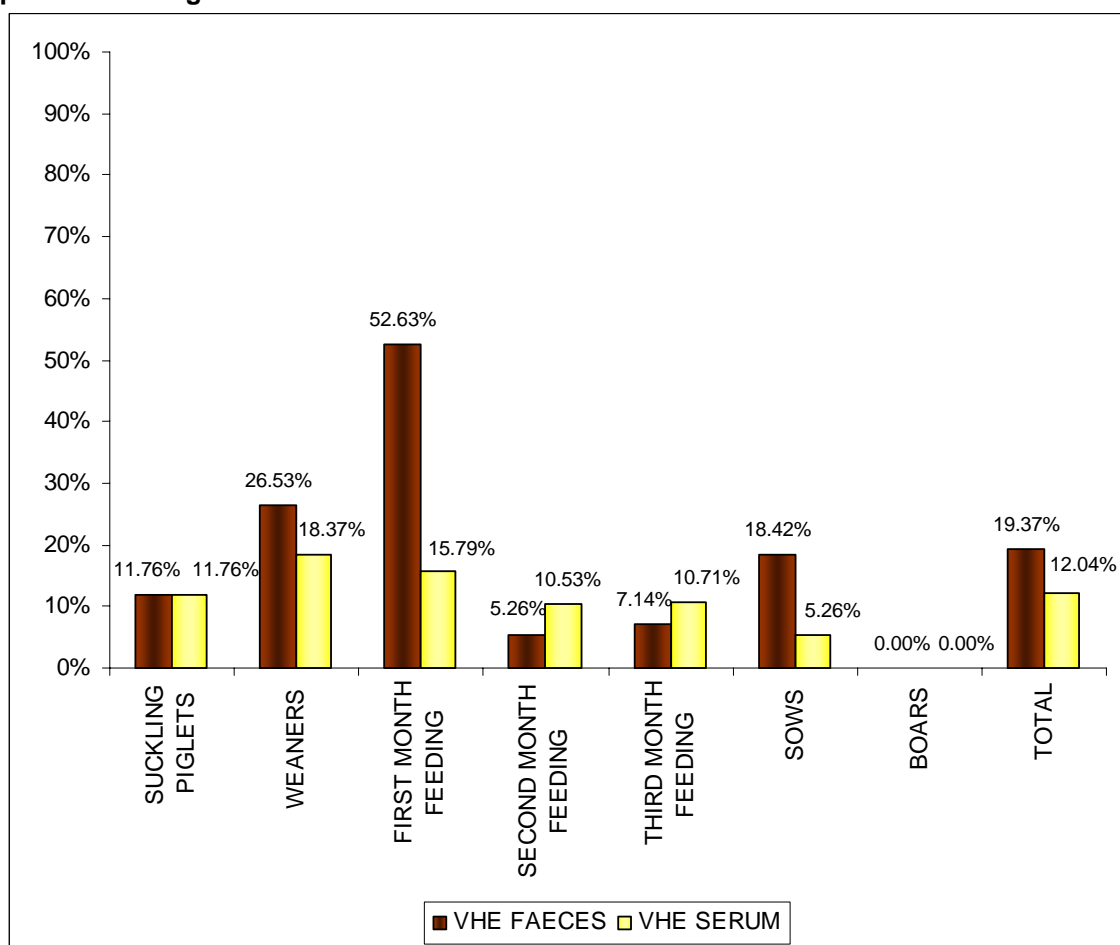
with 57.89% (11 out of 19) followed by the weaners' stage with 30.61% (15 out of 49). The minimum prevalence was recorded in the second month of feeding with a prevalence value of 15.79% (3 out of 19).

**Figure 5. Percentage of HEV carriers at different production stages.**



Comparisons between viremic animals *versus* HEV faecal shedders in the same production stages were done (fig. 6). In weaners, first month of feeding and breeding sows, values of prevalence for HEV faecal shedders were higher than values for viremic animals. On the contrary, more viremic animals than HEV faecal shedders were recorded in the second and third month of feeding stages. In suckling piglets' stage, values of prevalence were the same for viremic animals and HEV shedders.

**Figure 6. Comparison of HEV prevalences recorded in faeces and serum at different production stages.**



#### **4.1.6. Risk (OR) for being HEV carrier associated with each production stage**

To determine the correlation between the presence of HEV carriers and the production stages, odds ratios (OR) and their corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated following the same procedure described in section b. Table 7 shows the results of the binary logistic regression analysis. This analysis showed that pigs in the first month of feeding were 7.33 (1.58-33.97;  $p = 0.011$ ) times at risk of being HEV carriers than pigs in the production stage with the lowest number of HEV carriers (second month of feeding). None of the

remaining production stages showed significant values of OR and their p values were far from the cut-off p value.

**Table 7. Prevalence of HEV carriers at different production stages and risk (OR) associated to each stage.**

PRODUCTION STAGE	HEV CARRIERS	ODDS RATIO (95% CI <sup>a</sup> )	p <sup>b</sup>
	Positive pigs / total (% positive)		
suckling piglets	8 /34 (23.52%)	1.64 (0.38-7,11)	0.508
Weaners	15/49 (30.61%)	2.35 (0.60-9.30)	0.222
First month of feeding	<b>11/19 (57.89%)</b>	<b>7.33 (1.58-33.97)</b>	<b>0.011</b>
Second month of feeding (constant)	3/19 (15.79%)	1.0	0.000
Third month of feeding	5/28 (17.86%)	1.16 (0.24-5.56)	0.853
Breeding sows	7/38 (18.42%)	1.20 (0.27-5.30)	0.806
Boars	0/4 (0.00%)	0.00	0.999

<sup>a</sup>CI = confidence interval; <sup>b</sup> p values less than 0.05 were considered significant.

## 4.2. HEV PREVALENCE IN FARMS

In twelve (57.14%) of the 21 farms tested in this work, at least one HEV positive pig (in faeces and/or serum) was identified (table 8). Additionally, 38.10% (8 out of 21 farms) of the sampled farms showed HEV RNA in their manure ditches. If we define “positive farm” as the farm in which HEV was found in pigs and/or manure ditch, the prevalence of positive farms was of 71.43% (15 out of 21 farms).

Only five (41.67%) of the 12 farms which tested positive for HEV exclusively in faeces or serum from pigs, were positive to the presence of HEV in the manure



ditch. In the same way, six (66.67%) farms which tested negative for HEV exclusively in pig faeces or serum, were negative for the presence of HEV in their manure ditch.

In order to assess if the presence of HEV in the faeces of the pigs was related to the finding of HEV in the manure ditch of the same farm, a chi-square test was performed. The chi-square test yielded no significant association between these two parameters. Moreover, the percentage of positive pigs found in the 13 farms which tested negative for HEV in the manure ditch was of 27.91% (36 out of 129). This value was higher than the percentage of positive pigs (20.96%) found in farms which tested positive for HEV in the manure ditch.

Regarding to the percentage of HEV carriers observed in each type of farm, the following prevalences were recorded: in farrow-to-weaning farms, a 10.53% (6 out of 57) of positive pigs were found, whereas in grower-to-finish farms and farrow-to-finish farms, a 29.31% (17 out of 58) and 34.21% (26 out of 76) of HEV carriers was observed (fig. 7).

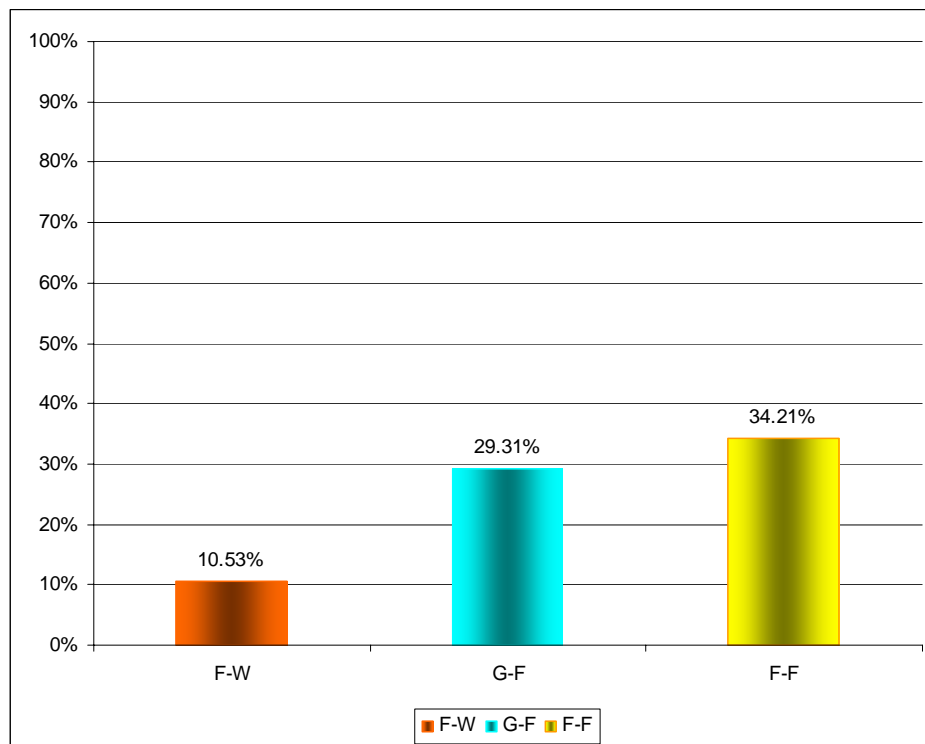
The percentage of farms which tested positive in any of the samples taken (faeces, serum or manure ditch) was of 42.85%, 81.82% and 100% for farrow-to-weaning farms, grower-to-finish farms and farrow-to-finish farms, respectively (fig. 8).

**Table 8. Detection of HEV RNA from swine (faeces and serum) samples and from raw manure in different types of farms.**

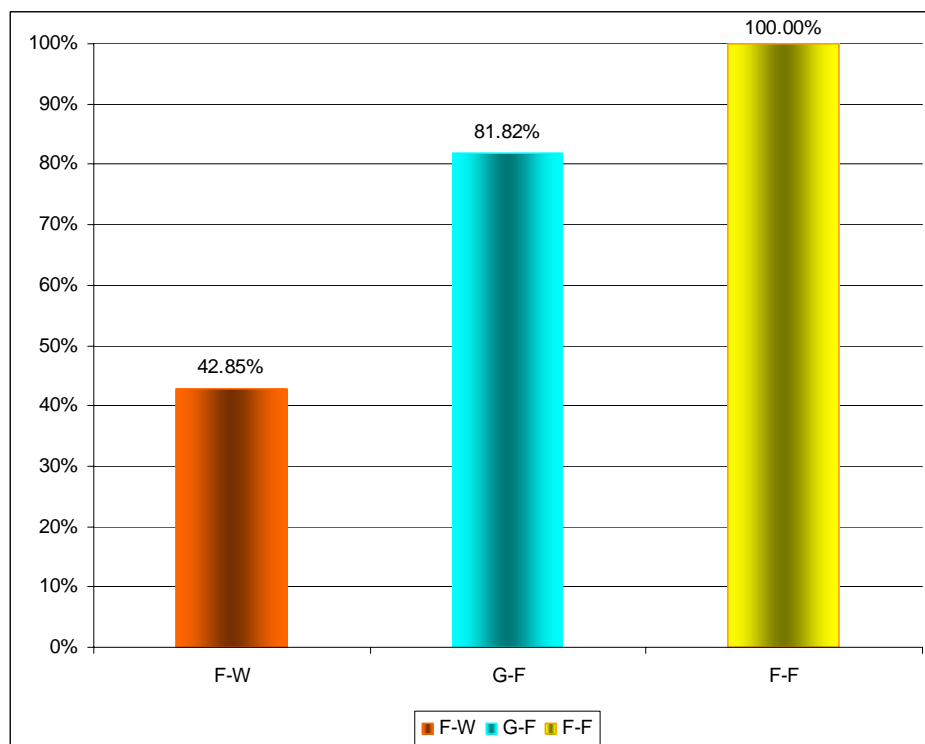
Farm	Type of fam	positive pigs/ sampled pigs (%)	Manure
1	F-W <sup>a</sup>	1/15 (6.66)	NEG
2	F-F <sup>b</sup>	13/20 (65)	NEG
3	F-W	0/8 (0)	NEG
4	F-F	9/34 (26.47)	POS
5	G-F <sup>c</sup>	0/4 (0)	POS
6	G-F	1/4 (25)	POS
7	G-F	2/4 (50)	NEG
8	G-F	1/4 (25)	POS
9	G-F	0/3 (0)	NEG
10	G-F	0/4 (0)	NEG
11	G-F	1/4 (25)	POS
12	G-F	0/4 (0)	POS
13	G-F	0/4 (0)	POS
14	G-F	1/4 (25)	POS
15	F-W	4/10 (40)	NEG
16	F-F	4/22 (18.18)	NEG
17	F-W	0/11 (0)	NEG
18	F-W	1/7 (14.29)	NEG
19	F-W	0/3 (0)	NEG
20	F-W	0/3 (0)	NEG
21	G-F	11/19 (57.90)	NEG
<b>Total</b>		<b>49/191 (25.65%)</b>	<b>8 / 21 (38.10%)</b>

