

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Farmacia



**Detección y caracterización genética del
virus de la hepatitis E (VHE) en las
diferentes fases de tratamiento de purines
en plantas de compostaje**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

D. Mario García Andrés

Dirigida por:

Dra. Dña. M^a Teresa Pérez Gracia

VALENCIA

2013

Memoria presentada por D. Mario García Andrés
para optar al grado de Doctor en Farmacia

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos
de investigación PRUCH 25/10, PRUCH 39/11
y Santander-PRCEU-UCH 19/12 de la Universidad
Cardenal Herrera-CEU



Universidad
Cardenal
Herrera
CEU

Dña. María Teresa Pérez Gracia, Profesora Agregada de Microbiología del Departamento de Farmacia, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad CEU Cardenal Herrera,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE) EN LAS DIFERENTES FASES DE TRATAMIENTO DE PURINES EN PLANTAS DE COMPOSTAJE**" ha sido realizada por D. Mario García Andrés, bajo mi dirección y cumple los requisitos para su defensa.

Y para que así conste, firmo el presente en Moncada (Valencia) a 3 de septiembre de 2013.

Fdo.: Dra. María Teresa Pérez Gracia

*A mi familia y amigos.
A los que ya no están con nosotros.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a la Dra. Teresa Pérez la confianza depositada en mí para entrar y formar parte del equipo de personas que encabeza, y ofrecerme la oportunidad de realizar el presente trabajo. A su vez, agradecer también su apoyo, comprensión e infinita paciencia en todo el trayecto recorrido desde el inicio de esta *aventura científica*, demostrándome día a día que vale la pena todo el esfuerzo realizado si se hace con profesionales y con personas como ella. Sin duda, su amistad es una de las aportaciones en el terreno personal que más valoro de esta tesis doctoral.

A D. Bartolomé Serra, que fue decisivo para mi incorporación en los cursos de doctorado y al que siempre recordaré por ser, en parte responsable, de que hoy este trabajo vea la luz.

A Antonio Blanquer, por ayudarme en los primeros días en los que andaba perdido buscando el proyecto y facilitarme mucho el arranque, que es también complicado.

Darle las gracias a la Dra. Salceda Fernández-Barredo por todo el apoyo prestado durante mucho tiempo.

A la Dra. Carolina Galiana, por todas aquellas tardes de laboratorio y toda la ayuda que siempre ha estado dispuesta a darme, y sobre todo por su amistad y cariño, así como a la Dra. Teresa Gómez y al Dr. José Sansano por guiarme en mis primeros días de trabajo y en los sucesivos.

Quiero agradecer también la inestimable colaboración de D. Ángel Rey, responsable de proyectos especiales de TETMA, S.A. por facilitarme el acceso a las plantas y la obtención de muestras, así como a los técnicos y personal de las plantas, en especial a Pablo y Laura.

Fundamental fue la ayuda de D. Antonio Bataller, Jefe de Sección de Control de Aguas de la *Conselleria de Territori i Vivenda*, por toda la información, consejos y trámites que facilitaron el comienzo del trabajo que aquí se presenta.

A todo el personal del departamento de PASACTA de la facultad de Veterinaria, gracias en especial a Carlos Garcés por su estadística, y a Marilena Garijo, Jesús Cardells, Mariola Soler, Mila Mateos, Lorena Mocé y Olga Piquer por sus consejos en la etapa final y sus ánimos.

A todo el personal de laboratorio de la UCH-CEU, a los que tantas y tantas veces he recurrido y de los que siempre he obtenido ayuda y buena cara. Gracias a José Antonio García, Cristina, Vanesa, Ana y al resto de compañeros y compañeras que han pasado por allí y han prestado su colaboración.

A la Dra. M^a Luisa Mansego y al Dr. Lluís Pascual del departamento de Genética de la Universitat de València por estar siempre dispuestos a echar un cable, de manera desinteresada y sacando tiempo de donde fuese.

A Rosa, de secretaría general, a Juana y Natalia de secretaría de Veterinaria y a todas aquellas personas del PAS de la universidad por multitud de trámites y favores.

Por último agradecerle a toda mi familia, a mi madre por estar detrás de mí siempre, a mi padre por los genes extremeños y la cabezonería, y en especial a mis abuelos Paco, Mario y Amparo, que me vieron empezar y que ya no están aquí para verme acabar con esta tesis, pero allá donde estén, sé que vigilan, y ven a su nieto orgulloso de ellos, orgulloso de todo lo que me han enseñado y de haber hecho de mí la persona que soy, y sin duda, ser la base de la persona que seré durante toda mi vida.

I per suposat, gràcies a tu Lidia, per estar sempre amb un somriure, per acceptar-me com sóc, que no és gens fàcil, per ser com eres i per alegrar-me la vida cada dia que passes al meu costat.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS E	3
1.1.1. El genoma vírico	3
1.1.2. Replicación del VHE	7
1.1.3. Clasificación filogenética	9
1.2. EPIDEMIOLOGIA	21
1.2.1. Historia de la enfermedad	21
1.2.2. Formas de presentación	22
1.2.2.1. Presentación epidémica	22
1.2.2.2. Presentación esporádica	25
1.2.3. Vías de transmisión	26
1.2.3.1. Transmisión oral-fecal	26
1.2.3.2. Transmisión vertical	27
1.2.3.3. Transmisión por contacto directo	27
1.2.3.4. Transmisión parenteral	28
1.2.3.5. Transmisión sexual	28
1.2.3.6. Transmisión por alimentos	28
1.3. CLÍNICA	29
1.3.1. Hepatitis aguda	32
1.3.2. Hepatitis fulminante	33
1.3.3. Hepatitis crónica	33
1.4. PATOGENIA	34
1.5. DIAGNÓSTICO	37
1.6. TRATAMIENTO	39
1.7. PREVENCIÓN	40
1.7.1. Medidas higiénico-sanitarias	40
1.7.2. Vacunas	41

1.8. ASPECTOS ZONÓNICOS DE LA ENFERMEDAD. EL VHE EN CERDOS	42
1.9. PRODUCCIÓN PORCINA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA Y GESTIÓN DE PURINES	45
1.9.1. Introducción	45
1.9.2. Marco legal	45
1.9.2.1. Normativas sobre impacto ambiental	45
1.9.2.2. Normativas sobre vertidos	47
1.9.2.3. Normativas sobre residuos y aplicación en agricultura	48
1.9.3. Factores que determinan el riesgo sanitario en la aplicación agrícola de purines	51
1.9.4. Gestión de la eliminación de purines	53
1.9.4.1. Evolución de la ganadería en España y de la producción de purines	53
1.9.4.2. Modos de gestión de purines en la actualidad	54
1.9.5. Actuaciones	58
1.9.5.1. Aplicación directa	59
1.9.5.2. Tratamiento de los purines en granjas	60
1.9.5.3. Tratamientos centralizados	62
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	73
3. MATERIAL Y MÉTODOS	77
3.1. MUESTRAS	83
3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	90
3.2.1. Extracción del ARN vírico	90
3.2.2. Transcripción inversa del ARN vírico	92
3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa anidada	94
3.2.4. Electroforesis del producto amplificado	98

3.3. RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	100
3.3.1. Realización de la curva estándar	101
3.3.1.1. Obtención del fragmento VHEClon69 para clonación, por PCR	101
3.3.1.2. Clonación en plásmido TOPO del fragmento VHEClon69	104
3.3.1.3. Transformación de bacterias competentes DH5a™ y selección de colonias con el inserto VHEClon69	105
3.3.1.4. Extracción y purificación del ADN plasmídico	107
3.3.1.5. Obtención de la recta patrón	108
3.3.2. Protocolo amplificación RT-PCR a tiempo real	110
3.4. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS EN LA RT-NESTED-PCR.	112
3.4.1. Purificación del producto de PCR mediante escisión de las bandas del gel de agarosa	112
3.4.2. Reacción de secuenciación	113
3.4.3. Precipitación de los productos de la secuenciación	115
3.4.4. Resuspensión de los precipitados de la reacción de secuenciación	116
3.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS	116
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	128
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	129
4.1. RESULTADOS SEGÚN EL TIPO DE PLANTA	146
4.1.1. Planta con tratamiento integral de purines: Vall d'Alba y Todolella	146
4.1.1.1. Muestras líquidas	146

4.1.1.2. Muestras sólidas	158
4.1.2. Plantas sin tratamiento integral de purines: Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella	163
4.1.2.1. Muestras líquidas	163
4.1.2.2. Muestras líquidas	165
4.2. VALORACIÓN GLOBAL DEL PROCESO DE TRATAMIENTO DE PURINES	167
4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE VHE PORCINAS AISLADAS	173
5. CONCLUSIONES	189
6. RESUMEN	193
7. SUMMARY	199
8. BIBLIOGRAFÍA	205
9. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	255

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

≤	Menor o igual
≥	Mayor o igual
®	Marca registrada
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
°C	Grado centígrado
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Anti-VHE IgA	Anticuerpos frente al virus de la hepatitis E de tipo Inmunoglobulina A
Anti-VHE IgG	Anticuerpos frente al virus de la hepatitis E de tipo Inmunoglobulina G
Anti-VHE IgM	Anticuerpos frente al virus de la hepatitis E de tipo Inmunoglobulina M
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasas	Ribonucleasas
ARN-VHE	Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis E
ALT:	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BR	Bilirrubina
BH1	<i>black hole quencher 1</i>
C _i	Concentración inicial
C _f	Concentración final
C	Citosina
cm	Centímetros
DQO	Demanda química de oxígeno
DTT	Ditiotreitol
EDS	<i>Egg drop syndrome</i>
EDTA	Ácido etilén diamín tetra-acético
ELISA	Enzimoinmunoensayo

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EEUU	Estados Unidos de América
FAM	Fluoresceína
G	Guanina
g	Gramo
GCH	Gonadotropina coriónica humana
GGT	Gamma glutamil-transferasa
HF	Hepatitis fulminante
HPAI	<i>Highly pathogenic avian influenza virus</i>
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
IgM	Inmunoglobulina de tipo M
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosida
Kb	Kilobases
KDa	KiloDalton
Kg	Kilogramo
LacZ α	Gen de la enzima β -galactosidasa
LB (medio)	Luria-Bertani
LDH	Lactato deshidrogenasa
M	Molar
m	Metro
mV	Milivoltio
mM	Milimolar
MDH	Malato deshidrogenasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
nested-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa anidada
nm	Nanómetros
NTR	Región no codificante
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Fragmento de lectura abierta
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PGRA	Plan de Gestión de Residuos Agropecuarios

PM	Peso molecular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P/V	Peso/Volumen
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
SFDA	<i>State Food and Drug Administration</i>
spp.	Especies
T	Timina
Tm	Tonelada
T _m	Temperatura melting
T _a	Temperatura de hibridación
VHA	Virus de la hepatitis A
VHE	Virus de la hepatitis E
XGal	X-Galactosa
xg.	Equivalente a x veces la fuerza de la gravedad

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS E.

El virus de la hepatitis E (VHE) es el agente causal de la hepatitis E, principal causa de hepatitis de transmisión entérica en todo el mundo, siendo el responsable de más del 50% de los casos de hepatitis aguda en los países endémicos. Se estima que alrededor de 2 mil millones de personas están en riesgo de infección por el VHE al vivir en zonas endémicas (Pérez-Gracia y col. 2012). En países en vías de desarrollo, esta enfermedad es transmitida por el agua y origina grandes brotes epidémicos (Arankalle y col. 1995; Purcell y col. 2008).

En los últimos años se ha constatado una mayor incidencia y prevalencia de la enfermedad en países desarrollados, justificando este hecho la existencia de reservorios zoonóticos entre animales domésticos, como el cerdo. Así, se ha demostrado la infección del ganado porcino y su relación con los casos en humanos (Pérez-Gracia y col. 2007; Ma y col. 2013; Okano y col. 2013; de la Caridad Montalvo Villalba y col. 2013).

1.1.1. El genoma vírico.

El VHE es un virus desnudo con simetría icosaédrica (fig. 1), 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).

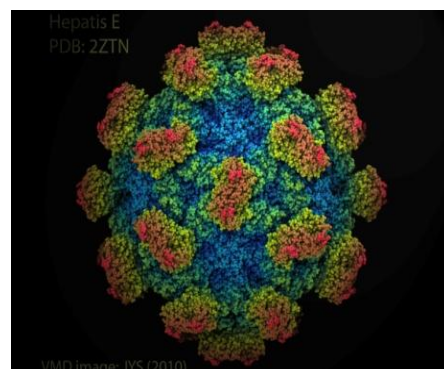
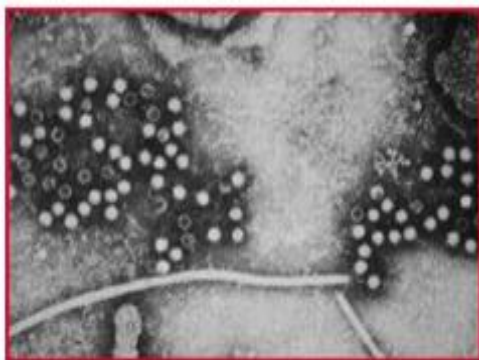


Figura 1. Fotografías del VHE.

Fuente: www.cdc.gov, Control Disease Center, Centro de Control de Enfermedades de EUA.

Este genoma posee varias regiones (fig. 2), comenzando desde el extremo 5', los primeros 27 nucleótidos, constituyen una región no codificante (NTR), que posee una compleja estructura secundaria en forma de horquilla (Huang y col. 1992a). La secuencia 5'NTR, junto a una secuencia conservada de 58 nucleótidos en ORF1 y una región central homóloga a alfavirus se considera que juegan un papel importante en la replicación y la transcripción del genoma del VHE.

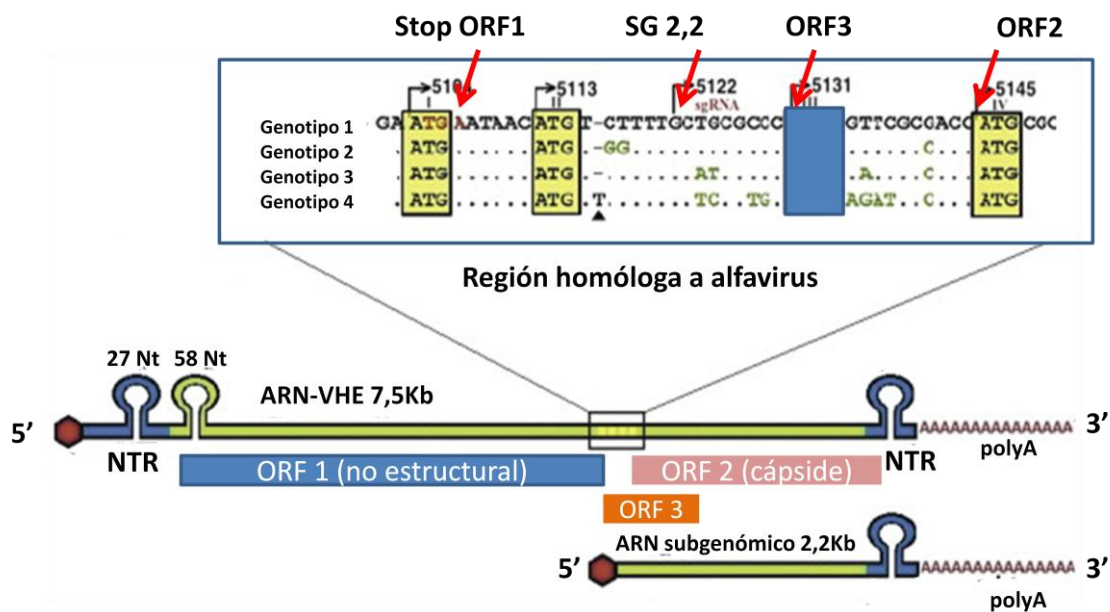


Figura 2. Organización del genoma del VHE con los 3 marcos de lectura abierta (ORFs) y la región homóloga a alfavirus con los codones de parada (stop) de ORF1 y los de inicio de ORF2 y ORF3 y la posición de inicio (SG 2,2) del ARN subgenómico que actúa como transcrito para ORF2 y ORF3.

El genoma del VHE contiene tres regiones de lectura abierta (ORFs) (Tam y col. 1991), que se distribuyen de la siguiente forma:

- ORF 1 (nucleótidos 28-5107): es el fragmento más extenso y posee una longitud de 5 Kb. Existe una gran heterogeneidad en esta región cuando se comparan las secuencias de distintos aislados del VHE (Fry y col. 1992). Esta región codifica una poliproteína de 1693 aminoácidos que posteriormente dará lugar a proteínas no estructurales involucradas en la replicación y procesamiento de partículas víricas. Estas proteínas son:

- ARN-polimerasa ARN dependiente.
- ARN helicasa.
- Cisteín proteasa (similar a la papaína).
- Metil transferasa.

Además contiene dos regiones denominadas dominios X e Y de función por el momento desconocida y una región hipervariable rica en prolina.

- ORF 2 (nucleótidos 5147-7127): se encuentra separado por 38 pb después del ORF1 en sentido 3'. Posee una longitud de 2 Kb y codifica la proteína estructural proORF2, que dará lugar a la cápside del virus. Esta proteína posee una longitud de 660 aminoácidos (88 KDa) y se expresa tanto a nivel intracelular como en la membrana celular. Es sintetizada en forma de precursor y posteriormente por una escisión de un péptido señal, pasa a una forma madura, la cual es capaz de autoensamblarse y glicosilarse (Khudyakov y col. 1993). A su vez, esta proteína presenta 3 dominios lineales (Xing y col. 2010; Mori y col. 2011): el dominio S, que forma la cápside, y los dominios M y P que se relacionan con la interacción virus-célula huésped (fig. 3). El dominio P queda expuesto al exterior y constituye un lugar de unión de anticuerpos neutralizantes y diana de alguna de las vacunas que están actualmente en desarrollo (Ahmad y col. 2011).

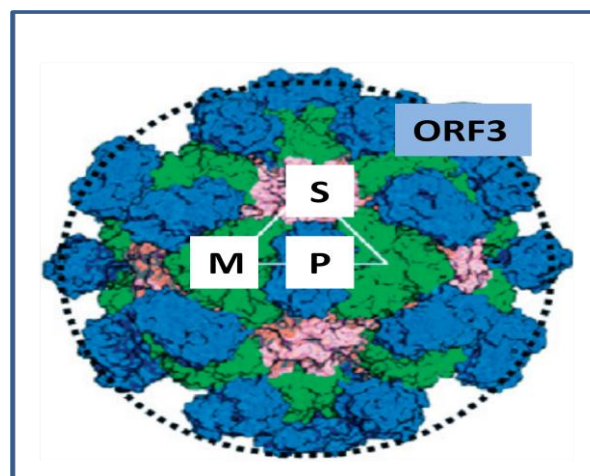


Figura 3. Localización de los dominios M, P y S en la partícula vírica y la posible localización de la proteína ORF3. El círculo en línea discontinua representa la capa lipídica que se genera de manera transitoria durante la salida del VHE (Modificado de Rodríguez Frias y col. 2012).

- ORF 3 (nucleótidos 7128-7497): posee una longitud de 369 pb. Este fragmento se solapa parcialmente con el ORF1 y el ORF2, comienza 1 nucleótido antes del final del ORF1 y se solapa con el ORF2 durante 368 pb. Codifica una fosfoproteína estructural de 123 aminoácidos que se expresa intracelularmente, se asocia con el citoesqueleto del hepatocito y no sufre modificaciones posteriores en su estructura. Varios estudios (Jameel 1999; Chandra y col. 2008b; Chandra y col. 2011) relacionan a esta proteína con la patogenicidad del VHE al estar involucrada en 3 procesos biológicos del hepatocito (fig. 4):

A) **Promoción de la supervivencia celular** mediante reducción de la despolarización mitocondrial e inhibición de la muerte celular intrínseca (Moin y col. 2007).

B) **Modulación de la respuesta en la fase aguda:** la proteína ORF3 actúa sobre varios tipos de endosomas así como en los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), lo cual provoca una reducción en el transporte nuclear del factor de transcripción pSTAT3, el cual resulta decisivo para la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria celular que se produce en la fase aguda. Todo esto genera un ambiente favorable para la replicación vírica (Chandra y col. 2008a).

C) **Inmunosupresión:** la proteína ORF3 promueve la secreción de α 1-microglobulina, una proteína inmunosupresora que podría actuar en el ambiente celular próximo a la célula infectada (Tyagi y col. 2004).

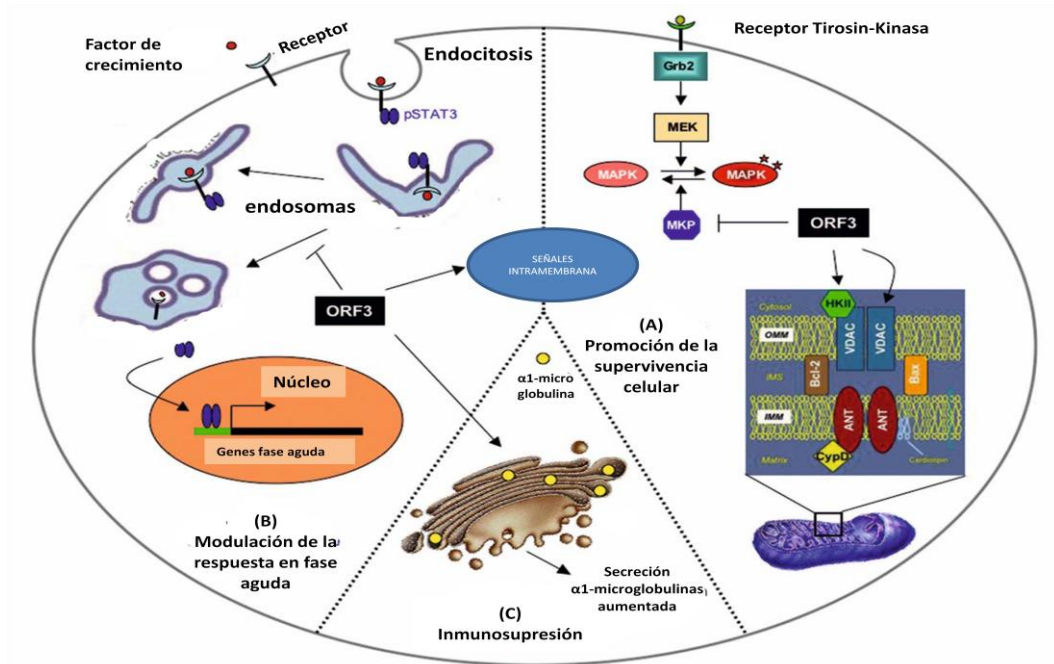


Figura 4. Papel de la proteína ORF3 en la patogénesis del VHE.
(Modificado de Chandra y col. 2008).

1.1.2. Replicación del VHE.

A continuación se describe el ciclo de replicación del VHE propuesto por varios autores (Chandra y col. 2008b; Meng 2010; Ahmad y col. 2011) compuesto por varias etapas (fig. 5):

- a) El VHE se fija a la superficie celular interaccionando con receptores HSPG, HSC70 y otros receptores de membrana.
- b) La partícula vírica entra en la célula por procedimientos específicos desconocidos hasta el momento. Las proteínas HSP90 y Grp78 podrían estar involucradas en este proceso (Meng y col. 2012). En este punto el virión libera la cadena de ARN vírico en el citoplasma celular.

- c) Se produce la traducción a partir del ARN de la poliproteína no estructural ORF1 en el citoplasma.
- d) Una ARN polimerasa ARN-dependiente del VHE sintetiza un intermediario de polaridad negativa a partir de la cadena de ARN de polaridad positiva.
- e) El intermediario sintetizado en la fase anterior sirve de molde para la síntesis de copias de ARN vírico de polaridad negativa.
- f) Las proteínas ORF2 y ORF3 son traducidas en el citoplasma.
- g) La proteína de la cápside ORF2 junto con copias de ARN se ensamblan para formar nuevas partículas víricas.
- h) Los nuevos viriones formados son transportados hasta la membrana celular. La proteína ORF3 facilita todo el proceso.
- i) Las nuevas partículas víricas son liberadas al medio y abandonan la célula.

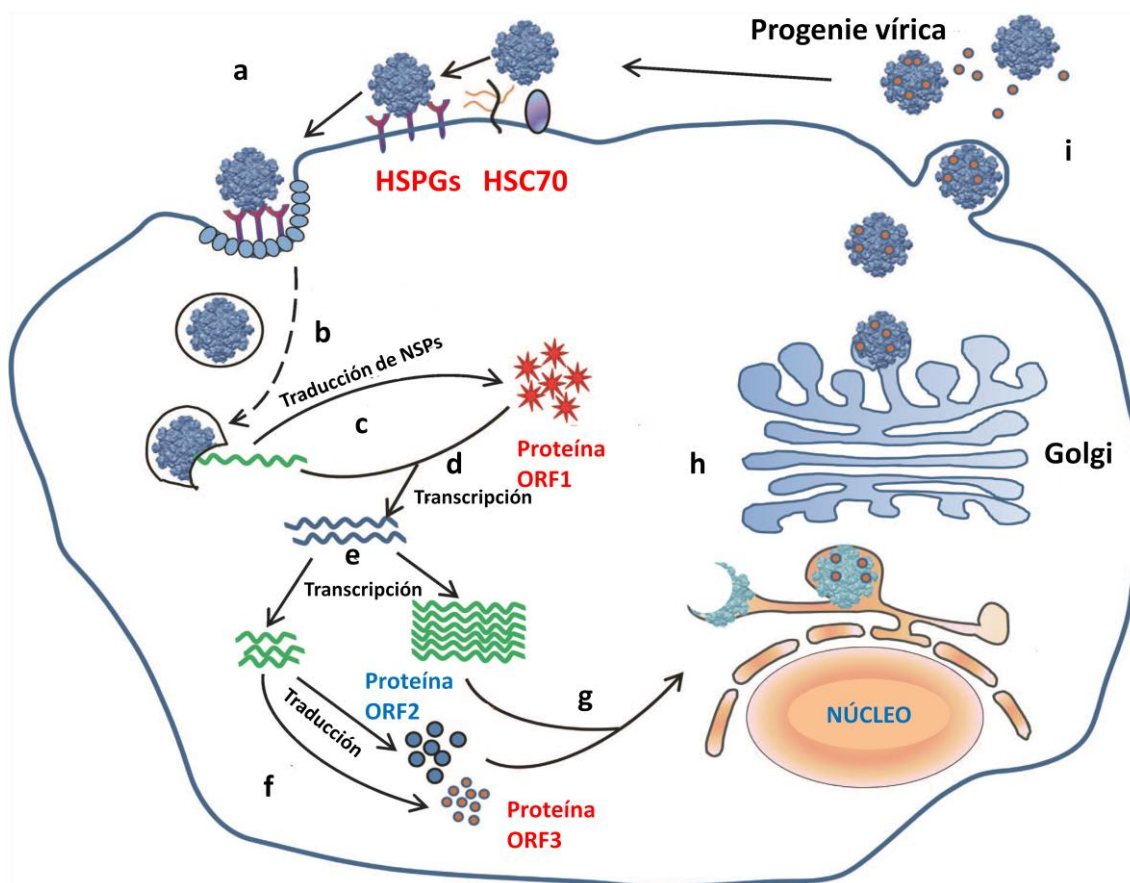


Figura 5: Ciclo de replicación del VHE.