<sup>a</sup>F-W: farrow-to-weaning; <sup>b</sup>F-F: farrow-to-finish; <sup>c</sup>G-F: grower-to-finish;

**Figure 7. Percentage of positive pigs found in each type of farm. F-W: farrow-to-weaning; F-F: farrow-to-finish; G-F: grower-to-finish.**



**Figure 8. Percentage of positive farms attending to the type of production. F-W: farrow-to-weaning; F-F: farrow-to-finish; G-F: grower-to-finish.**



### 4.3. GENETIC CHARACTERIZATION OF SWINE HEV STRAINS

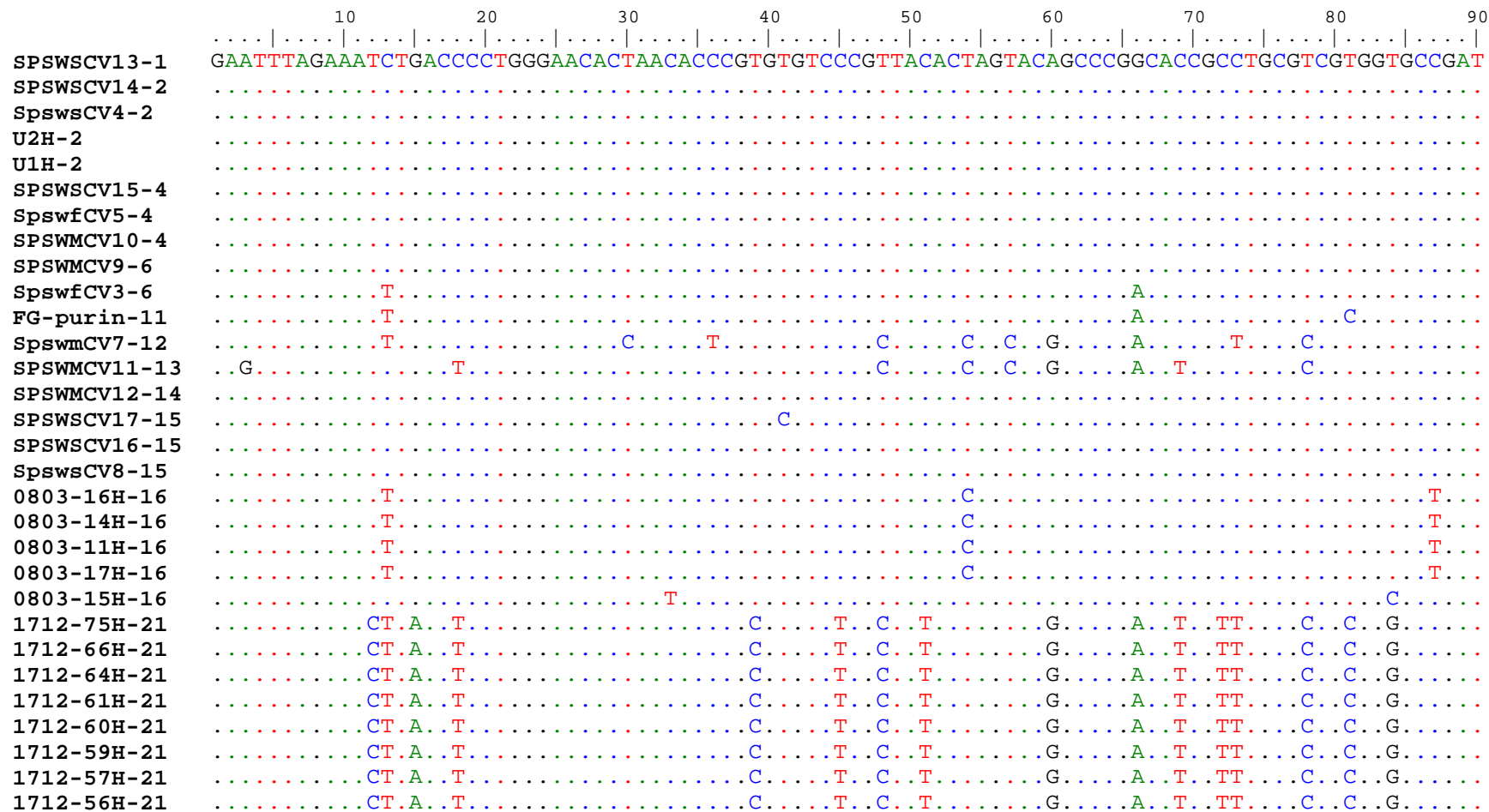
A total number of thirty swine HEV strains from 11 farms (fig. 9) were obtained. Before the definitive alignment was carried out, a preliminary alignment with the genotype 3 sequences used by Lu *et al.* in 2005 was done; but instead of comparing a 301 bp fragment, a shorter fragment (172 bp) was used. The aim of this alignment was to assess that the length of the fragment obtained when our strains were sequenced was long enough to yield reliable results when compared phylogenetically with other strains. The resulting 172 bp long tree was practically identical to the one described by Lu *et al.* (fig. 10).

After this ascertainment, a multiple alignment of the 30 identified swine strains was carried out together with 131 HEV sequences distributed among the four known genotypes as described below:

- 113 human and porcine sequences belonging to genotype 3.
- 11 human sequences belonging to genotype 1
- 1 human sequence belonging to genotype 2
- 6 human and porcine sequences belonging to genotype 4

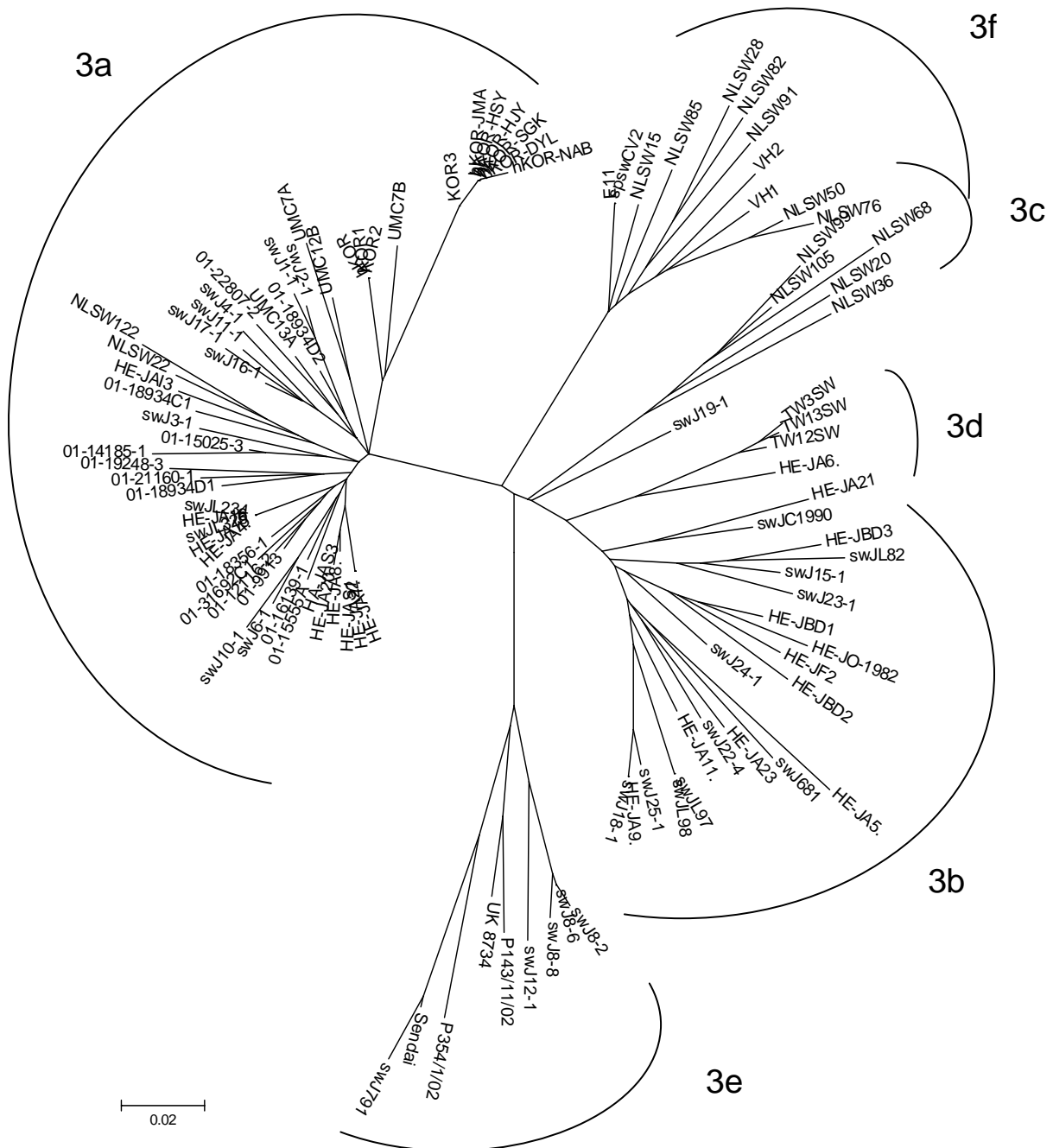
Accession numbers of the abovementioned strains, host and geographic origin are shown in table 4 (chapter "Material and Methods").

Figure 9. One hundred and seventy two bp alignment of the 30 strains sequenced in this work. Dots correspond to conserved nucleotides taking as reference the strain SPSWSCV13-1.