Fuente: Cao y col. 2012.

1.1.3. Clasificación filogenética.

Debido a su similitud estructural y propiedades bioquímicas se clasificó inicialmente al VHE dentro de la familia *Caliciviridae*, género *Calicivirus* (Berke y col. 1997), pero tras posteriores análisis filogenéticos de las regiones que codifican para la helicasa y la polimerasa, se clasificó en un grupo provisional denominado "*HEV-like*" (Berke y col. 2000). Actualmente, según el 9º informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), el VHE se encuentra dentro de una familia denominada *Hepeviridae* como único integrante del género *Hepevirus* (Meng y col. 2012b).

Todos los virus dentro del género *Hepevirus* afectan a mamíferos y han sido identificados en multitud de especies (Tabla 1). Sin embargo, la reciente identificación filogenética de cepas de VHE en otras especies animales como trucha (Batts y col. 2011) y murciélago (Drexler y col. 2012), en las cuales

no se había detectado el virus anteriormente, así como la existencia de cepas de VHE en aves con baja similitud nucleotídica con cepas aisladas en mamíferos, hacen necesaria una nueva revisión de la clasificación del VHE (Meng 2013).

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; Tsarev y col. 1999), siendo la más aceptada la que distribuye el VHE en 4 genotipos principales, cuya distribución se muestra en la figura 6 (Purcell y col. 2008).

Por otra parte, no existe consenso en cuanto a la clasificación de estos genotipos en subtipos. Lu y col., en 2005 realizaron un análisis filogenético comparando distintos fragmentos del genoma de un total de 421 aislados del VHE, y han clasificado los 4 genotipos principales de VHE en los diferentes subtipos.

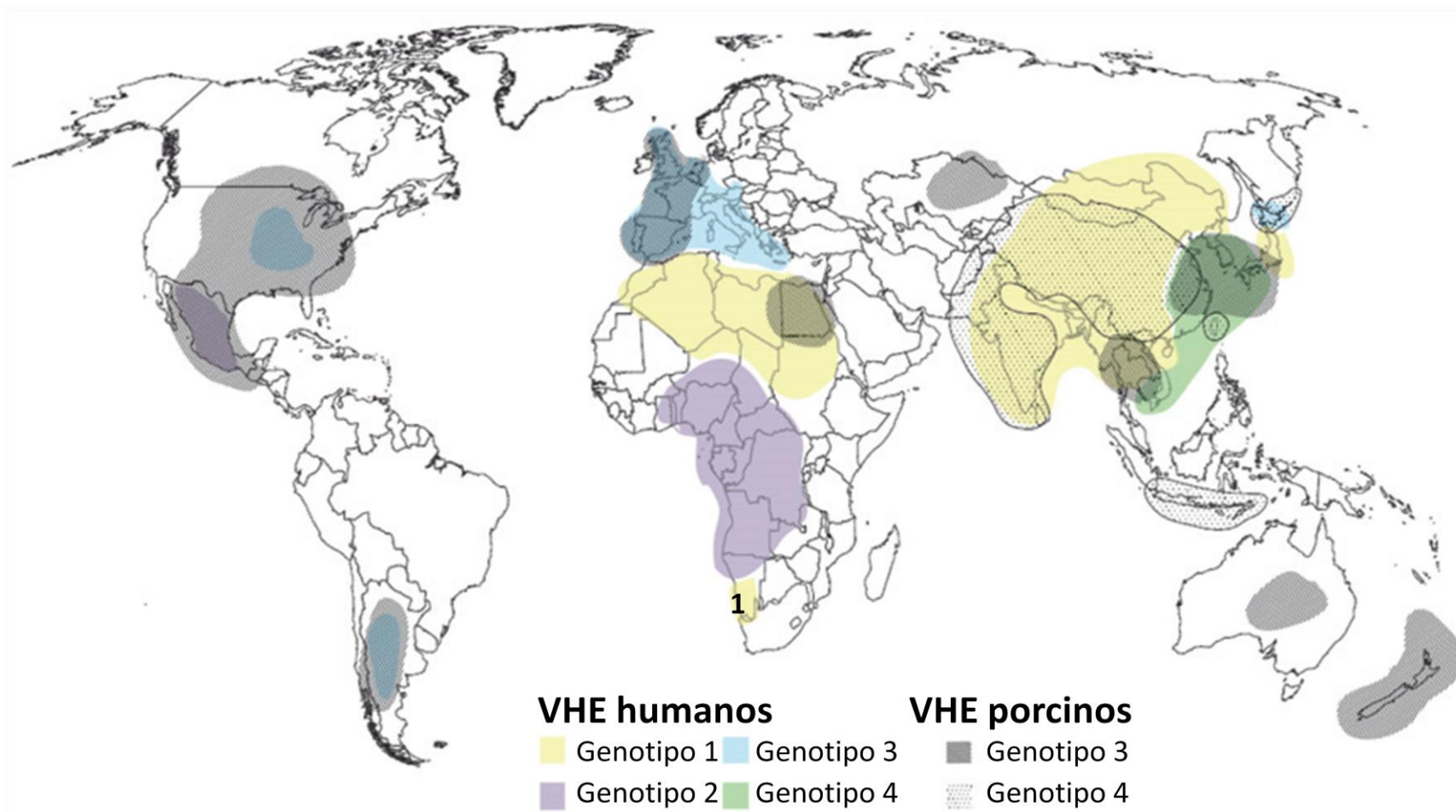


Figura 6. Distribución mundial de los genotipos del VHE en porcino y en humanos. (Rodríguez-Frias y col. 2012).

Así, en la actualidad el VHE está clasificado en los siguientes genotipos y subtipos:

I. GENOTIPO 1

Se divide en 5 subtipos, todos ellos de origen humano con la excepción de unas cepas aisladas en caballos en Egipto.

- 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 Asia (Aye y col. 1992; Aye y col. 1993; Panda y col. 1995; Gouvea y col. 1997; Gouvea y col. 1998; Aggarwal y col. 1999; Arankalle y col. 1999b; Panda y col. 2000; Garkavenko y col. 2001; Jameel y col. 2002; Takahashi y col. 2002a; Shrestha y col. 2003; Shrestha y col. 2004; Chandra y col. 2012a), además de la cepa hallada en aguas residuales de Barcelona (Pina y col. 1998).

- SUBTIPO 1b

Es el subtipo predominante identificado en las epidemias sufridas en China (Aye y col. 1992b). Se ha encontrado en Pakistán (Cuyck-Gandre y col. 2000), Bangladesh (Drabick y col. 1997a) y Haití (Alavian 2010). 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). También encontramos cepas aisladas en Cuba (Villalba y col. 2008).

- SUBTIPO 1c

Este subtipo se ha encontrado en pacientes con hepatitis esporádica de India (Chandra y col. 2012b) y China (Chatterjee y col. 1997; Wang y col. 1999; Wang y col. 2001b; Lu y col. 2004). Además, fue el responsable de la epidemia de 1987 de Kyrgyzstan (Usmanov y col. 1991b).

- SUBTIPO 1d

Se ha identificado en Marruecos (Chatterjee y col. 1997b; Meng y col. 1999a) y Argelia (Cuyck-Gandre y col. 1997)

- SUBTIPO 1e

En este subtipo se agrupan cepas humanas de distintas áreas del centro, norte y sur del continente africano (Cuyck-Gandre y col. 1997; van y col. 2003; Grandadam y col. 2004) y cepas equinas halladas en Egipto (Saad y col. 2006). En España se aisló una cepa perteneciente a este 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.

- SUBTIPO 2a

Está integrado por la cepa prototipo mexicana (Huang y col. 1992a).

- SUBTIPO 2b

Comprende cepas de hepatitis esporádica procedentes de pacientes de diferentes países de África (Buisson y col. 2000; Maila y col. 2004).

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. Según el análisis filogenético realizado por Takahashi en 2003, algunas cepas porcinas de Japón se encuentran estrechamente relacionadas con cepas porcinas de EEUU, posiblemente por importación de cerdos infectados desde los Estados Unidos (Takahashi y col. 2003b). En este subtipo se incluyen cepas aisladas recientemente de mangosta (Nidaira y col. 2012).

- SUBTIPO 3b

Las cepas de VHE pertenecientes a este subtipo se han identificado en Japón, China y Canadá. En él se incluyen aislados humanos y porcinos (Takahashi y col. 2003a), así como otros hallados en un hígado de jabalí, en carne de ciervo (Takahashi y col. 2004) y en mangosta (Nidaira y col. 2012).

- SUBTIPO 3c

Se compone de cepas porcinas y humanas aisladas en Francia (Renou y col. 2011; Rose y col. 2011), Alemania (Wenzel y col. 2011) y 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. 2004a), 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). Además se aislaron cepas procedentes de jabalí en Japón y Tailandia (Sato y col. 2011; Wiratsudakul y col. 2012).

- SUBTIPO 3f

En este subtipo se encuentran cepas españolas entre las que se incluyen aislados de hepatitis E humanas autóctonas como el Sp3 (Pérez-Gracia y col. 2004), 77HRC y 941HRC (Pérez-Gracia y col. 2007) y las cepas VH1 y VH2 (Buti y col. 2004). Además, también comprende las cepas identificadas en granjas porcinas de la Comunidad Valenciana (SPSWFCV1 hasta 33) (Fernández-Barredo y col. 2006), aguas residuales de Barcelona (BCN2 hasta BCN16) (Clemente-Casares y col. 2003) y en aguas residuales de matadero porcino (E11) (Pina y col. 2000).

También pertenecen a este subtipo cepas aisladas en Japón (Mateos Lindermann y col. 2010), Tailandia (Keawcharoen y col. 2013), Francia (Luciano y col. 2012) y Nueva Caledonia (Kaba y col. 2011).

- 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).

- SUBTIPO 3h

Se aislaron cepas de origen humano en Italia (Schalaunder y col. 1999), Uruguay (Mirazo y col. 2013) y Nueva Zelanda (Garkavenko y col. 2001).

- SUBTIPO 3i

Este subtipo aglutina cepas de origen humano aisladas en Argentina (Schlauder y col. 2000), Bolivia (Dell'Amico y col. 2011), Uruguay (Mirazo y col. 2013) y Austria (Worm y col. 2000).

- SUBTIPO 3j

Cepas pertenecientes a este subtipo se aislaron en humanos en Canadá (Pei y col. 2002), Australia y México (Ward y col. 2008).

IV. GENOTIPO 4

Compuesto por cepas porcinas y humanas, aisladas en el continente asiático y cepas humanas aisladas en Italia, tratándose de un probable brote de hepatitis E esporádica importada (Garbuglia y col. 2013), y de cepas aisladas en ganado porcino en Bélgica (Hakze-van der Honing RW y col. 2011), lo que hace suponer que este genotipo está actualmente diseminándose por Europa.

Se divide en 5 subtipos:

- SUBTIPO 4a

Comprende cepas humanas y porcinas de China (Wang y col. 2002) y Taiwán (Hsieh y col. 1999).

- SUBTIPO 4b

En este subtipo se ha identificado una cepa porcina de Bali (Wibawa y col. 2004a), así como cepas porcinas y humanas japonesas (Koizumi y col. 2004), y cepas porcinas aisladas en Bélgica (Hakze-van der Honing RW y col. 2011).

También corresponden a este subtipo cepas humanas aisladas en Indonesia (Wibawa y col. 2007) y Vietnam (Koizumi y col. 2004).

- SUBTIPO 4c

A este subtipo pertenecen cepas tanto humanas como porcinas, detectadas en Japón y en 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).

También se incluye en este subtipo una cepa de VHE en Japón, aislada de jabalí (Sato y col. 2011).

- SUBTIPO 4d

Está integrado por cepas humanas y porcinas aisladas en China (Wang y col. 2000) y por la cepa aislada en Italia que afectó a un grupo de 5 pacientes (Garbuglia y col. 2013).

- SUBTIPO 4e

En él se encuentran únicamente cepas humanas y porcinas aisladas en la India (Arankalle y col. 2002; Begum y col. 2010).

- SUBTIPO 4f

Compuesta por cepas humanas aisladas en Japón , Vietnam (Hijikata y col. 2002) y una cepa humana aislada en Alemania (Wichmann y col. 2008).

- SUBTIPO 4g

Incluye cepas humanas aisladas en China (Liu y col. 2003).

Tabla 1: Clasificación en Genotipos y Subtipos de cepas de VHE aisladas en diferentes especies animales.

GENOTIPO	SUBTIPO	ORIGEN	PAÍS	REFERENCIA
1	a	Humano, aguas residuales	India, Pakistan, Vietnam, Japón, Burma, Nepal, España.	(Aye y col. 1992; Aye y col. 1993; Panda y col. 1995; Gouvea y col. 1997; Gouvea y col. 1998; Pina y col. 1998; Aggarwal y col. 1999; Arankalle y col. 1999b; Panda y col. 2000; Garkavenko y col. 2001; Jameel y col. 2002; Takahashi y col. 2002a; Shrestha y col. 2003; Shrestha y col. 2004; Chandra y col. 2012a)
	b	Humano	China, Bangladesh, Pakistán, Haití, Cuba.	(Tsarev y col. 1992; Aye y col. 1992; Yin y col. 1994; Bi y col. 1994; Drabick y col. 1997; Cuyck-Gandre y col. 2000; Schlauder y col. 2001; Vaidya y col. 2002; Villalba y col. 2005)
	c	Humano	China, Japón, India, Kyrgyzstan, Uzbekistán.	(Chatterjee y col. 1997; Wang y col. 1999; Wang y col. 2001b; Lu y col. 2004; Chandra y col. 2012a)
	d	Humano	Algeria, Marruecos.	(Cuyck-Gandre y col. 1997; Chatterjee y col. 1997; Meng y col. 1999b)
	e	Humano, caballo	Namibia, Egipto, Sudán, Chad, Djibouti, Algeria, España.	(Buti 1996; Cuyck-Gandre y col. 1997; Tsarev y col. 1999; He y col. 2000; van Cuyck y col. 2003; Grandadam y col. 2004; Buti y col. 2004; Saad y col. 2006)
2	a	Humano	México.	(Huang y col. 1992)
	b	Humano	Nigeria, Chad, República Central Africana, República Democrática del Kongo, Egipto, Namibia.	(Buisson y col. 2000; Maila y col. 2004)

GENOTIPO	SUBTIPO	ORIGEN	PAÍS	REFERENCIA
3	a	Humano, cerdo, mangosta, aguas residuales	EEUU, España, Japón, Korea, Holanda, China, Cuba, Alemania, Canada.	(Erker y col. 1999; Mizuo y col. 2002; Takahashi y col. 2002b; Tokita y col. 2003; Yazaki y col. 2003a; Yamamoto y col. 2004; Sainokami y col. 2004; Ward y col. 2008; Wenzel y col. 2011; Nidaira y col. 2012; Nakano y col. 2012b; Lu y col. 2013)
	b	Humano, cerdo, jabalí, ciervo, mangosta	Japón, China, Canada.	(Mizuo y col. 2002; Tei y col. 2003; Takahashi y col. 2003a; Takahashi y col. 2004; Tamada y col. 2004; Ward y col. 2008; Nakano y col. 2012; Nidaira y col. 2012; Lu y col. 2013)
	c	Humano, cerdo	Holanda, Francia, Alemania.	(van der Poel y col. 2001; Rose y col. 2011; Renou y col. 2011; Wenzel y col. 2011)
	d	Cerdo	Taiwan.	(Wu y col. 2002)
	e	Humano, cerdo, jabalí, aguas residuales	Grecia, Francia, España, Reino Unido, Japón, Tailandia.	(Schlauder y col. 1999; Okamoto y col. 2001; Wang y col. 2001a; Yajima y col. 2003; Clemente-Casares y col. 2003; Banks y col. 2004a; Rose y col. 2011; Nakano y col. 2012a; Wiratsudakul y col. 2012; Nakano y col. 2012)
	f	Humano, cerdo, aguas residuales	España, Japón, Grecia, Holanda, Francia, Reino Unido, Nueva Caledonia, Tailandia.	(Clemente-Casares y col. 2003; Buti y col. 2004; Pérez-Gracia y col. 2007; Mateos Lindemann y col. 2010a; Rose y col. 2011; Kaba y col. 2011; Luciano y col. 2012; Keawcharoen y col. 2013)
	g	Cerdo	Kyrgyzstán.	(Lu y col. 2004)
	h	Humano, cerdo	Italia, Nueva Zelanda, Uruguay.	(Schlauder y col. 1999; Garkavenko y col. 2001; Mirazo y col. 2013)
	i	Humano, cerdo	Argentina, Austria, Bolivia, Uruguay.	(Schlauder y col. 2000; Worm y col. 2000; Dell'Amico y col. 2011; Mirazo y col. 2013)
	j	Humano, cerdo	Canada, Australia, México.	(Pei y col. 2002; Ward y col. 2008)

GENOTIPO	SUBTIPO	ORIGEN	PAÍS	REFERENCIA
4	a	Humano, cerdo	China, Taiwán	(Hsieh y col. 1999; Wang y col. 2002)
	b	Humano, cerdo	China, Japón, Indonesia, Vietnam, Taiwán, Bélgica.	(Wang y col. 2000; Hijikata y col. 2002; Koizumi y col. 2004; Wibawa y col. 2004; Hakze-van der Honing RW y col. 2011)
	c	Humano, cerdo, jabalí	China, Japón.	(Yazaki y col. 2003; Sato y col. 2011)
	d	Humano, cerdo	China, Italia.	(Wang y col. 2000; Garbuglia y col. 2013)
	e	Humano, cerdo	India.	(Arankalle y col. 2002; Arankalle y col. 2003; Begum y col. 2010)
	f	Humano	Japón, Vietnam, Alemania.	(Hijikata y col. 2002; Wichmann y col. 2008)
	g	Humano	China.	(Wang y col. 2000; Liu y col. 2003)

1.2. EPIDEMIOLOGÍA.

1.2.1. Historia de la enfermedad.

La primera epidemia atribuida al VHE se produjo en 1955 (Viswanathan y col. 1957) en Nueva Delhi (India) cuando alrededor de 30.000 personas enfermaron de una supuesta hepatitis A tras el consumo de agua contaminada, pero no fue hasta 1980, tras analizar los sueros de personas afectadas durante esta epidemia, cuando se observó que éstos no reaccionaban frente a los antígenos del virus de la hepatitis A (VHA) (Khuroo 1980; Wong y col. 1980), atribuyéndose esta epidemia a un nuevo agente etiológico que se denominó VHE.

En 1983 se infectó experimentalmente a un voluntario mediante la ingesta de una mezcla de extractos obtenidos de un individuo que sufrió la enfermedad en una epidemia en 1955 en Kyrgystzan (Balayan y col. 1983). Ello permitió identificar al agente infeccioso responsable mediante microscopia electrónica, observándose la existencia de partículas víricas de 27-34 nm en las heces de individuos afectados que no reaccionaban frente a sueros de pacientes con hepatitis A o B.

En 1988, se aislaron partículas de 32 nm de diámetro en individuos de zonas geográficamente distantes, afectados todos ellos de hepatitis no A no B, dichas partículas además reaccionaron con los sueros de individuos de otras zonas afectados por el mismo tipo de hepatitis (Bradley y col. 1988). En 1989 se logró infectar a monos macacos cinomolgos (Krawczynski y col. 1989).

En 1990, se puso de manifiesto la presencia de ARN del VHE en muestras clínicas de individuos afectados en Birmania, México, Somalia y Pakistán (Reyes y col. 1990). También se realizó la infección experimental en cerdos logrando la excreción del virus en las heces (Balayan y col. 1990; Usmanov y col. 1991a). Este nuevo agente fue denominado virus de la hepatitis E. La elección de la letra "E" se debió a que ya habían sido identificados los virus

de la hepatitis A, B, C y D y además hacía referencia a las características entéricas, endémicas y epidemiológicas de la enfermedad.

En 1996, se aisló de un individuo estadounidense sin historial de viaje al extranjero una cepa diferente a las demás (Schlauder y col. 1998). Este hecho unido a la aparición de gran número de casos de hepatitis E en países desarrollados considerados no endémicos como Holanda (Zaaijer y col. 1992), Japón (Paul y col. 1994) y España (Buti y col. 1995), hizo pensar en la existencia de reservorios animales, por lo que se realizaron numerosos estudios de seroprevalencia en diferentes especies animales como cerdos (Meng y col. 1999b; Arankalle y col. 2001; Reinhardt y col. 2003; Choi y col. 2003; Banks y col. 2004b; Fernández-Barredo y col. 2006), aves de corral (Huang y col. 2002b; Sun y col. 2004) y roedores (Karetnyi y col. 1993; Favorov y col. 2000; He y col. 2002).

En 1997, se aisló la primera cepa de VHE de origen porcino en Estados Unidos (Meng y col. 1997), con sólo un 74% de similitud en la secuencia de nucleótidos cuando se comparó con las cepas clásicas aisladas de Burma y México, pero con una similitud del 90% comparándola con los aislados humanos de la misma región. A partir de ese momento, muchos han sido los casos en los que se han aislado cepas porcinas en países industrializados, entre ellos España (van der Poel y col. 2001; Clemente-Casares y col. 2003; Fernández-Barredo y col. 2006), Holanda (van der Poel y col. 2001) y Reino Unido (Banks y col. 2004b) entre otros.

1.2.2. Formas de presentación.

1.2.2.1. Presentación epidémica.

Esta forma de presentación se debe a la ingesta de agua contaminada con materia fecal (Balayan y col. 1983; Rab y col. 1997) tras desastres naturales tales como inundaciones o bien por hacinamiento de personas en campos de refugiados en países subdesarrollados con deficiencias higiénico-sanitarias.

Históricamente se había considerado la infección por VHE endémica en India, Asia central, África y México. Actualmente, según el Centro de Control de Enfermedades (CDC), un 40% de las hepatitis víricas agudas en la India son causadas por el VHE. El primer brote epidémico ocurrió en Nueva Delhi en 1955, el que más afectados causó se produjo en Xinjiang (China) con más de 119.000 afectados (Huang y col. 1992b) y el más reciente ocurrió en Sudán (Kmush y col. 2013). En la tabla 2 se detallan diferentes brotes epidémicos ocurridos desde 1955 hasta la actualidad (Kmush y col. 2013).

Tabla 2. Brotes epidémicos de hepatitis E y número de afectados en cada epidemia.
(N.D.: no determinado)

LUGAR	AÑO	AFECTADOS
Nueva Delhi	1955	29.000
Kirguistán	1955	10.812
Katmandú, Nepal	1973	1.000
Ahmedabán, India	1975	2.572
Madalay, Myanmar	1976	20.000
San José, Costa Rica	1976	5
Kashmir, India	1978	52.000
Pune, India	1978	N.D.
Algeria	1980	788
Qatar	1981	91
Katmandú, Nepal	1981	6.000
Rangún, Myanmar	1982	399
URSS	1982	N.D.
Costa de Marfil	1983	623
Sudán	1985	2.012
Somalia	1986	2.000
Karachi, Pakistán	1986	N.D.
México	1986	94
Xinjiang, China	1986	119.280
Karnal, India	1987	1.273
Sargodha, Pakistán	1987	133
Katmandú, Nepal	1987	370
Borneo, Indonesia	1987	2.000
Kirguistán	1987	N.D.
Somalia	1988	11.413
Yamunanagar, India	1989	N.D.
Etiopía	1989	6.000
Kanpur, India	1990	79.000
Kenia	1991	1.700
Saharampur, India	1991	3.682
Meerut, India	1992	N.D.
Darfur, Sudán	1996	11.277
Chad	2004	1.442
Bagdad, Irak	2004	60
Katmandú, Nepal	2006	55
Uganda	2008	3.218
Maharastra, India	2012	255
Kenia	2012	339
Sudán	2013	6.107

1.2.2.2. Presentación esporádica.

Esta forma de presentación representa el 1% de las hepatitis víricas agudas en países no endémicos, mientras que en países endémicos como la India, el 50-70% de las hepatitis víricas son causadas por el VHE. Además, cabe resaltar que en la India un 70% de las infecciones causadas por este virus ocurre en niños y de éstas, el 80% ocurre de forma esporádica. Del total de las infecciones pediátricas, un 80% son debidas a la ingesta de agua contaminada y un 20% debidas a alimentos contaminados (Tomar 1998).