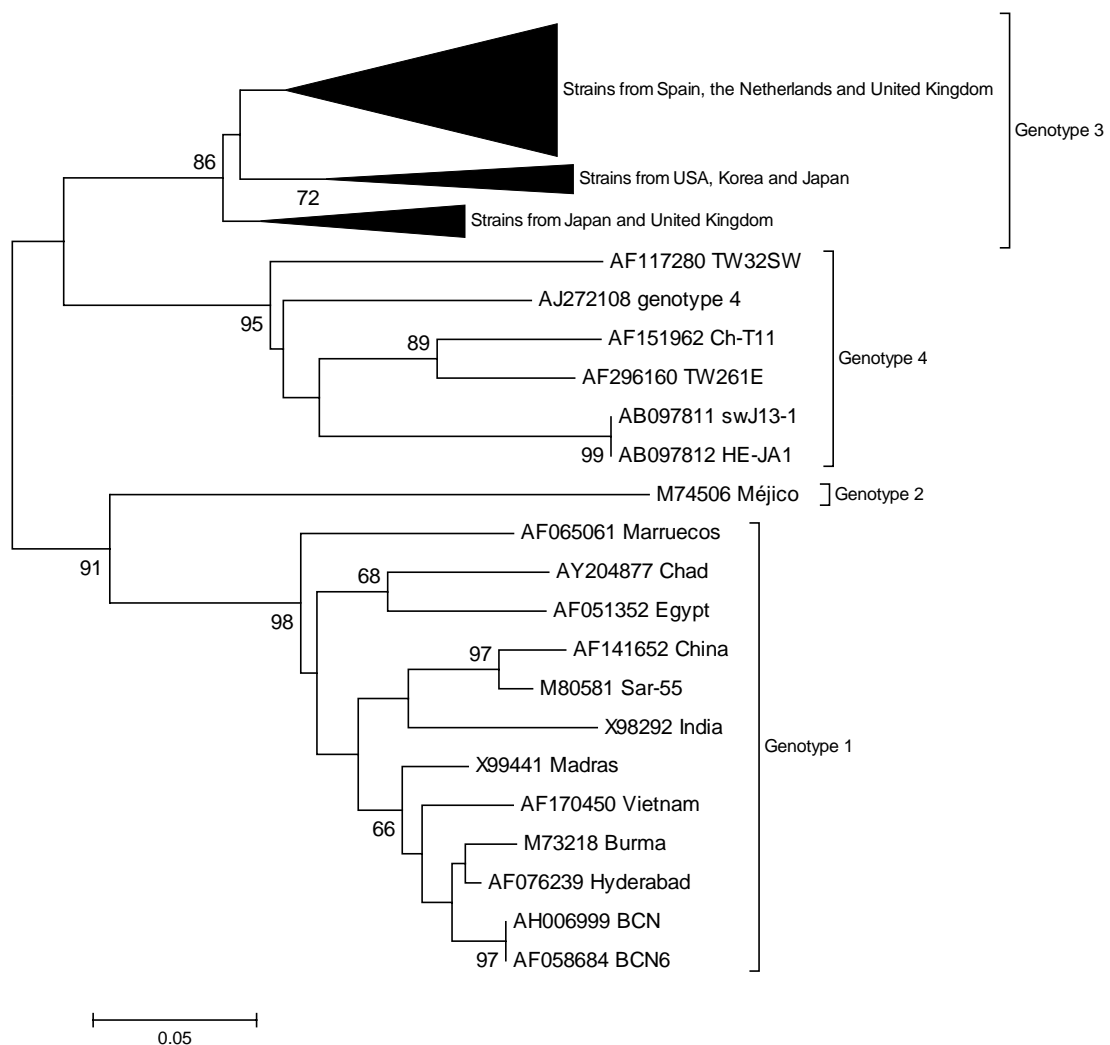
	100	110	120	130	140	150	160	170
SPSWSCV13-1	GGGACAGCTGAGCTTACAACCAC	TGCAGCCACACGTTTTATGAAGGAC	TTGCATTTTCACC	GGGACAAATGGTGTGGTGAGG				
SPSWSCV14-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Spswscv4-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
U2H-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
U1H-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SPSWSCV15-4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Spswfcv5-4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SPSWMCV10-4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SPSWMCV9-6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Spswfcv3-6	.....	.....	T	.....	C	.....	.....	.....
FG-purin-11	.....	T	.....	.....	C	.....	.....	.....
Spswmcv7-12	.....	C	.....	T	.....	C	T	T
SPSWMCV11-13	.....	G	C	.....	T	C	T	.....
SPSWMCV12-14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SPSWSCV17-15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SPSWSCV16-15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Spswscv8-15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
0803-16H-16	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....
0803-14H-16	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....
0803-11H-16	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....
0803-17H-16	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....
0803-15H-16	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....
1712-75H-21	.....	G	.....	A	.....	T	.....	G
1712-66H-21	.....	G	.....	A	.....	T	.....	G
1712-64H-21	.....	G	.....	A	.....	T	.....	G
1712-61H-21	.....	G	.....	A	.....	T	.....	G
1712-60H-21	.....	G	.....	A	.....	T	.....	G
1712-59H-21	.....	G	.....	A	.....	T	.....	G
1712-57H-21	.....	G	.....	A	.....	T	.....	G
1712-56H-21	.....	G	.....	A	.....	T	.....	G

Figure 10. Phylogenetic relationships among swine and human strains belonging to genotype 3 of HEV based in a 172-bp fragment belonging to ORF2. Genetic distances were calculated using the Kimura 2-parameter method and the tree was constructed using the neighbor-joining method with a 1000-resampling bootstrap value. These strains clustered in the same way they did when Lu *et al.* in 2005 aligned them taking a longer fragment (301 bp).



The 30 sequences obtained in these study clustered into genotype 3 (fig. 11), into the subtype 3f (fig. 12) described by Lu *et al.* 2005.

**Figure 11. Phylogenetic tree based in the comparison of a 172 bp fragment from sequences belonging to the 4 known genotypes. The strains belonging to genotype 3 have been compressed in order to let a better viewing of the tree's topology. These genotype 3 strains have been expanded in the tree showed in figure 12.**







The distribution of the sequences obtained in the different farms, as well as percentages of homology *intra* and *inter*-farm is shown in table 9. It can be observed that homology percentages varied in the same farm from 95.8% (farm 6) up to 100% for the rest of the farms. The percentage homology among the different farms varied from 84.8% (farm 21 when compared to farm 12) until 100% between some strains found in farms 1, 2, 4, 6, 14 and 15. Table 10 shows the nucleotide identity matrix. It includes the 30 strains identified in this study and other sequences clustered into the same subtype 3f in the phylogenetic trees from figures 12 and 13.

**Table 9. Percentage of nucleotide homology *intra* and *inter* farm.**

Farm	number of identified strains	nucleotide homology (%) <i>intra</i> -farm	nucleotide homology (%) <i>inter</i> -farm
1	1	-	88.3-100%
2	4	98.6-100%	88.3-100%
3	0	-	-
4	3	99.4-100%	88.3-100%
5	0	-	-
6	2	95.8%	88.3-100%
7	0	-	-
8	0	-	-
9	0	-	-
10	0	-	-
11	1	-	88.3-98.2%
12	1	-	84.8-92.4%
13	1	-	86-92.4%
14	1	-	86.6-100%
15	3	100%	86.6-100%
16	5	95.9-100%	85.4-98.2%
17	0	-	-
18	0	-	-
19	0	-	-
20	0	-	-
21	8	99.3-100%	84.8-86.6%



Figure 13 shows the subtree extracted from figure 12 belonging to genotype 3, subtype 3f. In this subtree, more detailed phylogenetic relationships can be observed between the strains identified in the present study and others belonging to the same subtype.

The strains identified in this work clustered in two main groups. One cluster comprised porcine strains belonging to farms 12, 13 and 21 and 3 human autochthonous isolates, a Spanish one (VH2), and two British strains (NT2 and NT4). The rest of the strains identified in this research work grouped in another cluster. In this group, a strain from sewage of a slaughterhouse in Catalonia and other porcine strains from The Netherlands (NLSW15, NLSW91, NLSW82, NLSW28, NLSW85, NLSW76 y NLSW50), were also located, along with a human autochthonous strain from Catalonia (VH1).

In spite of the observed variability among the identified sequences, all of the nucleotide substitutions were synonymous (fig. 14). The same homology in the amino acid sequences was observed for the rest of the European isolates except for two strains from The Netherlands (NLSW99 and NLSW122), which displayed a methionine instead a glycine in the position 52.

**Figure 13. Subtree belonging to subtype 3 extracted from the phylogenetic tree shown in figure 12. More detailed phylogenetic relationship of the strains isolated in the present study (in blue) can be recorded.**

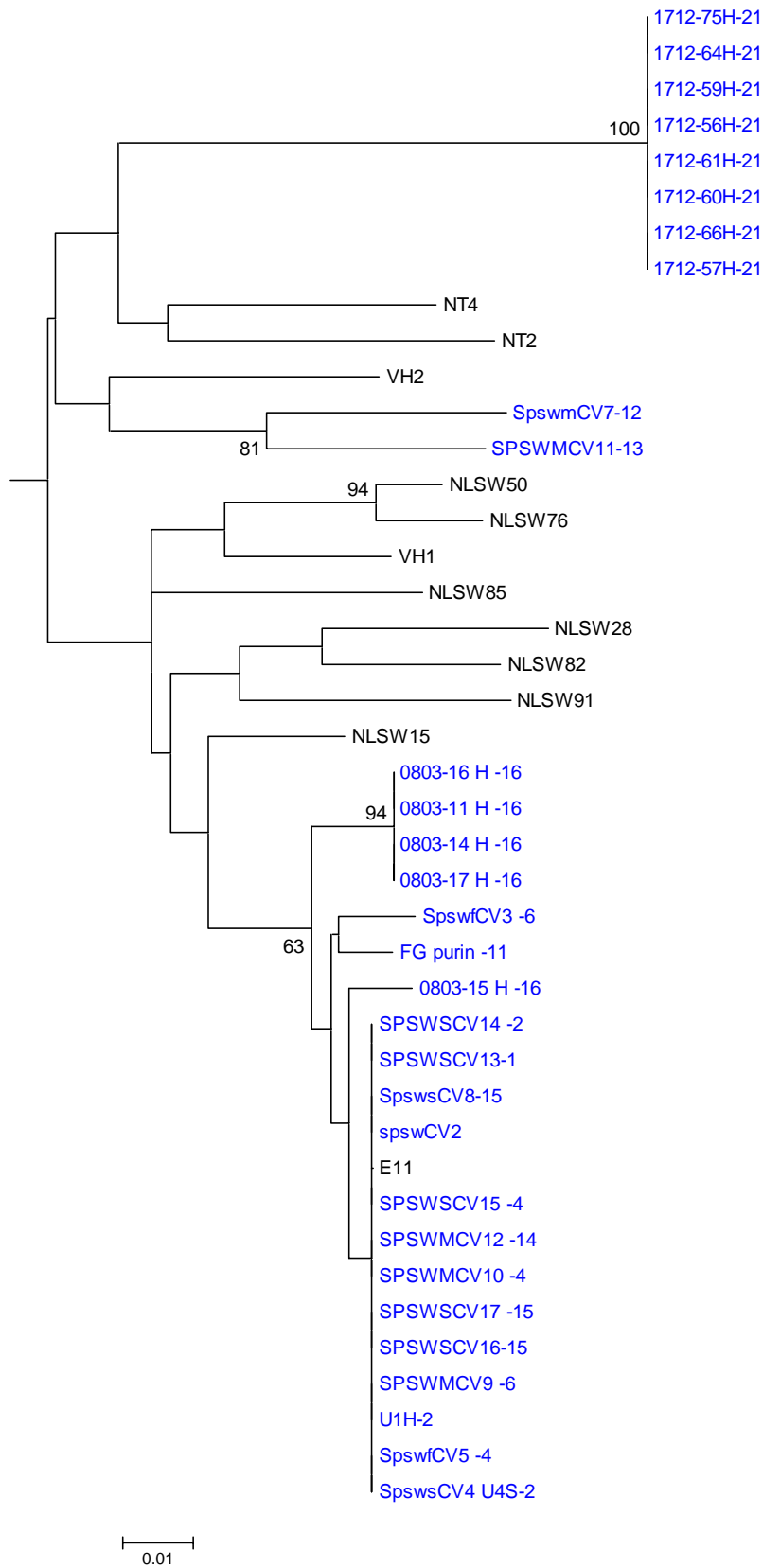
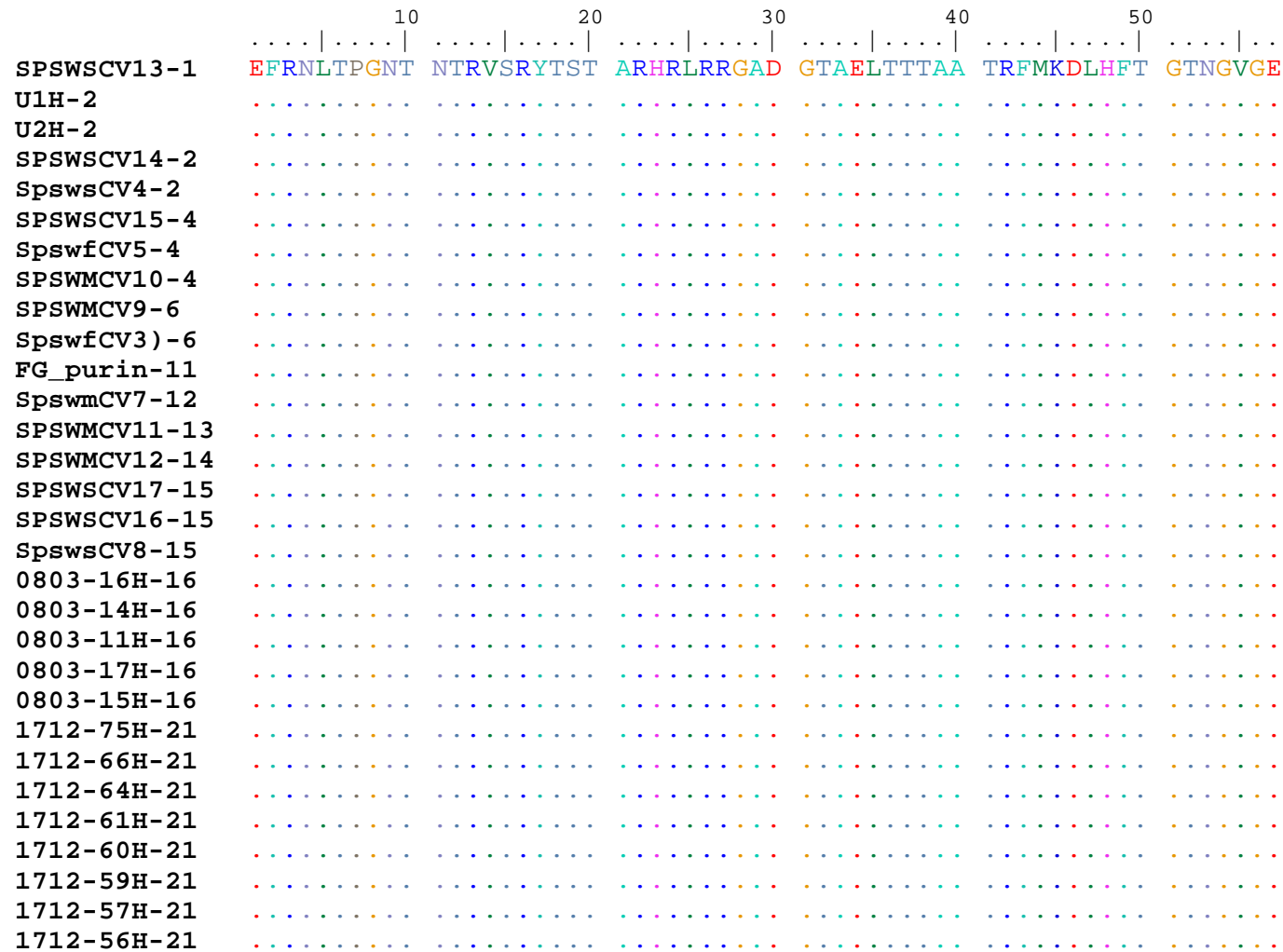


Figure 14. Amino acid alignment of the genotype 3 sequences used in this work for the phylogenetic study. Dots make reference to conserved amino acids taking as reference the strain SPSWSCV13-1.





HE-JA8.						
HE-JA15						
HE-JA16						
HE-JA20						
HE-JA22						
HE-JAS1						
HA-JAS3						
HE-JAI3						
hKOR						
hKOR-DYL					Y.	
hKOR-HJY					Y.	
hKOR-HSY					Y.	
hKOR-JMA					Y.	
hKOR-NAB			W.		Y.	
hKOR-SGK					Y.	
KOR1						
KOR2						
KOR3						
NLSW22						
NLSW122						M.
swJ1-1						
swJ2-1						
swJ3-1						
swJ4-1						
swJ6-1						
swJ10-1						
swJ11-1						
swJ16-1						
swJ17-1						
swJL234						
swJL325						
UMC7A						
UMC7B						
UMC12B						
UMC13A						
---						





## 5. DISCUSSION

### 5.1. HEV PREVALENCE IN PIGS

This is the first epidemiological study in Europe taking each production stage of swine into consideration. Moreover, this is the first report in Europe of serum and faecal samples collected from the same animal in each stage of production, in a population naturally infected with HEV. In the same way, this is the first work in Europe describing HEV detection in manure ditches of swine farms.

#### 5.1.1. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in pig faeces

Values obtained with individual faeces are scarce and vary greatly depending on the study performed. Thus, Banks *et al.* in UK reported 11 pigs positive (26.19%) in faeces out of 42. All animals tested were between 12 and 15 weeks old. Van der Poel *et al.* in the Netherlands studied individual faeces in 9 pigs but no HEV RNA was detected. Values obtained by Garkavenko *et al.* in New Zealand from pigs between 7 and 17 weeks old were of 17 (37,77%) animals shedding HEV in faeces out of 45. All positive pigs were aged between 10 and 12 weeks old. Our study shows an infection rate in faeces of 19.37% which is lower than those mentioned above. A possible explanation could be that in these studies there is a bias in age distribution; the majority of tested pigs in those studies comprised ages from 7 to 17 weeks old, and this has been the age which has yielded the highest prevalence (39.58%) in our study. All these data support that HEV prevalences are very variable depending on the sampled production stage.

It takes between 2 and 3 weeks from initial infection to the time when HEV is excreted in faeces (Meng *et al.* 1998a), and the viral shedding can last up to 7

weeks. Considering the fact that the maximum prevalence recorded in this work was found in the first month of feeding (around 13 to 16 weeks of age), it is reasonable to extrapolate that the majority of animals were infected at any time between 3 and 10 weeks of age. At 3 weeks of age, piglets are usually weaned, thus the most probable source for the earliest infections at this age might be the sows.

After an incubation period of 2 to 3 weeks, the virus would have spread during the weaners' stage and reached the maximum prevalence values in the first month of feeding. A possible explanation for this high prevalence is that HEV transmission would be enhanced when different litters are grouped into a lot at the beginning of the weaners' stage. In the same way, grouping of different lots at the beginning of the growers' stage would help the spread of HEV. The second and third months of feeding (just before slaughter) showed the lowest prevalence values (5.26% and 7.14% respectively). This could be due to the development of an effective immune response to HEV at this stage.

An interesting point is the relatively high prevalence found in breeding sows (18.42%). It is known that during pregnancy, sows may shed some infectious organisms, such as parasites and rotavirus, in higher titre (Benfield *et al.* 1982; Gelberg *et al.* 1991). The way which HEV would reach to some piglets from the sows remains obscure. There is only 1 study (Kasorndorkbua *et al.* 2003) concerning to HEV infection in sows: after the experimental infection of pregnant gilts, these authors found no clinical signs or documented transmission in utero to the offspring, even though HEV infection was successful and gilts shed HEV in faeces. This feature differs from the studies regarding to humans by Kumar *et al.* in 2001 and 2004 who reported values

from 33% to 100% of vertical transmission from mother to baby. HEV antibodies were detected in 10- to 61-day-old pigs born to inoculated sows. A possible explanation to the infection in piglets would be that only those piglets with a sub-optimal immune status would be sensitive to HEV infection. Those animals would act as a source of HEV for other piglets when their maternal immunity began to decrease during the weaners' stage.

The high prevalence of HEV found in breeding sows generates new questions about how the shedding of HEV varies during the pregnancy and suckling stages. Differences in HEV shedding between primiparous and multiparous sows naturally infected should be investigated as well, by means of the design of new studies.

#### **5.1.2. Risk (OR) for shedding HEV in faeces associated with each production stage**

For practical purposes, the data on viral prevalence according to production stages obtained in this study could help to guide targeted sampling in the production stages most at risk, in order to minimize the cost of testing on a farm. In addition, it could also help to prevent the involuntary transmission by infected animals to a HEV free farm.

The estimation of the risk for shedding HEV in faeces has also allowed recognizing in which production stages pigs are more infective to other pigs and to humans.

### **5.1.3. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in pig sera**

In our study the total rate of HEV prevalence in pig serum is the highest described to date (12.04%), when compared with publications that comprise all ranks of age. Arankalle *et al.* (Arankalle *et al.* 2003) in India detected 6 (9.1%) positive sera out of 66 sampled pigs. In Spain, Pina *et al.* in 2000 and Clemente-Casares *et al.* in 2003, did not find any viremic pig in 73 and 48 sampled animals, respectively. Choi *et al.* in Korea in 2003 reported a HEV prevalence of 2.34% in 128 animals.

When comparisons to other studies taking into account each rank of age were done, higher prevalences for our study were recorded as well. Wang *et al.* in 2002 in China found a prevalence of 1.9% of viremic animals in pigs older than 3 months of age. In USA, Huang *et al.* in 2002 reported 2 (12.5%) viremic pigs out of 16 animals aged between 8 and 16 weeks old. In a study performed in Japan in 2003, Takahashi *et al.* found that 15% of 250 12-weeks-old pigs tested were viremic. However, none of the 750 6-months-old pigs tested in the same work were positive.

In general terms, the percentages of HEV in serum were not very different from one production stage to another as it happened to the detection of HEV in faeces. However, a similar pattern in relation to the increase of prevalence was recorded from the piglet's stage until the first month of feeding. This stage was also the one with more number of positive animals, as it was for the detection of HEV in faeces.

The high prevalence of HEV in serum samples from pigs raises concern for the possible alimentary transmission from pigs to humans. Emerson *et al.* in 2005

reported that HEV is 95% inactivated at 60°C. This feature could explain why alimentary transmission cases have been reported (Matsuda *et al.* 2003) only in countries where the consumption of undercooked or raw porcine meat and products is common. In Spain, not only a great amount of cooked porcine products, but conserved without cooking (sausages, ham) products are consumed. Therefore, it would be interesting to develop new lines of research to investigate the resistance of HEV in porcine products prepared without cooking.

#### **5.1.4. Total prevalence and HEV prevalence by production stage in HEV carriers**

There are no publications describing prevalence of HEV simultaneously detected in faeces and serum from all stages of production in a naturally infected population of pigs. Therefore, the high prevalence (25.65%) of HEV RNA in carriers recorded in the present study cannot be compared to data obtained in other countries. The detection rates of HEV were higher in stool samples (19.37%) than in sera (12.04%). A possible explanation for this, could be the fact that viremia by HEV is transient (Kasorndorkbua *et al.* 2002; Meng *et al.* 1998b).

## **5.2. HEV PREVALENCE IN FARMS**

The majority of publications describing the infection by HEV in swine farms have been directed to anti-HEV antibody detection.

The percentage of farms (57.14%) positive for the presence of HEV in at least one pig was slightly higher than the rates obtained by Cooper *et al.* in 2005. These authors found a prevalence of 50% in 10 farms tested and 42.85% in 7

farms tested in Mexico and Thailand, respectively. In the USA, Kasorndorkbua *et al.* in 2005 reported a 25% of prevalence in 28 sampled farms.

Regarding to the detection of HEV in manure ditches from swine farms, there is only one study in the USA carried out by Kasorndorkbua *et al.* (2005). A total number of 28 farms were tested by taking several samples from each manure ditch and pooled faeces of pigs belonging to the same farms. The percentage of positive manure ditches was of 68.18% *versus* the 38.10% obtained in our work. A possible explanation to this difference of rates is that Kasorndorkbua *et al.* performed a previous viral concentration of the sample, thus enhancing the sensitivity of the detection.

The disagreement recorded in our study between the detection of positive pigs in a farm and negative manure ditches in the same farm, could be because only one 100 mL sample from each ditch was taken. In addition, no viral concentration was performed previously to nucleic acid extraction.

The disagreement recorded in our study between the detection of positive manure ditches in a farms and negative pigs for HEV detection in the same farm could be due because in all those cases the number of tested pigs was only 4.