En los países desarrollados se presenta la enfermedad de forma esporádica (fig. 7). En la mayoría de los casos se atribuye a pacientes que han viajado a zonas endémicas (Dawson y col. 1992; Fletcher 1993; Chapman y col. 1993; Skaug y col. 1994; Khuroo 2003) o bien debido a casos importados por inmigrantes (Tarrago y col. 2000; Sadler y col. 2006). Sin embargo, cada vez se han descrito más casos en pacientes que no han viajado a zonas endémicas (hepatitis autóctonas), en países considerados no endémicos como España (Jardi y col. 1993; Sanchez y col. 2002; Pérez-Gracia y col. 2004; Buti y col. 2004; Mateos y col. 2005), Italia (Zanetti y col. 1999; La y col. 2011; Garbuglia y col. 2013), Francia (Epelboin y col. 2011) y Reino Unido (Dalton y col. 2007; Crossan y col. 2012) entre otros.

En estos países, el ganado, particularmente el porcino, es el reservorio del VHE (Banks y col. 2004b; Tolari y col. 2006; Fernández-Barredo y col. 2007; Caprioli y col. 2007; Galiana y col. 2010; Pérez-Gracia y col. 2012) y se cree que actúa como fuente de diseminación principalmente mediante los purines.

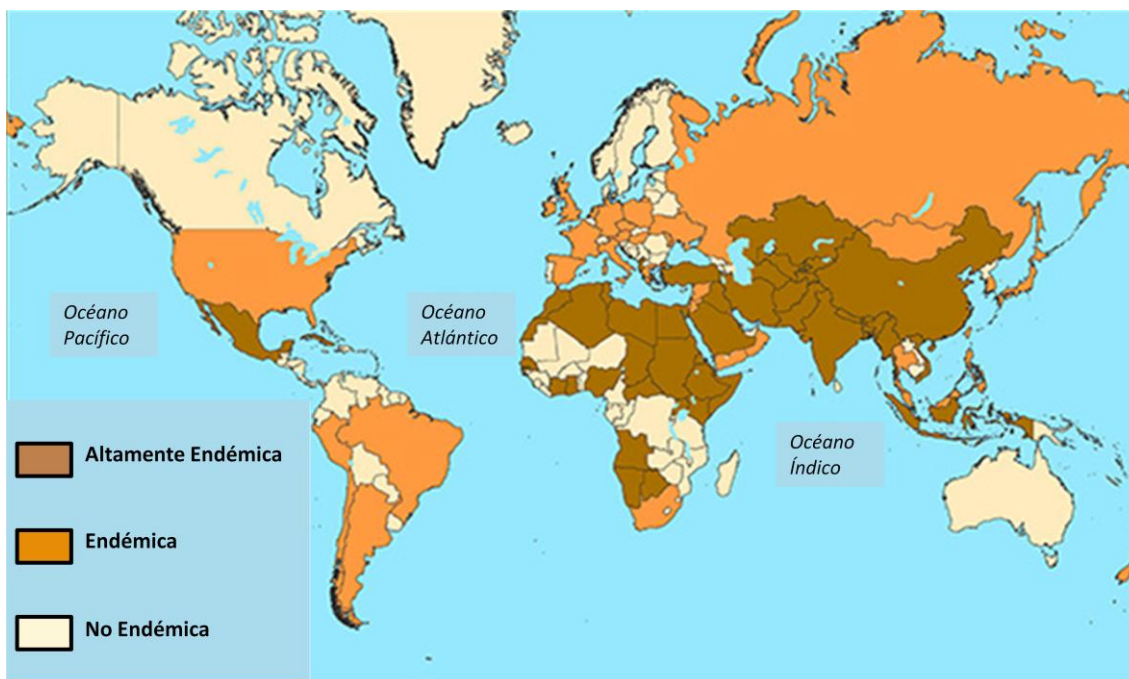


Figura 7. Distribución geográfica de la hepatitis E. En marrón, áreas donde más del 25% de las hepatitis no A no B son debidas al VHE. En naranja, zonas que presentan casos esporádicos.

Fuente: www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset. Control Disease Center, Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos.

1.2.3. Vías de transmisión.

Las vías de transmisión siguen siendo aún hoy en día, uno de los aspectos más controvertidos de la hepatitis E, con marcadas diferencias en las distintas áreas geográficas.

1.2.3.1. Transmisión oral-fecal.

Es la vía de transmisión responsable de la mayoría de brotes epidémicos descritos hasta la fecha, en concreto por bebida de agua contaminada con materia fecal, constituyendo la forma de transmisión más probable del VHE. Estos brotes suelen estar asociados a inundaciones y lluvias torrenciales que mezclan aguas de consumo humano con aguas residuales humanas y de animales. En este sentido, se documentó una epidemia en Somalia que afectó a 11.413 individuos distribuidos en 142 pueblos que estaban situados cerca del río. Estos individuos presentaron hepatitis icterica y murieron 146

personas. De las personas fallecidas, un 13,8% fueron mujeres embarazadas (Bile y col. 1994).

La aparición repetida de brotes sin un desastre natural previo sugiere una contaminación continuada de las fuentes de agua para el consumo, tal y como se ha documentado en la India (Aggarwal y col. 2000a), China, Vietnam e Indonesia (Zhuang y col. 1991; Corwin y col. 1995; Hau y col. 1999).

1.2.3.2. Transmisión vertical.

La infección "*in utero*" por el VHE en humanos ha sido descrita en varios estudios (Kumar y col. 2001; Singh y col. 2003; Khuroo y col. 2009). En un 66% de los casos en los que se produce la transmisión del VHE durante el embarazo, se producen partos prematuros así como un aumento en la probabilidad de muerte perinatal (Khuroo y col. 1995). Diferentes estudios describen tasas de transmisión madre-hijo que varían entre el 23,3 y el 50% (Kumar y col. 2001; Kumar y col. 2004).

1.2.3.3. Transmisión por contacto directo.

Parece que este tipo de transmisión es poco significativa, tal y como se describe en varios estudios llevados a cabo en zonas de hepatitis esporádica, en los cuales de 86 contactos intrafamiliares analizados, en sólo 2 casos se produjo un contagio persona-persona (Somani y col. 2003). En otro estudio realizado durante una epidemia en Kudal (India), no se encontraron diferencias significativas entre las seroprevalencias de individuos con familiares afectados por VHE e individuos en cuyas familias no se encontraba ningún afectado (Arankalle y col. 2000). Una posible explicación a la baja tasa de transmisión sea que la baja cantidad de virus excretada en heces no sería suficiente para infectar a otra persona, aunque no existen estudios concluyentes al respecto.

1.2.3.4. Transmisión parenteral.

Existen varios estudios que demuestran esta vía de transmisión (Arankalle y col. 1999a; Matsubayashi y col. 2004; Colson y col. 2007a). Así, se ha demostrado la capacidad de transmisión parenteral del VHE tras la administración de 10 ml de sangre de un voluntario positivo a VHE a un mono Rhesus (Xia y col. 2004). En este sentido, existen autores que han detectado niveles más elevados de anticuerpos frente al VHE en pacientes en hemodiálisis que en individuos sanos (Lee y col. 2005; Kikuchi y col. 2006), aunque otros estudios (Kheradpezhohu y col. 2007), no reflejan este hecho.

En un estudio realizado en Francia, se ha descrito la posibilidad de contagio del VHE en prácticas quirúrgicas con cerdos (Colson y col. 2007b).

Recientemente, se sugirió la transmisión del VHE a un paciente de 81 años tras recibir una transfusión de sangre. Se detectó una elevada homología nucleotídica entre las cepas halladas en el donante y el receptor, el cual vivía en una región endémica para el VHE y era consumidor habitual de productos cárnicos derivados del cerdo (Haim-Boukobza y col. 2012).

1.2.3.5. Transmisión sexual.

No hay datos que demuestren esta vía de contagio (Chau y col. 2001; Christensen y col. 2002).

1.2.3.6. Transmisión por alimentos.

Han sido descritos varios casos de infección alimentaria tras la ingesta de carne cruda de ciervo (Tei y col. 2004), hígado crudo de jabalí (Matsuda y col. 2003) y carne cruda de cerdo (Melenhorst y col. 2007). En un estudio en el cual se analizaron productos de cerdo en carnicerías de EEUU, se detectó la presencia del VHE en 14 (11%) muestras de 127. Adicionalmente, tras la inoculación de homogeneizados de las muestras

positivas en cerdos, se demostró que el VHE era viable (Feagins y col. 2007), por lo que se pudo constatar que las partículas de VHE mantenían su potencial infeccioso.

En un reciente estudio en Francia, varios miembros de una familia resultaron infectados tras consumir carne de hígado de cerdo cruda, detectándose posteriormente una elevada homología genética entre las cepas de VHE aisladas de la carne y las cepas de VHE aisladas de los pacientes infectados (Colson y col. 2010). En Hungría, también se ha descrito un caso de transmisión de VHE por ingesta de embutido fresco de cerdo (Reuter y col. 2006), este aislado tenía una similitud nucleotídica del 95% con cepas europeas humanas y porcinas. Todos estos estudios parecen reforzar a esta vía de transmisión como una de las más significativas. Adicionalmente, en Alemania se identificaron cepas de VHE en hígados de cerdo comprados en carnicerías locales los cuales presentaban, de igual modo al descrito en trabajos anteriores, una elevada similitud nucleotídica de hasta el 99,2% con cepas aisladas de pacientes de la misma área geográfica con hepatitis aguda por VHE (Wenzel y col. 2011).

En 2008, se documentó un brote de hepatitis E aguda que afectó a 4 pasajeros de un crucero, la aparición de estos casos se relacionó con el consumo de marisco (Said y col. 2009).

El consumo de carne de caza, en concreto de jabalí, constituye también un riesgo de infección de VHE (Tamada y col. 2004; Masuda y col. 2005).

1.3. CLÍNICA.

La hepatitis E está considerada como una enfermedad emergente en países desarrollados, no obstante la prevalencia no ha aumentado en los últimos años (Lindemann y col. 2010; Pischke y col. 2011). El aumento de la incidencia se atribuye a la mejora en las técnicas moleculares de diagnóstico, a la mayor sospecha clínica y al mejor conocimiento de la enfermedad.

Además, hay que considerar que en países desarrollados, la mayoría de casos de hepatitis causados por VHE evolucionan de forma benigna asintomática o con sintomatología inespecífica, lo cual provoca que estos casos no formen parte de las estadísticas y pasen desapercibidos (Aggarwal 2011; Aggarwal 2012; Pérez-Gracia y col. 2012).

El periodo de incubación oscila entre 1 y 10 semanas (Mast y col. 1996; Smith 2001). Los síntomas clínicos son prácticamente indiferenciables de los producidos por una hepatitis causada por el VHA, aunque cursa con más severidad. Entre los síntomas más habituales destacamos ictericia, anorexia, hepatomegalia, acompañadas ocasionalmente con dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre (Worm y col. 2002).

Adicionalmente, las pruebas bioquímicas presentan valores alterados para la bilirrubina, con un aumento de bilirrubina sérica, niveles muy elevados de alanina-amino-transferasa (ALT), aspartato-amino-transferasa (AST) y gamma-glutamil-transferasa (GGT), así como un ligero aumento de la fosfatasa alcalina (Dienstag 1983).

Durante la infección aguda por el VHE, los anticuerpos de tipo IgM preceden a las IgG y aparecen al inicio de la sintomatología clínica, para disminuir a lo largo de los 4-5 meses siguientes (Pérez-Gracia y col. 2003). Los anticuerpos IgG aparecen tras las IgM y su título aumenta desde la fase aguda hasta la de convalecencia, pudiendo permanecer en niveles elevados de 1 a 4 años después de la fase aguda de la enfermedad. Los niveles de la ALT alcanzan 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. 2000b). La viremia se presenta también en la última fase de incubación, pero desaparece justo antes de las manifestaciones clínicas (Chauhan y col. 1993) (fig. 8).

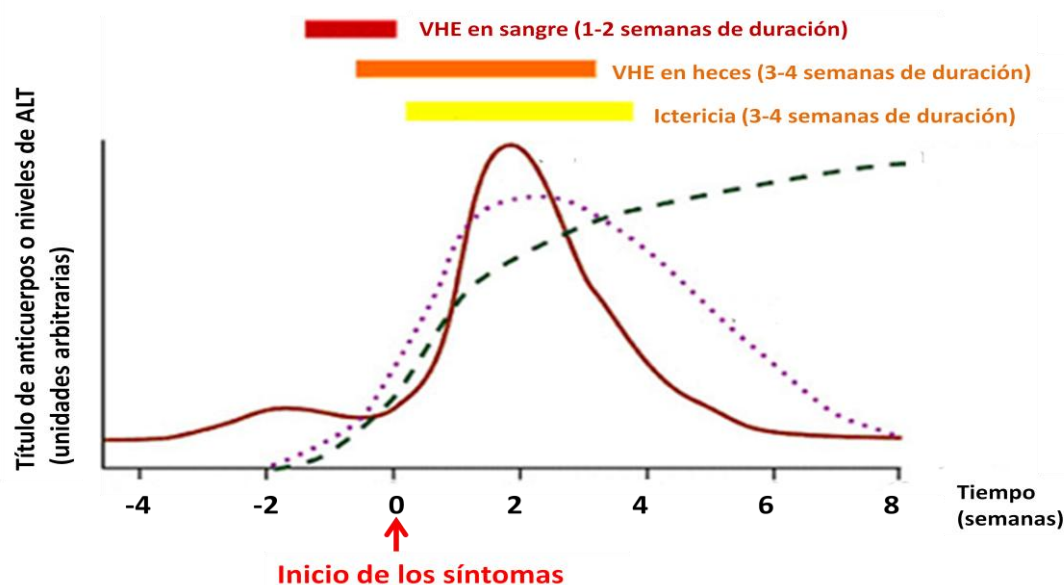


Figura 8. Evolución de la infección por el VHE. (Jameel 1999).