Concerning to the type of farm which tested more frequently positive to HEV, the only study is the abovementioned one from Kasorndorkbua *et al.* This work reported lower prevalence values for grower-to-finish and farrow-to-finish farms (66.67% for each type of farm) than those showed in our study. Additionally, no HEV identification was achieved in the only farrow-to-weaning farm tested.

The highest presence of HEV recorded in our study in farrow-to-finish farms can be explained by the type of handling followed in this type of herds. Usually in

these farms, there is no disinfection between lots, due to a continuous type of production. The deficiencies in disinfection procedures would maintain HEV circulating between lots in the same farm.

The percentage of farms (71.43%) which tested positive for HEV in any of the types of samples taken (serum, faeces, manure) was higher than the percentage (64.29%) reported by Kasorndorkbua *et al.* in 2005. The high rate detected indicates that HEV is widespread in swine population from the Valencian Community.

Recent studies have reported that hepatitis E is a zoonotic illness (Meng *et al.* 1998b). In industrialized countries where hepatitis E is not considered endemic, a high seroprevalence in the human population has been detected. This information raised the suspicion of the existence of one or more animal reservoirs for HEV (Thomas *et al.* 1997). Moreover, HEV genome detection in USA by Meng *et al.* in 1997 and its close genetic relationship to human HEV strains from the same area supports this hypothesis.

The high presence of HEV (38.10%) in swine manure indicates the potential for spreading to humans through contact with contaminated crops or in personnel that handle swine manure and spread this waste on agricultural fields.

### **5.3. GENETIC CHARACTERIZATION OF SWINE HEV STRAINS**

Previously to this research work, only 2 swine strains had been reported in Spain (Catalonia). One was isolated in sewage from a porcine slaughterhouse (Pina *et al.* 2000) and the other from pooled faeces in one farm (Clemente-Casares *et al.* 2003). Very recently, three studies have been published or are in press relating to swine sequences in Spain. Two have been published by our research group in Valencian Community. As a result of these two works, 16



swine sequences have been reported and they are included in the present study. The first swine strains isolated in manure ditches in Europe are included in these strains (Fernández-Barredo *et al.* 2006 y Fernández-Barredo *et al.* 2007, in press). The third study detected HEV RNA in different organs from pigs affected by diverse pathological conditions (de Deus *et al.* 2007). In all of these studies, the identified strains belonged to genotype 3.

The 30 strains sequenced in the present study have enabled extension of the knowledge of the genetic diversity of swine strains circulating in Spain. Additionally, more details about their relationships with other human HEV sequences from Spain and other industrialized countries have been obtained.

All our sequences clustered into the genotype 3, subtype 3f following the classification by Lu *et al.* 2005 and close to Spanish human strains. These data are similar to the data recorded in other industrialized countries between human and swine strains from the same area (Ahn *et al.* 2005; Hsieh *et al.* 1999; Ijaz *et al.* 2005; Meng *et al.* 1997; Takahashi *et al.* 2003a).

The distribution of our swine strains in two clusters in the phylogenetic tree, suggests two different origins. One of the clusters comprised the British human strains NT2 and NT4 (Ijaz *et al.* 2005) and a strain from Barcelona (Spain) (Pina *et al.* 2000). Ijaz *et al.* reported that two of the patients included in their study (NT) had recently travelled to Spain. This could be an explanation of why those strains have clustered with our sequences instead of the rest of British sequences. However, we cannot confirm it because Ijaz *et al.* did not specify which sequences belonged to the patients who travelled to Spain.

The other cluster comprised the rest of our swine sequences, as well as swine strains from The Netherlands and a human sequence from Barcelona (Spain).

The importation of piglets from The Netherlands to Spain seems to be the most probable cause of the close genetic relationship observed between these strains and the Spanish ones. In Spain, it is necessary to import piglets since there is not enough production to cover the free vacancies in grower-to-finisher farms. Therefore, Spain is the third importer from Europe and piglets are mainly bought from The Netherlands.

The close relationship between some sequences obtained in the same farm but different to other farms suggests that one or several predominant strains have been circulating into the same farm for a long period of time. However, a high homology has been recorded between the majorities of the sequences obtained in the sampled farms. This fact suggests that a high number of the same strains are circulating among the different farms. A possible explanation could be the common origin of the piglets. Nevertheless, other possible ways of transmission among farms should be investigated, including swine workers visiting different farms, rodents, etc.

## **6. CONCLUSIONS**

1. Prevalence values recorded in the present study have been high in both faeces and serum samples. Such prevalence values varied greatly depending on the production stage. The number of positive HEV RNA pigs increased from the first weeks of age to reach a maximum prevalence at the beginning of the growers' stage. The high presence of HEV in sows, suggests that they can constitute an important source of infection for their piglets.
2. Pigs in the first month of feeding (weeks 13-16) are most at risk of shedding HEV in faeces than in the rest of the production stages.
3. The high number of HEV positive farms indicates that this virus is widespread in the Valencian Community.
4. HEV was found in a high number of manure ditches. The zoonotic nature of this virus raises concern about its impact on public health due to the practice of using swine manure as soil fertilizer.
5. HEV strains sequenced in the present study showed higher homology percentages into the same farm than between different farms. This finding suggests that one or several predominant strains are circulating within the same farm.
6. HEV strains showed higher homology when compared with human Spanish strains than with swine strains belonging to other European countries.



## **10. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL**



## BRIEF COMMUNICATIONS

### Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction

Salceda Fernández-Barredo, Carolina Galiana, Angel García, Santiago Vega, María Teresa Gómez, María Teresa Pérez-Gracia<sup>1</sup>

1

**Abstract.** The aim of this study was to determine at which production stages hepatitis E virus (HEV) is shed by the highest number of pigs and to estimate the relative risk associated with each stage. For this purpose, 146 fecal samples of pigs from 21 farms were studied. In addition, 1 sample from the manure ditch and another sample of drinking water, collected directly from the trough located in the pen, were taken from 16 farms. HEV RNA was detected in fecal samples from 34 pigs (23.29%). The production stages in which most pigs excreted HEV were weaners (41.7%) and pigs in the first month of feeding (60%). The results of the statistical analysis showed that the principal significant risk stage in HEV shedding was the first month of feeding (odds ratio [OR] 19.5, 95% CI 3.59–106.07,  $P = 0.001$ ) followed by the weaners stage (OR 9.3, 95% CI .78–48.42,  $P = 0.008$ ). In 8 out of 16 farms tested (50%) HEV RNA was detected in raw manure and in the water trough of only 1. Detection of HEV in manure ditches raises the concern of how to deal with manure of swine origin, because it is used as soil fertilizer.

**Key words:** Feces; hepatitis E virus; pigs; production stages; swine; zoonoses.

Hepatitis E virus (HEV) is the main causative agent of non-A non-B enterically transmitted hepatitis with an acute and self-limiting clinical presentation in humans.<sup>13,16</sup> Mortality rates are low in the population, except for pregnant women, especially in their third trimester, where mortality rates increase dramatically and can reach 25%. HEV was provisionally classified as belonging to the *Caliciviridae* family from 1988 through 1998, but is now classified in the separate genus *Hepevirus* in a new family which has been named *Hepeviridae*. Although at least 4 major genotypes have been identified, only 1 serotype of HEV is recognized.<sup>18</sup>

Epidemic and sporadic epidemiological forms of hepatitis E have been reported. The former is related to drinking contaminated water in developing countries with poor sanitary conditions.<sup>20</sup> The latter form has been reported between epidemics in these areas, in patients with a history of traveling to endemic areas, and in those in industrialized countries who have not traveled abroad (autochthonous hepatitis).<sup>14</sup>

Occurrence of autochthonous HEV infection in humans has led to the screening of domestic animals for the presence of the virus in developed countries, and a high seroprevalence has been found, especially in swine farms. In

From the Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal, Universidad Cardenal Herrera–CEU, Moncada (Valencia), Spain.

<sup>1</sup> Corresponding Author: María Teresa Pérez-Gracia, Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad Cardenal Herrera–CEU, Moncada 46113, Valencia, Spain (e-mail: teresa@uch.ceu.es).

1997 the first swine strain HEV was isolated<sup>10</sup> and showed a high percentage of homology with an autochthonous human strain in USA (US-2). A year later, the experimental infection of macaques with a swine HEV strain demonstrated the ability of the virus to cross the species barrier, but only mild clinical signs and/or biochemical alterations were observed.<sup>11</sup> Several swine HEV isolates were subsequently identified in pigs in Canada,<sup>22</sup> Japan,<sup>12</sup> Korea,<sup>4</sup> New Zealand,<sup>5</sup> the Netherlands,<sup>19</sup> and the UK.<sup>2</sup>

The aim of this work was to study the prevalence of HEV in pig feces in Spain and determine the production stages in which HEV is shed by the highest number of pigs, in order to estimate the relative risk associated with each stage. To do this, 146 pigs were selected at random for the study from 21 farms. From January 2002 through August 2004 fecal samples were collected directly from the rectum and placed in sterile containers. Farms were of the following types: 5 farrow-to-weaning farms (farms that keep breeder sows, piglets, and weaners, with piglets moved to nurseries from weaning at 3 weeks up to 12 weeks), 11 grower-to-finish farms (in these farms, 12-week-old weaners are bought and fed until they reach 5 months), and finally 5 farrow-to-finish farms (pigs of all production stages are kept on the same farm). Pigs were divided into groups on the basis of their production stages: 18 suckling piglets (from birth to weaning); 24 weaners (pigs from weaning to 12 weeks old); 20, 20, and 28 pigs in the first, second, and third month of feeding respectively; 32 breeder sows (adult females nursing piglets); and 4 boars (adult males).

In addition, a sample from the raw manure ditch and a sample of drinking water (obtained directly from the trough in the pen) were taken from 16 farms. Samples from

**Table 1.** Detection of swine HEV RNA in pigs at different production stages.

Production stage	HEV in feces		Odds ratio (95% CI†)	P*
	Positive pigs / total (% positive)			
Suckling piglets	2 /18 (11.1%)		1.6 (0.21–12.71)	0.644
Weaners	10/24 (41.7%)		9.3 (1.78–48.42)	0.008
First month of feeding	12/20 (60.0%)		19.5 (3.59–106.08)	0.001
Second month of feeding	1/20 (5.0%)		0.7 (0.06–8.11)	0.764
Third month of feeding	2/28 (7.1%)		1.0	—
Breeding sows	7/32 (21.9%)		3.6 (0.69–19.23)	0.128
Boars	0/4 (0%)		0.00	0.999
TOTAL	34/146 (23.3%)			

† CI = confidence interval.

\* P values less than 0.05 were considered significant.

the manure ditch and samples of feces were diluted with phosphate-buffered saline (PBS) to 10% (w/v) suspensions. These were centrifuged at  $2000 \times g$  for 10 minutes at room temperature; the supernatant was either used immediately to extract RNA or kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

RNA was extracted from 140  $\mu\text{l}$  of each fecal, manure, or water sample using a commercial kit<sup>a</sup> following the manufacturer's instructions. Two pairs of degenerated oligonucleotide primers were used to amplify a 348-base-pair (bp) fragment of open reading frame 2 (ORF-2) of HEV using an RT-nested PCR.<sup>7</sup> These primers were based on 18 human HEV sequences and the swine HEV prototype strain from USA. A positive control from a naturally infected pig (GenBank accession number AY323506) was included in each procedure. All assays were performed in different places to avoid the possibility of cross-contamination. The PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel and were detected by staining with ethidium bromide. Amplicons were purified and both strands sequenced using a sequencing reaction kit.<sup>b</sup> Sequences obtained in this study were deposited in the GenBank database under accession numbers DQ093564, DQ093566, DQ093567, DQ093568, DQ141118, DQ141119, DQ141120, DQ141121, and DQ141127. A binary logistic regression was performed to determine the effect of the production stage on the prevalence of HEV in pig feces and to calculate OR and their 95% CI. The fit of the final model was assessed by the Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test. Statistical analyses were performed using a statistical analysis software package.<sup>c</sup> The samples were considered positive to the presence of HEV when a band of 348 bp was seen in the agarose gel. HEV RNA was detected in fecal samples of 34 pigs (23.3%) although none of them exhibited clinical signs of infection.

Results according to the production stage of pigs are shown in Table 1. Only 2 of the 3-week-old pigs out of 18 (11.1%) suckling piglets were shedding the virus. The prevalence increased in weaners with a result of 41.7%, reaching a maximum in the first month of feeding with a prevalence of 60%. The minimum rate was observed in the second month of feeding with 1 positive pig out of 20 (5%). Of the adult pigs, none of the 4 boars tested positive for HEV RNA, but there was a prevalence of 21% in the breeding sows. To determine the correlation between the

presence of HEV in feces and production stages, odds ratios (ORs) and their corresponding 95% confidence intervals (CIs) were calculated using binary logistic regression analysis. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant. Table 1 shows the results of the binary logistic regression analysis. In this model, the first month of feeding (OR 19.5, 95% CI 3.59–106.08,  $P = 0.001$ ) was recorded as the main significant risk stage for shedding HEV, followed by the weaners stage (OR 9.3, 95% CI 1.78–48.42,  $P = 0.008$ ). The Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test showed a good fit for the final model ( $\chi^2 = 2.87$ ,  $P = 0.897$ ).

At least 1 positive pig was detected on 8 of the 21 (38.1%) farms tested (Table 2). HEV RNA was detected in manure from 8 (50%) farms and in the water trough of 1 (6.25%)

**Table 2.** Detection of swine HEV RNA from fecal samples and from raw manure and trough for water in different types of herds.\*

Farm	Type of farm	Pigs positive/ tested (%)	Trough water	Manure ditch
1	F-W	0/8 (0)	NEG	NEG
2	F-W	8/8 (100)	NEG	NEG
3	F-F	0/8 (0)	N/A	N/A
4	F-F	0/8 (0)	NEG	NEG
5	G-F	0/4 (0)	NEG	POS
6	G-F	1/4 (25)	NEG	POS
7	G-F	1/4 (25)	NEG	NEG
8	G-F	1/4 (25)	NEG	POS
9	G-F	0/4 (0)	NEG	NEG
10	F-F	3/12 (25)	NEG	NEG
11	F-W	0/8 (0)	NEG	NEG
12	G-F	0/4 (0)	NEG	NEG
13	G-F	0/4 (0)	POS	POS
14	G-F	0/4 (0)	NEG	POS
15	G-F	0/4 (0)	NEG	POS
16	G-F	0/4 (0)	NEG	POS
17	G-F	0/4 (0)	NEG	POS
18	F-W	1/6 (16.6)	N/A	N/A
19	F-F	12/19 (63.2)	N/A	N/A
20	F-W	0/6 (0)	N/A	N/A
21	F-F	7/19 (36.8)	N/A	N/A
Total		34/146 (23.3)	1/16 (6.2)	8/16 (50)

\* F-W = farrow-to-weaning; F-F = farrow-to-finish; G-F = grower-to-finish; N/A = not available.



farm out of 16. At least 1 pig was found to be positive and HEV detected in manure in a total of 3 farms out of 8. The same value was recorded for farms with at least 1 positive pig, but negative for manure. The correlation between the presence of HEV in pigs from a farm and the presence in the manure ditch of the same farm was assessed using a  $\chi^2$  test, but no significant association was recorded. However, a large number of samples would be necessary to confirm these results. The percentage of infected pigs on farms found to be negative for HEV in manure was 21.4% (12 out of 56 pigs), whereas the percentage of farms found to be positive for HEV in manure was 6.2% (2 out of 32).

To the authors' knowledge, this is the first epidemiological study in Europe to take each production stage of swine into consideration. Total prevalence values (23.3%) obtained in this work are similar to the few studies that have tested feces from individual pigs, although the number of animals in each case was fewer than in the present study. In the UK, 26.19% of 12- to 15-week-old pigs were found to be shedding HEV in feces on 2 farms studied.<sup>2</sup> In New Zealand, 37.8% of 7- to 17-week-old pigs from 2 farms (45 pigs) were found to be shedding HEV in feces.<sup>5</sup> In the USA 25 (26.3%) 2- to 4-month-old pigs out of 95 were reported to be shedding the virus.<sup>7</sup>

It takes between 2 and 3 weeks from initial infection to the time when HEV is excreted in feces,<sup>11</sup> and the viral shedding can last up to 7 weeks. Considering the fact that the maximum prevalence recorded in this work was found in the first month of feeding (around 13 to 16 weeks of age), it is reasonable to extrapolate that the majority of animals were infected at 3 to 6 weeks of age from contact with the sows. After an incubation period of 2 to 3 weeks, the virus would have spread during the weaner stage and reached maximum prevalence in the first month of feeding. The second and third months of feeding (just before slaughter) showed the lowest prevalence values (5% and 7.1% respectively). This could be due to the development of an effective immune response to HEV at this stage. An interesting point is the relatively high prevalence found in breeding sows (21.9%). It is known that during pregnancy sows may shed some infectious organisms, such as parasites and rotavirus, in higher titer.<sup>3,6,16</sup> This may also be the case with HEV but, to the authors' knowledge, there is only 1 study of this stage: experimental infection of pregnant gilts<sup>8</sup> found no clinical signs or documented transmission in utero to the offspring, even though HEV infection was successful and gilts shed HEV in feces. HEV antibodies were detected in 10- to 61-day-old pigs born to inoculated sows. As in other studies, no clinical signs were recorded in the pigs sampled, so it would seem that the infection is subclinical in pigs. Thus exposure in the form of personal contact with subclinically infected animals could result in HEV transmission from pigs to humans.

For practical purposes, the data on viral prevalence according to production stages obtained in this study could help to guide targeted sampling in the production stages most at risk, in order to minimize the cost of testing on a farm. In addition, it could also help prevent the involuntary transmission by infected animals to an HEV-free farm. There is no report of HEV RNA being detected

in manure ditches and water troughs on swine farms in Europe. The values obtained in manure ditches were surprisingly high, with 8 out of 16 farms testing positive (50%) (Table 2). Only 1 water trough out of the 16 farms was found to be positive (6.2%). The virus could have reached the water trough through a pig's snout that had previously been in contact with a contaminated floor. No correlation has been recorded between the presence of HEV in pigs on a particular farm and the presence of HEV in the manure ditch of that farm. Furthermore, the percentage of infected pigs on farms found to be negative for HEV in manure was much higher (21.4%) than that on farms found to be positive for HEV in manure (6.2%). Thus, the analysis of only 1 type of sample would decrease the sensitivity of HEV detection on farms. The high presence of the virus in manure ditches raises concern about its use as soil fertilizer. A study of the viability of the virus<sup>15</sup> reported detectable levels of HEV in sewage by RT-PCR over a 2-month period. Thus it would be desirable to undertake studies to determine the resistance of the virus in the environment in order to evaluate the potential risk to humans, especially when water is not tested for HEV. Correct treatment of sewage or its routine screening and treatment of waste materials may be needed to prevent HEV contamination of waterways or areas around farms.

Several studies performed in Japan,<sup>12</sup> the UK,<sup>2</sup> and the US<sup>10,11</sup> support the contentions that zoonotic infection between pigs and humans may occur and that human and swine HEV may coexist in nonendemic areas. Recent studies suggest that autochthonous hepatitis E infection is underdiagnosed in developed countries. A study in which sera from 336 Spanish patients diagnosed for idiopathic acute hepatitis was reevaluated<sup>14</sup> found seroprevalence of 8.9% using anti-HEV IgM. Other studies carried out in several European countries such as Austria,<sup>21</sup> England,<sup>2</sup> France,<sup>9</sup> and Italy<sup>23</sup> have found autochthonous cases with a high percentage of nucleotide similarity to porcine strains from the same geographic area. In summary, this work could serve to highlight the production stages in which pigs are in most danger of infecting other pigs. The presence of swine manure indicates the potential for spread to humans through contact with contaminated crops or in personnel that handle swine manure and spread this waste on agricultural fields.

*Acknowledgements.* This work was supported by grants from Cardenal Herrera–CEU University (PRUCH 04/8), Escuela Valenciana de Estudios de Salud (053/2005), and Consellería de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana (GV05/132). S. Fernández-Barredo is a grant holder of Cardenal Herrera–CEU University. We are grateful to Ms. Margot Ovenden for the assistance in translating the manuscript, and Ms. Paloma Botella has kindly helped in statistical analysis of the data.

### Sources and manufacturers

- a. QIampViral RNA Kit, Qiagen, Valencia, CA.
- b. ABIPRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, Perkin-Elmer.
- c. SPSS software package (version 12.0).

[2]

[3]

[4]

[5]

[6]

### References

1. Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM, et al.: 2001, Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat* 8:223–227.
2. Banks M, Heath GS, Grierson SS, et al.: 2004, Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet Rec* 154:223–227.
3. Benfield DA, Stotz I, Moore R, McAdaragh JP: 1982, Shedding of rotavirus in feces of sows before and after farrowing. *J Clin Microbiol* 16:186–190.
4. Choi IS, Kwon HJ, Shin NR, et al.: 2003, Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea. *J Clin Microbiol* 41:3602–3608.
5. Garkavenko O, Obriadina A, Meng J, et al.: 2001, Detection and characterization of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* 65:525–529.
6. Gelberg HB, Woode GN, Kniffen TS, et al.: 1991, The shedding of group A rotavirus antigen in a newly established closed specific pathogen-free swine herd. *Vet Microbiol* 28:213–229.
7. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, et al.: 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. *J Clin Microbiol* 40:1326–1332.
8. Kasorndorkbua C, Thacker BJ, Halbur PG, et al.: 2003, Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res* 67:303–306.
9. Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, et al.: 2004, Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* 74:419–424.
10. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al.: 1997, A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9860–9865.
11. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, et al.: 1998, Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72:9714–9721.
12. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, et al.: 2001, Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289:929–936.
13. Perez-Gracia MT, Rodriguez-Iglesias M: 2003, Aspectos actuales del virus de la hepatitis E [Hepatitis E virus: current status]. *Med Clin (Barc)* 121:787–792.
14. Perez-Gracia MT, Garcia-Valdivia MS, Galan F, Rodriguez-Iglesias MA: 2004, Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol* 48:197–200.
15. Pina S, Jofre J, Emerson SU, et al.: 1998, Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol* 64:4485–4488.
16. Purcell RH, Emerson SU: 2000, Hepatitis E virus infection. *Lancet* 355:578.
17. Roberts L, Walker EJ: 1982, Field study of coccidial and rotaviral diarrhoea in unweaned piglets. *Vet Rec* 110:11–13.
18. Schlauder GG, Mushahwar IK: 2001, Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 65:282–292.
19. van der Poel WH, Verschoor F, van der Heide R, et al.: 2001, Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 7:970–976.
20. Viswanathan R, Sidhu AS: 1957, Infectious hepatitis; clinical findings. *Indian J Med Res* 45:49–58.
21. Worm HC, Schlauder GG, Wurzer H, Mushahwar IK: 2000, Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Austria: sequence, phylogenetic and serological analysis. *J Gen Virol* 81:2885–2890.
22. Yoo D, Willson P, Pei Y, et al.: 2001, Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1213–1219.
23. Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, et al.: 1999, Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 57:356–360.



Dr. M.T. Perez-Gracia,  
Departamento de Atencion Sanitaria,  
Salud Publica y Sanidad Animal,  
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud,  
Universidad CEU Cardenal Herrera,  
Avenida Seminario s/n,  
46113 Moncada,  
Valencia, Spain.

October 23, 2006

Dear Dr. Perez-Gracia,

I am pleased to tell you that your manuscript 06-59; 'Prevalence and Genetic Characterization of Hepatitis E Virus (HEV) in paired Samples of Feces and Serum from Naturally Infected Pigs' has been accepted for publication in the Canadian Journal of Veterinary Research as a Short Communication. Galley proofs will be sent to you in due time and these should be carefully checked and then returned as quickly as possible.