En la especie porcina, la única forma descrita 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 (Meng y col. 1998; Kasorndorkbua y col. 2002; Kasorndorkbua y col. 2003; Kasorndorkbua y col. 2004). Según dichos estudios, el comienzo de la excreción del VHE en heces es bastante precoz, observándose tan sólo 2 semanas tras la inoculación vía parenteral (fig. 9). La duración de la excreción es variable, observándose durante una media de 8 semanas. La viremia aparece entre las 5-6 semanas post-inoculación y tiene una permanencia media de dos semanas (Meng y col. 1998), mientras que la aparición de anticuerpos anti-VHE de clase IgM comienza sobre las 6 semanas tras la inoculación y tiene una duración media de 2 semanas. La aparición de los anticuerpos anti-VHE de clase IgG se produce aproximadamente a las 7 semanas postinoculación, 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. 1998).

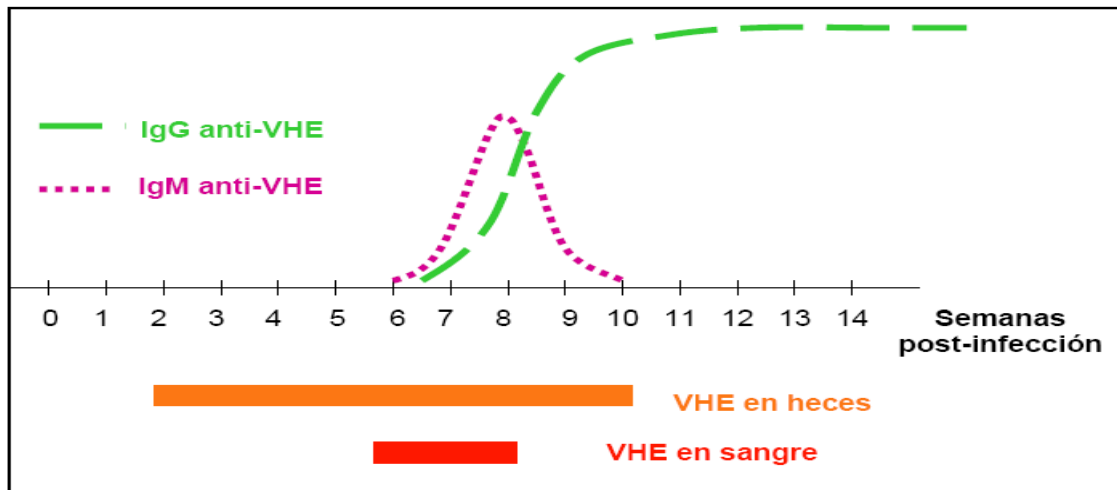


Figura 9. Evolución del VHE en cerdos.

Extraído de la tesis doctoral: Estudio epidemiológico y caracterización del VHE en granjas porcinas de la Comunidad Valenciana (Fernández-Barredo, S., Año 2007).

1.3.1. Hepatitis aguda.

La infección por VHE es la causa más frecuente de hepatitis aguda en países endémicos. Afecta principalmente a adultos jóvenes, la mayoría de las veces es autolimitante y con una baja tasa de mortalidad (0.07-0.6%) excepto en mujeres embarazadas en las que se alcanzan cifras de mortalidad de hasta el 25% (Khuroo y col. 2003). El periodo de incubación oscila entre 2 y 8 semanas (Smith 2001). La sintomatología es similar a la producida por el VHA pero cursa con más severidad. Entre los síntomas más habituales destacamos ictericia, anorexia, hepatomegalia, acompañadas ocasionalmente con dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre (Worm y col. 2002). La colestasis parece ser un rasgo típico de la hepatitis E, así como urticaria, ictericia persistente y niveles altos de fosfatasa alcalina durante varios meses (Aggarwal 2011), aunque los síntomas desaparecen gradualmente.

En raras ocasiones el VHE ocasiona síntomas extrahepáticos como pancreatitis, trombocitopenia, hemolisis y enfermedades autoinmunes como la púrpura de Henoch-Scholein o la glomerulonefritis membranosa (Aggarwal 2011). Las manifestaciones clínicas neurológicas son infrecuentes pero severas, en algún caso se ha aislado al VHE (genotipo 3), del líquido

cefalorraquídeo de pacientes con trasplante renal con alteraciones del sistema central y periférico (Kamar y col. 2010c).

1.3.2. Hepatitis fulminante.

Consiste en una complicación seria de la hepatitis icterica aguda que se caracteriza por una masiva necrosis hepatocelular. Se desconocen los mecanismos exactos por los que se produce hepatitis fulminante en un porcentaje tan elevado. En países endémicos de esta infección, destaca la alta tasa de hepatitis fulminante en mujeres embarazadas ocasionando una mortalidad muy elevada (Pérez-Gracia y col. 2012). Recientes estudios sugieren que en mujeres embarazadas la hepatitis E evoluciona en un alto número de casos hasta el fallo hepático, a partir de este momento la mortalidad se equipara a la alcanzada por fallos hepáticos de causa no vírica (Bhatia y col. 2008). Se desconocen los mecanismos exactos por los que se produce hepatitis fulminante en un porcentaje tan elevado en mujeres embarazadas.

En países desarrollados han aparecido casos de hepatitis fulminante en los últimos años (Perón y col. 2007; Lindemann y col. 2010), acompañados en la mayoría de casos por otras patologías hepáticas que se cree que evolucionan hacia el fallo hepático fulminante a causa de la sobreinfección por VHE.

1.3.3. Hepatitis crónica.

La hepatitis E es una enfermedad aguda que hasta hace pocos años no parecía progresar hacia la cronicidad (Emerson y col. 2003). Sin embargo, varios estudios sugieren que pacientes inmunodeprimidos que recibieron un trasplante de hígado, pudieron haber desarrollado una hepatitis E crónica (Haagsma y col. 2008). Se han descrito más de 56 casos hasta la fecha, en alguno de ellos se ha conseguido aislar a virus pertenecientes al genotipo 3, por lo que se puede considerar al VHE como un virus oportunista que causa hepatitis crónica en pacientes inmunodeprimidos (González Tallon y col.

2012). En un estudio con pacientes transplantados de hígado y riñón que se infectaron con VHE (Kamar y col. 2008), más del 50% desarrollaron hepatitis crónica con rápida evolución a cirrosis.

También ha sido detectada hepatitis E crónica en niños receptores de trasplante hepático (Halac y col. 2012). Cabe destacar la conveniencia de pruebas moleculares de detección del ARN vírico en sangre o heces, debido a que las pruebas serológicas pueden resultar negativas en pacientes inmunodeprimidos.

1.4. PATOGENIA.

La patogenia del VHE está todavía pendiente de esclarecer, aunque 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 (Rodríguez-Frias y col. 2012). 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. En dichas infecciones experimentales, 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.

La severidad de la enfermedad causada por el VHE está condicionada por factores no del todo esclarecidos, entre los que podemos encontrar factores del propio virus o del huésped.

Entre los factores asociados al huésped podemos citar el embarazo, uso de anticonceptivos (Mateos y col. 2010), edad, patología hepática previa y repuesta inmune. Con respecto a los factores asociados al propio virus estarían los diferentes genotipos y la dosis infectante (Pérez-Gracia y col. 2003).

Un estudio realizado en Japón, ha descrito que los pacientes infectados con el genotipo 4 presentaban enfermedad más grave que los que estaban infectados con el genotipo 3 (Ohnishi y col. 2006). Hasta la fecha, no se han descrito cuadros de hepatitis fulminante en pacientes infectados con el genotipo 2. La mayoría de los pacientes con hepatitis E autóctona no requieren una biopsia del hígado, ya que presentan una hepatitis autolimitada, pero hay algunos pacientes que presentan una hepatitis más severa siendo necesaria la realización de una biopsia de hígado. Hay pocos datos sobre la histopatología hepática aguda de la hepatitis E autóctonas, y estos informes se limitan únicamente a los pacientes con enfermedad severa. La patología del hígado en la hepatitis aguda E es similar a la observada en la hepatitis viral aguda, produciéndose un desorden lobular con distorsión de la reticulina y expansión de los tractos portales con una mezcla de polimorfonucleares e infiltrados inflamatorios linfocitarios (Malcolm y col. 2005; Perón y col. 2007). En los pacientes con hepatitis E que tienen cirrosis subyacente, los hallazgos patológicos en el hígado son inespecíficos (Lockwood y col. 2008) y podrían ser fácilmente confundidos con una hepatitis alcohólica. En los pacientes trasplantados inmunosuprimidos que han desarrollado una infección crónica por el VHE, la patología del hígado muestra fibrosis progresiva y hepatitis portal con infiltración linfocítica y necrosis gradual (Haagsma y col. 2008; Kamar y col. 2008) con progresión a cirrosis.

En el 25% de las mujeres embarazadas se produce hepatitis fulminante. Parece ser que los factores hormonales durante el embarazo pueden desempeñar un papel fundamental en la alteración de la regulación inmune y la replicación viral (Arankalle y col. 1998). Los niveles de progesterona, estrógeno y gonadotropina coriónica humana (GCH) aumentan en el embarazo. En estudios con animales, se ha demostrado que estas hormonas tienen un claro efecto supresor de la inmunidad mediada por células (Han 1975; Boll y col. 1996; Rijhsinghani y col. 1996). Además, el embarazo está asociado con altos niveles de hormonas esteroides que pueden interferir con la replicación viral (Styrt y col. 1991; Hussaini y col. 1997). Estas hormonas pueden inhibir directamente la regeneración

hepática celular que puede predisponer a la disfunción/fallo hepático cuando se expone a patógenos infecciosos (Kar y col. 2008).

Además, las hormonas esteroideas pueden tener propiedades inmunosupresoras por elevada apoptosis de linfocitos a través del factor de necrosis kB (NF-kB) (Siebenlist y col. 1994). NF-kB es un factor de transcripción eucariótica dimérica que tiene múltiples efectos celulares, incluyendo efectos sobre el desarrollo y regeneración hepática y de la respuesta inmune. Es interesante resaltar que utilizando un modelo animal (ratones knock-out) que carecía del componente p65 de NF-kB, se mostró evidencia de apoptosis generalizada. Resultados similares se han documentado en embarazadas con hepatitis fulminante (HF), debido a la hepatitis B, C y E. Estas pacientes mostraron una supresión casi completa de p65 (Prusty y col. 2007). A partir de estos resultados, se puede especular que la ausencia de p65 del complejo NF-kB puede dar lugar a un daño hepático fulminante. Además, es necesario resaltar que el nivel de expresión de NF-kB durante el embarazo es bajo ya que juega un papel importante en el no rechazo del feto. Durante el embarazo, el sistema inmunológico de la madre está claramente alterado para tolerar al feto que es genéticamente diferente (Hunt 1989). Las citoquinas que contribuyen a la tolerancia inmunológica están elevadas por la secreción de la placenta y las células del trofoblasto. Sobre todo, están elevados los factores de crecimiento tumoral beta y las interleuquinas 4 y 10 (IL-4 e IL 10), que inhiben la inmunidad mediada por células. En cambio, las células T están marcadamente reducidas durante el embarazo, hasta aproximadamente la semana 20 de gestación, lo que da lugar a una reducción del nivel de respuesta inmune (Meeusen y col. 2001). La modulación de la inmunidad mediada por células parece permitir la retención de aloinjerto fetal, sin embargo, también altera la respuesta inmune contra las infecciones. Existe un estudio sobre la respuesta inmune celular en las mujeres, tanto embarazadas y no embarazadas con hepatitis aguda E y una población control (Pal y col. 2005). Este estudio muestra que las mujeres embarazadas con VHE presentaban inmunosupresión generalizada. El hallazgo se caracteriza por una disminución de la respuesta de los linfocitos a fitohemaglutinina (PHA), acompañado por un sesgo Th2 predominante en

comparación con las mujeres no embarazadas con hepatitis E y controles sanos (Pérez-Gracia y col. 2012).

1.5. DIAGNÓSTICO.

En el caso de zonas no endémicas, el diagnóstico se debe realizar cuando existen en el paciente factores de riesgo tales como viaje a zona endémica o contacto con animales como el cerdo, además de haber descartado previamente las causas más comunes de hepatitis y colestasis.

Adicionalmente, en los siguientes cuadros clínicos se debe sospechar de hepatitis E y solicitar pruebas diagnósticas específicas:

- Hepatitis agudas con marcadores de hepatitis A, B y C negativos.
- Fallo hepático o descompensación en hepatopatías crónicas.
- Hepatitis agudas con algún factor de riesgo (viajes a zonas endémicas, etc.).
- Hepatitis medicamentosa.
- Hepatitis autoinmune.
- Hepatopatía crónica no filiada en pacientes inmunocomprometidos.

Se emplean diversas técnicas para el diagnóstico de la hepatitis E, siendo las más habituales las pruebas inmunológicas de detección de anticuerpos anti-VHE IgG, anti-VHE IgM y las pruebas de diagnóstico molecular RT-nested-PCR y RT-PCR a tiempo real, que permiten la detección del ARN del VHE en heces y/o suero (Fernández-Barredo y col. 2006; Ticehurst y col. 1992), desde 2 semanas después del inicio de la enfermedad (Clayson y col. 1995), hasta 4-16 semanas (Nanda y col. 1995).

Adicionalmente, mediante RT-PCR a tiempo real es posible cuantificar la cantidad de moléculas de ARN vírico, reducir el tiempo de análisis considerablemente, evitar contaminaciones en la manipulación de muestras y alcanzar una elevada sensibilidad (Orru y col. 2004; Narayanan y col. 2005).

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

El enzimo-inmunoensayo (ELISA) detecta 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, parece ser que las técnicas inmunoenzimáticas se muestran más sensibles en el caso de individuos con cuadros sintomáticos que en asintomáticos (Myint y col. 2006).

Se desarrolló un método rápido de detección de anticuerpos de tipo IgM en suero mediante una técnica de inmunocromatografía (Chen y col. 2005), 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. Este 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. 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 y col. 1993). Existe un estudio (Takahashi y col. 2005), en el que se ha observado que la duración de los anti-VHE IgA es similar a los anti-VHE IgM 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).

Diversos estudios señalan la necesidad de combinar la realización de un ELISA con un inmunoblot para confirmar las infecciones generadas por el genotipo 3 (Herremans y col. 2007), ya que se detectó pérdida de sensibilidad de ambas técnicas por separado en regiones de baja endemicidad, donde los kits comerciales de diagnóstico utilizaban antígenos procedentes de los genotipos 1 y 2.

1.6. TRATAMIENTO.

Actualmente no existen fármacos antivirales específicos para el VHE debido a que hasta hace poco tiempo, se desconocían con más detalle los mecanismos patogénicos del mismo, así como la evolución de la enfermedad hacia la cronicidad.

En un estudio (Haagsma y col. 2008), dos pacientes con hepatitis crónica por VHE tras ser trasplantados, fueron tratados con interferón pegilado alfa2b durante 52 y 20 semanas, respectivamente. Se observó un descenso significativo de la viremia junto con una normalización en los niveles de las transaminasas; por otra parte no se detectó el ARN-VHE en suero entre las semanas 4 y 12 del tratamiento. Sin embargo, en uno de los pacientes tratados se tuvo que disminuir la dosis de inmunosupresores para que el tratamiento tuviera la respuesta esperada. Este hecho está documentado en otros estudios, en los cuales se aprecia una mejoría en el aclaramiento del VHE debido a la mayor respuesta inmune del paciente tras la disminución de la dosis de inmunosupresores (Bihl y col. 2009; Kamar y col. 2010b).

Estudios adicionales (Kamar y col. 2010a; Kamar y col. 2010d), evidenciaron una mejora en dos pacientes crónicos tras ser tratados en

monoterapia con interferón pegilado alfa2b y ribavirina, respectivamente. En este último, se observó una inhibición en la replicación del VHE y una respuesta virológica sostenida en pacientes con infecciones crónicas por VHE.

1.7. PREVENCIÓN.

1.7.1. Medidas higiénico-sanitarias.

La prevención en áreas endémicas se basa en la aplicación de medidas higiénico-sanitarias apropiadas que eviten la transmisión fecal-oral, como el tratamiento de las aguas urbanas y residuales y evitar el consumo de alimentos no cocinados. Esto es especialmente importante en mujeres embarazadas que se encuentren en el tercer trimestre de gestación, debido al mal pronóstico de la infección en ellas. En países industrializados, con tratamientos apropiados y buenas condiciones sanitarias e higiénicas, es poco probable que se produzcan epidemias de hepatitis E. El principal riesgo estaría asociado al consumo de vegetales, frutas y otros alimentos importados de regiones endémicas, donde las aguas que se usan para el riego y el lavado, pueden estar contaminadas por aguas residuales o heces de animales.

En los últimos años, las medidas de prevención en estos países incluyen la de cocinar los productos cárnicos de cerdo a temperaturas mayores a 56°C, que parecen ser suficientes para evitar la infección por VHE mediante la ingesta de estos productos (Barnaud y col. 2012).

Adicionalmente, profesionales veterinarios y trabajadores de explotaciones porcinas deben incrementar las medidas higiénico-sanitarias después de haber estado en contacto con los animales, ya que el VHE es altamente infeccioso en el ganado porcino (Bouwknegt y col. 2008).

Se recomienda también aumentar los controles en la importación de ganado porcino después de que se detectara por primera vez en Europa, cepas de

VHE pertenecientes al genotipo 4 (Hakze-van der Honing RW y col. 2011). Este dato, refuerza la hipótesis de que el ganado porcino actúa de reservorio de la enfermedad en zonas no endémicas y que éste a su vez puede ser el responsable de la aparición de casos esporádicos de hepatitis E aguda. De igual modo, se recomienda un control sanitario en las poblaciones de ciervo y jabalí, hasta que todas las rutas de infección del VHE a humanos hayan sido esclarecidas.

1.7.2. Vacunas.

Las estrategias actuales que se están desarrollando para la obtención de una vacuna, se basan en la tecnología del ADN recombinante y en la obtención de proteínas a partir de fragmentos del ORF2 (Emerson y col. 2001). Estas proteínas constituyen la zona diana de los anticuerpos neutralizantes para los 4 genotipos (Tam y col. 1991), los cuales serían suficientes para inmunizar frente a la infección por el VHE (Tsarev y col. 1994).

Basándose en los datos anteriores, se están desarrollando 2 vacunas sometidas a estudio clínico en la actualidad. La primera de ellas contiene "Virus-Like Particles" (VLPs), las cuales inducen la producción de inmunoglobulinas anti-VHE de tipo M, G y A, tanto si son administradas por vía oral como si son inoculadas, ya que resisten el pH gástrico (Purcell y col. 2003). En un estudio en fase 2-3 realizado con 2.000 voluntarios del ejército Nepalés, se observó que aquellos sujetos que completaron el programa de vacunación (3 dosis), presentaron una menor incidencia de hepatitis E aguda que el grupo control que había recibido un placebo, siendo la tasa de eficacia de la vacuna de un 95%. Las reacciones adversas fueron similares en ambos grupos (Shrestha y col. 2007).

La segunda vacuna, denominada vacuna HEV 239, contiene una proteína recombinante perteneciente a la cápside del VHE. En el ensayo en fase 2, todos los voluntarios sometidos al estudio mostraron seroconversión al mes de recibir las 3 dosis que componían la vacuna (Pérez-Gracia y col. 2012).

Recientemente, ha concluido un estudio en fase 3 de esta vacuna en China con 113.000 participantes, en el cual cerca de los 97.000 participantes que recibieron 3 dosis de la vacuna, alcanzaron un 100% de tasa de eficacia protectora durante el siguiente año (Zhu y col. 2010).

No existen datos comparativos sobre la inmunogenicidad y seguridad de estas 2 vacunas, requiriéndose más datos sobre la misma en embarazadas, niños y personas con hepatopatías previas. Los estudios realizados con estas vacunas se centran en la enfermedad clínica y no estudian las tasas de infección por VHE, por lo tanto no está claro si son efectivas en cuanto a la reducción de la transmisión dentro de una comunidad. La duración de la protección tampoco está bien determinada.

Independientemente de estas incertidumbres, la vacuna HEV 239 fue aprobada en China por la SFDA (*State Food and Drug Administration*) en enero del 2012 y su comercialización comenzó en noviembre del 2012 bajo el nombre de Hecolin (Park 2012).

1.8. ASPECTOS ZONÓTICOS. EL VHE EN CERDOS.

El VHE ha sido detectado en varias especies animales domésticas y silvestres, como aves de corral (Haqshenas y col. 2001), caballos (Saad y col. 2006), ciervos, jabalíes (Takahashi y col. 2004), ratas (He y col. 2002) y cerdos (Meng y col. 1997). Asimismo, se detectaron anticuerpos anti-VHE en áreas endémicas y no endémicas, en aves de corral (Sun y col. 2004), cánidos (Arankalle y col. 2001; Mochizuki y col. 2006), ganado vacuno (Arankalle y col. 2001; Vitral y col. 2005), roedores (Kabrane-Lazizi y col. 1999; Favorov y col. 2000; He y col. 2006; Easterbrook y col. 2007), suidos (Chandler y col. 1999; Sonoda y col. 2004; Leblanc y col. 2007; Fernández-Barredo y col. 2007) y vivérridos (Nakamura y col. 2006).

La primera cepa de VHE de origen porcino aislada en 1997 en los EEUU, presentaba un 92% de homología nucleotídica con las secuencias analizadas de las otras 2 cepas humanas detectadas también en EEUU (Meng y col. 1997).

De manera simultánea a los estudios anteriores, se realizaron infecciones experimentales con el objetivo de encontrar un modelo experimental animal para el estudio de la hepatitis E. Así, se consiguió reproducir la excreción fecal de virus en cerdos (Usmanov y col. 1991a; Meng y col. 1998), corderos (Usmanov y col. 1994), ratas (Maneerat y col. 1996) y primates (Cuyck-Gandre y col. 1998; Meng y col. 1998; Arankalle y col. 2006).

Actualmente, el VHE está considerado como un agente zoonótico, viéndose esta afirmación reforzada por los resultados obtenidos en varios estudios realizados en Japón (Takahashi y col. 2003b), Corea (Ahn y col. 2005), Reino Unido (Ijaz y col. 2005; Tolari y col. 2006) y también en España, donde la similitud nucleotídica era del 94% entre cepas humanas y porcinas (Pina y col. 2000; Pérez-Gracia y col. 2007) pertenecientes a una misma región geográfica en el genotipo 3 (ver capítulo 1.1.3.).

Se han descrito infecciones por consumo de hígado crudo de cerdo y jabalí (Tei y col. 2003; Tamada y col. 2004; Masuda y col. 2005; Said y col. 2009), en las cuales las cepas aisladas de los productos cárnicos, en algunos casos coincidían en un 100% con las cepas halladas en dos pacientes con hepatitis E autóctona (Yazaki y col. 2003).

Por otra parte, se detectó VHE en hígados de cerdo en EEUU (Feagins y col. 2007), España, República Checa e Italia (Di y col. 2012), Alemania (Wenzel y col. 2011), Brasil (Gardinali y col. 2012b), India (Kulkarni y col. 2008), Holanda (Bouwknegt y col. 2007); lo cual apoya que una de las vías de transmisión del VHE sea por consumo de carne de cerdo cruda o poco cocinada.

En un estudio realizado en la Comunidad Valenciana, se observó una seroprevalencia de anti-VHE IgG del 18,8% en individuos expuestos a

ganado porcino, frente al 4,1% de individuos no expuestos (Galiana y col. 2008). Adicionalmente, los resultados permitieron observar que en el grupo de individuos positivos a anti-VHE IgG, se aprecian 2 factores de riesgo concomitantes: bebida de agua no tratada y exposición a ganado porcino.

Todos los estudios realizados sugieren que cepas de los genotipos 3 y 4 del VHE son responsables de la infección del ganado porcino (Chandler y col. 1999; Hsieh y col. 1999; Sonoda y col. 2004; Fernández-Barredo y col. 2007; Wibawa y col. 2007), actuando éste como reservorio de la enfermedad en zonas consideradas no endémicas.

Pese a todas las evidencias que hacen suponer que la transmisión del VHE desde los cerdos al hombre es factible, no se han conseguido establecer los mecanismos exactos que hacen posible este hecho. Los genotipos 3 y 4 se han identificado tanto en el cerdo como en el ser humano con una alta homología entre sí y por lo tanto serían los genotipos asociados a zoonosis, mientras que los genotipos 1 y 2 sólo han sido descritos en la especie humana (Arankalle y col. 2002; Cooper y col. 2005).

El potencial zoonótico del ganado porcino, es relevante debido a la gran cantidad de purines que vierte al medio como consecuencia de una concentración de la producción, causada por una migración desde sistemas de explotación extensivos, hacia sistemas de producción intensivos, que impiden la correcta gestión agrícola tradicional de los mismos llevada a cabo anteriormente. Ello ha generado un problema que preocupa tanto al sector ganadero como a las autoridades sanitarias, que cada vez ven más riesgos para la salud pública en este tipo de subproductos ganaderos.