Sincerely,

Éva Nagy, DVM, PhD  
Editor, CJVR  
Dept. of Pathobiology,  
Ontario Veterinary College,  
University of Guelph,  
Guelph, Ont.  
N1G 2W1  
Canada

Telephone: 519-824-4120 (4783)  
FAX: 519-824-5930  
e-mail: enagy@ovc.uoguelph.ca

## Prevalence and genetic characterization of *Hepatitis E virus* in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs

Salceda Fernández-Barredo, Carolina Galiana, Angel García, Maria Teresa Gómez-Muñoz, Santiago Vega, Manuel A. Rodríguez-Iglesias, Maria Teresa Pérez-Gracia

### Abstract

This study describes the distribution of *Hepatitis E virus* (HEV) in a naturally infected swine population and the genetic relatedness of HEV strains on swine farms in Spain. Of fecal and serum samples collected from 131 pigs and manure-ditch samples collected from 17 farms, HEV was detected in 16%, 14%, and 59%, respectively, for an overall prevalence rate of 23%. The maximum prevalence rates for feces and serum were in pigs 5 to 12 wk old. A high prevalence of the virus in feces (18%) was observed in sows. Gene sequencing was performed on 6 strains from feces, serum, and manure ditch: the nucleotide identities varied from 81.5% to 99% when compared with those of other strains of genotype 3 isolated from swine. This is the first study in Europe to show the variation in virus distribution by age in feces and serum in a naturally infected swine population.

### Résumé

*Cette étude décrit la distribution du virus de l'hépatite E (HEV) dans une population de porcs naturellement infectés et la parenté génétique de souches de HEV provenant de fermes porcines en Espagne. À partir d'échantillons de fèces et de sérum prélevés de 131 porcs, et de fosses à purin sur 17 fermes, le HEV a été détecté, respectivement, dans 16 %, 14 % et 59 % des échantillons, pour une prévalence globale de 23 %. Les taux maximums de prévalence pour les fèces et le sérum ont été retrouvés chez les porcs de 5 à 12 semaines d'âge. Une prévalence élevée de virus dans les fèces (18 %) a été observée chez les truies. Le séquençage génétique a été effectué sur 6 isolats provenant des fèces, du sérum et de fosse à purin : l'identité nucléotidique a varié de 81,5 % à 99 % en comparaison avec d'autres souches du génotype 3 isolées de porcs. Il s'agit de la première étude européenne à démontrer la variation de la distribution du virus selon l'âge dans les fèces et le sérum d'une population de porcs infectés naturellement.*

(Traduit par Docteur Serge Messier)

Hepatitis E is the main cause of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in developing countries. The mortality rate for this infection is generally low (1%) but is up to 25% in pregnant women. A nonenveloped, single-stranded RNA virus of approximately 7.2 kb, the *Hepatitis E virus* (HEV) is encoded by 3 open reading frames (ORFs) in the genome (1). At least 4 major genotypes of HEV have been identified. Genotype 1 includes human isolates from Asia and North Africa, and genotype 2 comprises human isolates from Mexico and some African countries. Genotypes 3 and 4 include human and swine strains isolated in industrialized countries as well as developing areas (2).

Hepatitis E has been considered endemic in Asia, South America, and Africa. Despite the low number of sporadic acute cases in developed regions among people with no history of travel to endemic areas, a surprisingly high level of HEV antibodies has been reported, suggesting that the virus is more widespread than previously recognized (3,4). This finding has raised the suspicion of an animal reservoir for the virus and that hepatitis E is a zoonosis. The first animal strain was isolated from a pig in the United States in 1997 (5). More studies in other developed countries have reported high seroprevalence rates and new isolates of swine origin (6,7). Sequence

analysis has shown that indigenously acquired human and swine isolates in industrialized countries are clustered in the same genotype (3 or 4) (7), supporting the strong suspicion of hepatitis E as a zoonosis. Furthermore, swine isolates are related more to human strains from the same geographic region than to swine strains from different areas (8). Since pigs experimentally infected with human strains have shed the virus for several weeks in feces (9), swine production may represent a significant environmental reservoir of infection. Routes of transmission remain unclear, although in 2004 Kasorndorkbua et al (10) reported experimental evidence of fecal-oral transmission between pigs in the same pen. However, the way in which HEV passes from pigs to humans remains unknown. It has been reported that swine veterinarians in the United States are 1.51 times more likely to have positive results of HEV antibody tests than are normal blood donors in the same geographic area (11).

The aim of this study was to detect HEV and to investigate the dynamics of virus distribution in feces and serum at various ages in a naturally infected swine population in Spain. In addition, the strains isolated were to be genetically characterized and compared with other swine and human HEV strains from different areas of the world.

Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Avenida Seminario s/n 46113 Moncada, Valencia, Spain (all authors except Rodríguez-Iglesias); Laboratorio Microbiología, Hospital Universitario de Puerto Real, Cádiz, Spain (Rodríguez-Iglesias).

Address all correspondence and reprint requests to Dr. Maria Teresa Pérez-Gracia; fax: 0034 961395272; e-mail: teresa@uch.ceu.es

Received July 13, 2006. Accepted October 23, 2006.

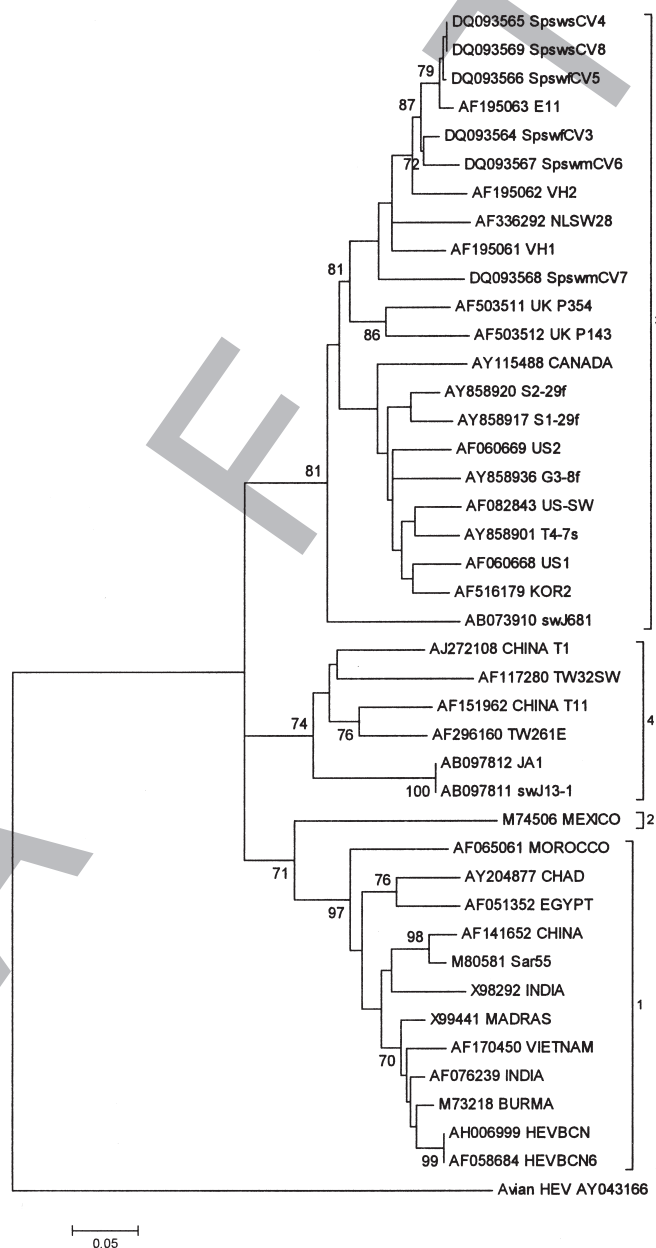
**Table I. Detection of Hepatitis E virus (HEV) RNA in feces and serum of pigs of various ages**

Age, wk (and no. of pigs)	% of HEV-positive samples	
	Feces	Serum
0–4 (20)	2 (10)	4 (20)
5–12 (22)	9 (41)	7 (32)
13–20 (20)	1 (5)	2 (10)
21–24 (27)	2 (7)	3 (11)
> 25 (boars) (4)	0 (0)	0 (0)
> 25 (sows) (38)	7 (18)	2 (5)
Total (131)	21 (16)	18 (14)

Sample size was established taking into account the national census of the Ministry of Agriculture of Spain in 2002, which reported 1 129 055 pigs for the Valencia community. The expected prevalence was 13.7% (12), with a confidence of 95% and an accepted error of 6%. Included in the study, conducted from January 2002 to August 2004, were 131 pigs from 21 farms.

Fecal and blood samples were collected at the same time from 131 animals at different production stages: 20 piglets 0 to 4 wk old, 22 weaners 5 to 12 wk old, 20 feeders 13 to 20 wk old, 27 finishers 21 to 24 wk old, 4 boars, and 38 sows with suckling piglets. The number of animals sampled at each farm was determined on the basis of the farm's size. Additionally, samples of manure ditch were taken from 17 farms. The fecal samples were obtained directly from the rectum and kept in sterile containers. They were diluted at 10% (w/v) in phosphate-buffered saline, pH 7.2, and centrifuged to collect supernatant for RNA extraction. The remaining supernatant was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The blood samples were obtained by puncture of the jugular vein and collected in tubes without anticoagulant. After separation, the serum was used for RNA extraction. The remaining sample was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Samples of manure ditch were centrifuged directly without dilution and the supernatants used for RNA extraction.

We performed RNA extraction, reverse transcription (RT), and nested polymerase chain reaction according to the method described by Fernandez-Barredo et al (13), using primers designed by Huang et al (8). Sequence alignments were generated by ClustalW, and sequence analysis was performed with the use of Bioedit Sequence Alignment Editor. The swine sequences reported in this work were compared with 36 sequences selected from the 4 genotypes available in the GenBank database, which included strains of human origin (AY204877 Chad, AF051352 Egypt, AF141652 China, X98292 India, AF170450 Vietnam, X99441 Madras [India], AF065061 Morocco, M80581 Sar55 [Pakistan], M73218 Burma [India], AF076239 India, AH006999 HEVBCN [Spain], AF058684 HEVBCN6 [Spain], M74506 Mexico, AF060668 US1 [USA], AF060669 US2 [USA], AF195062 VH2 [Spain], AF195061 VH1 [Spain], AJ272108 China T1, AF151962 China T11, AF296160 TW261E [Taiwan], AB097812 JA1 [Japan]), swine origin (AF082843 US-SW, AF336292 NLSW28 [The Netherlands], AF503511 UK P354, AF503512 UK P143, AF195063 E11 [Spain], AY858936 G3-8f [Mexico], AY858920 S2-29f [Mexico], AY858917 S1-29f [Mexico], AY858901 T4-7s [Taiwan], AF516179 KOR2 [Korea], AY115488 Canada, AB073910 swJ681 [Japan], AF117280 TW32SW



**Figure 1. Phylogenetic relationships among swine and human strains of Hepatitis E virus (HEV) representing the 4 major genotypes, based on a 222-nucleotide fragment of open reading frame 2 of the genome. The scale bar represents an evolutionary distance of 0.05 nucleotides per site.**

[Taiwan], AB097811 swJ13-1 [Japan]), and avian origin (AY043166); the last sequence had only recently been identified. A phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method with a substitution model of the Kimura 2-parameter, based on the partial nucleotide sequence of the ORF2 region (222 nucleotides). Bootstrap values were determined on 1000 resamplings of the data sets. Phylogenetic and molecular evolutionary genetics analyses were conducted by means of MEGA, version 3.0 (www.megasoftware.net).

We detected HEV at 16 of the 21 farms (76%) and in 21 (16%) of the 131 fecal samples, 18 (14%) of the 131 serum samples, and 10 (59%) of the 17 manure-ditch samples. As Table I shows, the frequency of detection in feces was highest among the pigs 5 to 12 wk old (41%)

**Table II. Nucleotide similarity of a 222-base-pair fragment of open reading frame 2 of the HEV genome of swine and human strains of genotype 3, as compared with 6 strains isolated in this study**

Selected strains <sup>a</sup>	Study strains (GenBank accession no. of the sequence); % similarity of fragment					
	SpswfCV3 (DQ093564)	SpswsCV4 (DQ093565)	SpswfCV5 (DQ093566)	SpswmCV6 (DQ093567)	SpswmCV7 (DQ093568)	SpswsCV8 (DQ093569)
<i>AF082843 US-SW</i>	85.5	87.3	86.9	84.6	83.7	87.3
<u>AF060668 US1</u>	84.6	85.5	86.0	83.7	83.3	85.5
<u>AF060669 US2<sup>b</sup></u>	85.5	85.5	86.0	83.7	85.1	85.5
<i>AF336292 NLSW28</i>	90.5	90.9	90.5	88.7	86.4	90.9
<i>AF503511 UK P354</i>	86.9	85.1	85.5	86.4	85.5	85.1
<i>AF503512 UK P143</i>	85.5	83.7	84.2	84.6	86.9	83.7
<i>DQ093564 SpswfCV3</i>	—	96.8	97.2	96.3	90.0	96.8
<i>DQ093565 SpswsCV4</i>	96.8	—	99.5	95.0	89.6	100
<i>DQ093566 SpswfCV5</i>	97.2	99.5	—	95.4	90.0	99.5
<i>DQ093567 SpswmCV6</i>	96.3	95.0	95.4	—	89.1	95.0
<i>DQ093568 SpswmCV7</i>	90.0	89.6	90.0	89.1	—	89.6
<i>DQ093569 SpswsCV8</i>	96.8	100	99.5	95.0	89.6	—
<i>AF195063 E11</i>	97.2	98.6	98.1	94.5	89.1	98.6
<u>AF195062 VH2</u>	93.6	94.1	93.6	91.8	91.4	94.1
<u>AF195061 VH1</u>	92.7	92.3	91.8	90.0	89.1	92.3
<i>AY858936 G3-8f</i>	83.3	85.1	85.5	83.3	84.2	85.1
<i>AY858920 S2-29f</i>	86.9	87.8	87.3	85.1	84.6	87.8
<i>AY858917 S1-29f</i>	86.0	86.9	86.4	86.0	84.2	86.9
<i>AY858901 T4-7s</i>	83.7	83.7	83.3	81.9	82.4	83.7
<i>AF516179 KOR2</i>	86.0	86.9	87.3	86.0	85.5	86.9
<i>AY115488 CANADA</i>	85.1	85.1	85.5	86.0	83.7	85.1
<i>AB073910 swJ681</i>	81.9	82.8	83.3	82.8	81.5	82.8

<sup>a</sup> Those in italics are of swine origin and those underlined are of human origin.

<sup>b</sup> For this strain, the deduced amino acid sequence of the fragment was 99% identical to that of all 6 of this study's strains, whereas for all of the other selected strains the similarity was 100%.

and lowest among the pigs 13 to 20 wk old (5%). Whereas HEV was not detected in feces from the boars, it was detected in 18% of the fecal samples from the sows. A similar pattern was observed for the serum samples, with the highest rate among the pigs 5 to 12 wk old (32%) and much lower rates in the next 2 age groups; however, apart from the boars, whose serum samples were free of HEV, the sows had the lowest rate in serum, at 5%. The overall rate of HEV detection among the pigs, including positive results for either type of sample or both types, was 23% (30/131), and the highest overall rate by age was 41%, in the animals 5 to 12 wk old. In 9 pigs HEV was detected in both feces and serum; 7 were aged 5 to 12 wk, and the other 2 were sows. No clinical signs specific for HEV infection were recorded for any of the pigs studied.

Partial sequences of 222 base pairs of the HEV capsid protein gene were obtained from 6 isolates and deposited in GenBank: 2 sequences from serum samples (SpswsCV4 [accession no. DQ093565] and SpswsCV8 [DQ093569]), 2 from fecal samples (SpswfCV3 [DQ093564] and SpswfCV5 [DQ093566]), and 2 from manure-ditch samples (SpswmCV6 [DQ093567] and SpswmCV7 [DQ093568]). Each isolate was from a different farm. The sequences were compared with others from the 4 known genotypes and were found to cluster in genotype 3 (Figure 1), together with porcine strains from Europe and North America as well as a Japanese swine strain. In this genotype, the Spanish sequences clustered in a minor branch with European

porcine strains and with human strains from acute autochthonous hepatitis E in Spain. The 6 new sequences had nucleotide similarity (Table II) with other swine sequences in genotype 3 ranging from 81.5% between SpswmCV7 and a Japanese swine strain to 98.6% between SpswsCV4 and SpswsCV8 and E11 (from sewage from a porcine slaughterhouse in Spain). The closest relationship (94.1% nucleotide similarity) between the 6 new sequences and human strains in genotype 3 was between SpswsCV4 and VH2, from a patient with acute hepatitis in Barcelona, Spain. Nucleotide translation to amino acids and multiple alignments demonstrated no variation among all the partial sequences in genotype 3 studied, human or swine, except for US2, which differed in only 1 amino acid. The similarity of swine Spanish strains and other strains in the other genotypes varied from 91% with the Mexican strain to 96% with human and porcine strains in genotype 4.

It has been reported that HEV in pigs is widespread in the world, involving not only countries in which human HEV infection is common, such as India (14), but also countries in which hepatitis E is rare, such as Canada, Britain, the United States, the Netherlands, New Zealand, and Spain (6–8,13,15,16). In several of these industrialized countries, there have been seroprevalence studies involving a large number of animals, but the sample size for RNA detection was much smaller than ours. Moreover, the special situation of Spain as the European doorway to Africa, in which only genotype 1 and

2 strains have been identified in humans, makes it interesting to determine the relationship between these swine strains and other human and swine strains from different areas of the world.

In Spain, a 25% HEV seroprevalence in pigs was reported, but no HEV RNA was detected in any of the serum or fecal samples (17). In another study, a seroprevalence of 13.7% was reported, but HEV RNA was again not isolated from serum (12); however, the genome was identified in pools of feces from a single farm in all the age groups studied (pigs 3, 5, and 8 wk old, fattening pigs, and primiparous sows). Ours is the first report from Europe about HEV detection in a naturally infected population through study of fecal and serum samples collected at the same time from each animal, which permitted us to evaluate at what age pigs should be more infectious for humans and other pigs because of virus shedding in the feces.

Data from the study of individual fecal samples are scarce and vary greatly depending on the study. Banks et al (18) in Britain reported 11 pigs (26%) to be positive out of 42, all tested between 12 and 15 wk of age. Van der Poel et al (6) in the Netherlands studied 9 pigs but did not detect HEV RNA. Garkavenko et al (16) in New Zealand, studying pigs between 7 and 17 wk old, found that 17 (38%) of 45 shed HEV, all 17 being 10 to 12 wk old. The frequency of positive fecal samples in our study was only 16%. A possible explanation for the higher rates in the other studies is a bias in age distribution, as the pigs aged 5 to 12 weeks had the highest rate of HEV detection in feces (41%) in our study.

In our study, 18% of sows had HEV in their feces and thus could be the source of new infections on the same farm and also of spread to other farms, since many farms sell piglets for feeding. The mechanism by which HEV almost disappears from the feces of 5-mo-old pigs (whose rate was only 7%) and then emerges in sows is uncertain. Stress during farrowing and suckling might increase susceptibility to HEV infection. Studies involving a larger number of samples from sows would be desirable to clarify this point.

The overall rate of HEV detection in serum in our study (14%) is the highest described to date among studies encompassing all ages but lower than the overall rate of detection in feces in our study. Since it has been reported that HEV viremia is transient (5), one would expect the real prevalence of HEV infection to be even higher than that obtained when testing pig serum for the presence of HEV RNA instead of feces. The high detection rates in this study show that the effectiveness of spreading is high with this virus.

The nucleotide sequences reported in this study are the first obtained in Spain from serum of pigs naturally infected by HEV as well as from manure ditches at farms. The latest reports of acute autochthonous hepatitis E in Spain (3,19) made it necessary to study a larger sample than in previous investigations to evaluate the level of endemicity of HEV in Spain. In addition, the sequences are useful for establishing, by phylogenetic analysis, the relationship to Spanish human strains and to human and swine strains from different geographic areas. The high nucleotide identity (94.1%) between human and swine sequences in genotype 3 observed in this study supports the evidence that HEV is a zoonotic agent. Furthermore, we found 100% homology in amino acid identity of the studied fragment when comparing human and porcine strains from genotype 3, which shows a close relationship among these strains, since 90.54% of the mutations are silent in the fragment studied. The recent find-

ing of HEV of only genotype 3 in pigs from areas where HEV in the human population belongs to genotype 1 raises the hypothesis that only strains of genotypes 3 and 4 have zoonotic potential (20). Since strains from pigs do not produce any symptoms, it would be reasonable to think that HEV could be more widespread among healthy people, as seroprevalence studies in normal blood donors have reported (21), especially in people working in contact with pigs (farmers, veterinarians).

In summary, this study has contributed to the knowledge of HEV distribution by age in serum and feces of a naturally infected swine population. It has also shown that HEV is detected at a high rate not only in feces of young pigs but also in feces of breeding sows. Moreover, HEV strains circulating in Spanish swine farms are highly homologous with Spanish human strains, which raise the high possibility of HEV transmission from swine to humans.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Generalitat Valenciana (GV05/132), Escuela Valenciana para Estudios de la Salud (Conselleria de Sanidad, 053/2005), and CEU Cardenal Herrera University (PRUCH 04/8, 06/21). Dr. Fernández-Barredo holds a grant from CEU Cardenal Herrera University. We are thankful to Dr. Malcolm Banks, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, England, for his kind help in the critical review of the manuscript.

## References

1. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185:120-131.
2. 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.
3. Perez-Gracia MT, Garcia-Valdivia MS, Galan F, Rodriguez-Iglesias MA. Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol* 2004;48:197-200.
4. Perez-Gracia MT, Rodriguez-Iglesias M [Hepatitis E virus: current status]. *Med Clin (Barc)* 2003;121:787-792.
5. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:9860-9865.
6. van der Poel WH, Verschoor F, van der Heide R, et al. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2001;7:970-976.
7. Banks M, Bendall R, Grierson S, Heath G, Mitchell J, Dalton H. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2004;10:953-955.
8. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, 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.
9. Halbur PG, Kasorndorkbua C, Gilbert C, 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.

10. Kasorndorkbua C, Guenette DK, Huang FF, Thomas PJ, Meng XJ, Halbur PG. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol* 2004;42:5047–5052.
11. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 2002;40:117–122.
12. Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, et al. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 2003;9:448–454.
13. Fernández-Barredo S, Galiana C, Garcia A, Vega S, Gómez MT, Perez-Gracia MT. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2006;18:462–465.
14. Arankalle VA, Chobe LP, Walimbe AM, Yergolkar PN, Jacob GP. Swine HEV infection in south India and phylogenetic analysis (1985–1999). *J Med Virol* 2003;69:391–396.
15. Yoo D, Willson P, Pei Y, et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:1213–1219.
16. Garkavenko O, Obriadina A, Meng J, et al. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* 2001;65:525–529.
17. Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 2000;33:826–833.
18. Banks M, Heath GS, Grierson SS, et al. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet Rec* 2004;154:223–227.
19. Buti M, Clemente-Casares P, Jardi R, et al. 2004. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J. Hepatol.* 41: 126–131.
20. Cooper K, Huang FF, Batista L, et al. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol* 2005;43:1684–1688.
21. Fukuda S, Sunaga J, Saito N, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among Japanese blood donors: identification of three blood donors infected with a genotype 3 hepatitis E virus. *J Med Virol* 2004;73:554–561.