1.9. PRODUCCIÓN PORCINA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA Y GESTIÓN DE PURINES.

1.9.1. Introducción.

España ha sido tradicionalmente un país con cotas de producción porcina elevadas. En 2010 fue el segundo productor europeo en el sector con un total de 25 millones de cabezas censadas, solo superado por Alemania con un total de 27 millones (EUROSTAT). La Comunidad Valenciana es una zona de elevada producción porcina con más de 1.200.000 cabezas censadas (MAPA, EUROSTAT). La mayor parte de la producción autonómica pertenece a las comarcas de Els Ports, L'Alt i Baix Maestrat y La Plana Alta en la provincia de Castellón (CAPA).

1.9.2. Marco legal.

La legislación medioambiental que afecta a la producción ganadera se puede agrupar en tres grandes grupos: normativas sobre impacto ambiental de las explotaciones, sobre vertidos, y sobre residuos y su aplicación en la agricultura. Dicha normativa medioambiental se aplica únicamente a las explotaciones ganaderas intensivas, ya que en general el efecto contaminante de la ganadería extensiva se considera muy escaso.

1.9.2.1. Normativas sobre impacto ambiental.

A nivel del Estado español, la legislación actualmente en vigor que regula la autorización de las explotaciones intensivas ganaderas se basa en el **Reglamento de Actividades Molestas, Insalubres, Nocivas y Peligrosas** (Decreto 2414/1961 y sus modificaciones), que cataloga las explotaciones ganaderas como actividad molesta debido a los malos olores y como actividad insalubre y nociva por el posible riesgo de transmisión de enfermedades infecto-contagiosas.

La **Ley 6/2001 de 8 de mayo** exige la declaración de impacto ambiental en explotaciones intensivas porcinas con más de 2.000 plazas de cerdos de engorde y más de 750 plazas de cerdas de cría.

Para el caso de explotaciones intensivas con menor número de cabezas que las especificadas anteriormente, la normativa es menos exigente respecto a los estudios sobre impacto ambiental, y su elaboración es competencia de cada país miembro de la UE, no recogiendo la legislación española nada al respecto.

Ley **26/2007 de 23 de octubre** de Responsabilidad medioambiental: El ministerio de medio ambiente aprobó el proyecto de ley de Responsabilidad Medioambiental, el cual busca reparar los daños ocasionados al medioambiente, así como evitar que se produzcan, y que transpone la Directiva 224/35/CE del parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de abril de 2004. Esta ley obliga a los operadores a reparar los daños ocasionados al medio ambiente aún cuando no hayan cometido ninguna infracción administrativa y actúen de modo respetuoso con la normativa medioambiental, siguiendo el conocido principio de "*Quien contamina paga*".

En el ámbito autonómico de la Comunidad Valenciana, la Ley Ganadera Valenciana recoge en su Título IV, Capítulo IV, artículo 72 lo siguiente en cuanto a gestión de estiércoles y purines por los productores ganaderos:

- Los titulares de explotaciones ganaderas son responsables legales de la correcta gestión de estiércoles y purines.
- La Generalitat regula la aplicación directa de los purines como fertilizantes en explotaciones agrarias para un mejor aprovechamiento de los mismos, no considerándose a los purines como residuos sino como subproductos ganaderos siempre que sean destinados a este fin.
- Los propietarios de las parcelas agrarias donde se deposite el purín deben presentar una autorización por escrito para tales operaciones,

siendo sólo autorizado su uso en aquellas que estén siendo explotadas agrícolamente en el momento de aplicación de los purines. Este punto viene recogido también en la directiva Europea **96/61/CE**, la cual especifica los valores límite de emisión de sustancias contaminantes.

Las explotaciones están obligadas a notificar a la Consejería de Medio Ambiente de su correspondiente Comunidad Autónoma los índices de emisiones, para posteriormente elaborar el Inventario Estatal de Emisiones Contaminantes (EPER), en cumplimiento de la **Decisión 2000/479/CE**.

Los compuestos que deben notificar los ganaderos son los siguientes:

CONTAMINANTES A LA ATMÓSFERA	CONTAMINANTES AL AGUA
CH ₄ (Metano)	N (Nitrógeno total)
NH ₃ (Amoníaco)	P (Fósforo total)
N ₂ O (Óxido nitroso)	Cu (Cobre)
PM ₁₀ (partículas con diámetro 10 µm)	Zn (Zinc)
TOC (Carbono orgánico total)	

Es importante resaltar que cuando la gestión de los estiércoles y purines se realice mediante su valoración agrícola o entrega a un gestor autorizado, no deberán notificarse los datos sobre contaminantes del agua. Únicamente existe la obligación de reflejar este dato, en aquellos casos en los que las explotaciones ganaderas dispongan de depuradoras con vertido directo a cauce.

1.9.2.2. Normativa sobre vertidos.

Cuando los residuos procedentes de las explotaciones ganaderas se eliminen vía vertido a cauces públicos, deberán someterse previamente a un proceso de depuración para alcanzar los parámetros de vertido que se recogen el **Reglamento de Dominio Público Hidráulico, Real Decreto**

Legislativo 1/2001 de 20 de julio, competencia de los Organismos Hidrológicos de cada Cuenca.

Asimismo, dicho reglamento establece que aquellos vertidos que puedan dar lugar a la infiltración o almacenamiento de sustancias susceptibles de contaminar los acuíferos o aguas subterráneas únicamente podrán ser autorizados cuando mediante el estudio hidrogeológico presentado, se aporten garantías técnicas debidamente razonadas acreditativas de la inocuidad del vertido.

1.9.2.3. Normativa sobre residuos y aplicación en agricultura.

En el ámbito europeo, los residuos son regulados por la **Directiva 91/156/UE** que ha sido traspuesta a la legislación española por la **Ley 10/1998** en la cual se contempla que los estiércoles ganaderos cuando se utilizan en explotaciones agrícolas como abono no serán considerados como residuos, por lo que no se considerará que se está efectuando una operación de vertido.

Ello devuelve a los estiércoles el carácter de fertilizantes órgano-minerales que siempre han tenido y su regulación cuando se reutilice en agricultura será la misma que la de otro tipo de fertilizantes.

El **Real Decreto 324/2000** establece las normas básicas por las que se regula un eficaz y correcto desarrollo de la actividad ganadera en el sector porcino, conforme a la normativa vigente en materia de higiene, sanidad animal, bienestar de los animales y medio ambiente.

En cuanto a la gestión de los estiércoles de origen porcino podrá realizarse mediante la valorización como abono órgano-mineral. Por lo tanto la explotación porcina deberá:

- Disponer de balsas de estiércol cercadas e impermeabilizadas, que eviten el riesgo de filtración y contaminación de las aguas

superficiales y subterráneas, con un tamaño preciso que permita almacenar la producción de al menos 3 meses.

- Acreditar que dispone de suficiente superficie agrícola para la utilización de los purines como abono órgano-mineral. Al mismo tiempo establece 2 tipos de zonas en las cuales se puede aplicar el purín.
 - Zonas Vulnerables: la cantidad máxima de estiércoles aplicada en dicha superficie y su contenido en nitrógeno estará limitado, debiendo presentar un plan de gestión y producción de estiércoles de acuerdo con los programas de actuación elaborados por las Comunidades Autónomas.
 - Resto del territorio: aplicación de estiércoles con un límite menor de 210 kg de nitrógeno por hectárea y año.

A partir del Real Decreto 324/2000 se ha estimado que la producción de purín según el estado productivo del ganado varía del siguiente modo (Tabla 3).

Tabla 3. Producción de purín según estado productivo del ganado.

TIPO DE GANADO PORCINO(PLAZA)	ESTIERCOL LÍQUIDO Y SEMILÍQUIDO (m³/año)	CONTENIDO EN NITRÓGENO (Kg/plaza/año)	EQUIVALENCIA EN UGM (Unidad Ganado Mayor)
Cerda en ciclo cerrado (incluye madre y su descendencia hasta final de cebo)	17,75	57,60	0,96
Cerda con lechones hasta destete (de 0 a 6 kg)	5,10	15,00	0,25
Cerda con lechones hasta 20 Kg	6,12	18,00	0,30
Cerda de reposición	2,50	8,50	0,14
Lechones de 6 a 20 kg	0,41	1,19	0,02
Cerdo de 20 a 50 Kg	1,80	6,00	0,10
Cerdo de 50 a 100 Kg	2,50	8,50	0,14
Cerdo de cebo de 20 a100 Kg	2,15	7,25	0,12
Verracos	6,12	18,00	0,30

Teniendo en cuenta la elevada cantidad de purines generada, se hace patente la necesidad de establecer una adecuada gestión de los residuos ganaderos desde un punto de vista ambiental, evitando la contaminación difusa que el exceso de vertido de estos residuos puede producir en el suelo agrario.

Algunas de las consideraciones a tener en cuenta para una correcta aplicación de los purines en terrenos agrícolas vienen recogidas en el **RD 2352/2004**, siendo las más significativas las que se resumen a continuación:

- Evitar la compactación y mantener la estructura de los suelos, con la utilización de la maquinaria adecuada para realizar el abonado.

- Queda restringida la aplicación de productos fitosanitarios, fertilizantes, lodos de depuradora, compost, purines o estiércoles sobre terrenos encharcados o con nieve y sobre aguas corrientes o estancadas.
- Almacenamiento de estiércoles ganaderos en las explotaciones: para evitar el riesgo de filtración y contaminación de las aguas superficiales y subterráneas, las explotaciones ganaderas en estabulación permanente o semipermanente deberán disponer y utilizar tanques de almacenamiento o fosas, estercoleros y balsas impermeabilizadas natural o artificialmente, estancas y con capacidad adecuada.

1.9.3. Factores que determinan el riesgo sanitario en la aplicación agrícola de purines.

Los purines sin previo tratamiento aplicados como fertilizante directamente sobre terrenos cultivables representan un riesgo desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y sanidad medio ambiental debido a la existencia de patógenos de origen vírico (Bofill-Mas y col. 2005), bacteriano y parasitario (Cole y col. 2000). Además del problema de salud pública (Wing y col. 2000), representan un problema económico y de sanidad animal importante.

En este sentido, se han encontrado en purines porcinos agentes bacterianos como *Salmonella spp.* (Tapchaisri y col. 1999), *Escherichia spp.*, *Listeria* y *Campylobacter spp.* (Hutchison y col. 2005; Hill y col. 2005), y agentes patógenos víricos como el virus de la enfermedad de Aujeszky, virus de la fiebre aftosa, virus de la enfermedad vesicular porcina y como se ha descrito recientemente, el virus de la hepatitis E (Meng y col. 1998; Meng y col. 2002; Huang y col. 2002a; Arankalle y col. 2003; Kasorndorkbua y col. 2005; Fernández-Barredo y col. 2006; Jindal y col. 2006; Jothikumar y col. 2006; Fernández-Barredo y col. 2007; Feagins y col. 2007; Martelli y col. 2007).

Muchos de los agentes patógenos mencionados son zoonóticos, por lo que su emisión al medio ambiente conlleva un riesgo elevado sobre la salud pública. Todos estos patógenos pueden persistir durante largo tiempo en el medio ambiente y por lo tanto en los purines (Tabla 4).

Tabla 4. Agentes patógenos presentes en purines, vías de transmisión y resistencia en el medio ambiente. (PPA: peste porcina Africana; FA: fiebre aftosa; EA: enfermedad de Aujeszky; SAL: *Salmonella spp.*; VHE: virus de la hepatitis E).

Fuente: Departamento de Agricultura. Dirección General de Alimentación. Servicio de Ordenación y Sanidad Animal del Gobierno de Aragón.

ENFERMEDAD	VIA TRANSMISIÓN	SUPERVIVENCIA EN EL MEDIO NATURAL
PPA	<ul style="list-style-type: none"> • Contacto directo • Estiércoles y purines 	-Se inactiva a 56°C -Resistente a T bajas -Inactivado con pH <3 y >11
PPC	<ul style="list-style-type: none"> • Contacto directo • Estiércoles y purines 	-Se inactiva a 56°C -Resistente a T bajas -Inactivado a pH<3,9 y >11,5
EVP	<ul style="list-style-type: none"> • Contacto directo • Piel y mucosas • Estiércoles y purines 	-Resistente a T altas -Resiste los procesos de fermentación -Inactivado a pH<3
FA	<ul style="list-style-type: none"> • Gran difusibilidad • Contacto directo • Aves 	-Se inactiva a 50°C -Resiste congelación -Resiste en forraje y medioambiente 1 mes
EA	<ul style="list-style-type: none"> • Aerógena • Contacto directo: secreciones oronasales y genitales • Estiércoles y purines • Vehículos 	-Se inactiva a 60°C -Estable a T bajas -Se inactiva con pH<5 y >12
SAL	<ul style="list-style-type: none"> • Animales Portadores • Pienso • Estiércoles y purines • Agua 	-Puede sobrevivir más de 150 días en purín. El 90% se inactiva en el primer mes
VHE	<ul style="list-style-type: none"> • Fecal-oral • Estiércoles y purines 	

1.9.4. Gestión de la eliminación de purines.

1.9.4.1. Evolución de la ganadería en España y de la producción de purines.

La ganadería española ha sufrido una importante revolución en los últimos 20 años como se puede apreciar en la fig. 10, pasando de ser una ganadería de ámbito familiar a constituir un potente sector industrial capaz de generar índices económicos de más de 4500 millones de euros anuales.

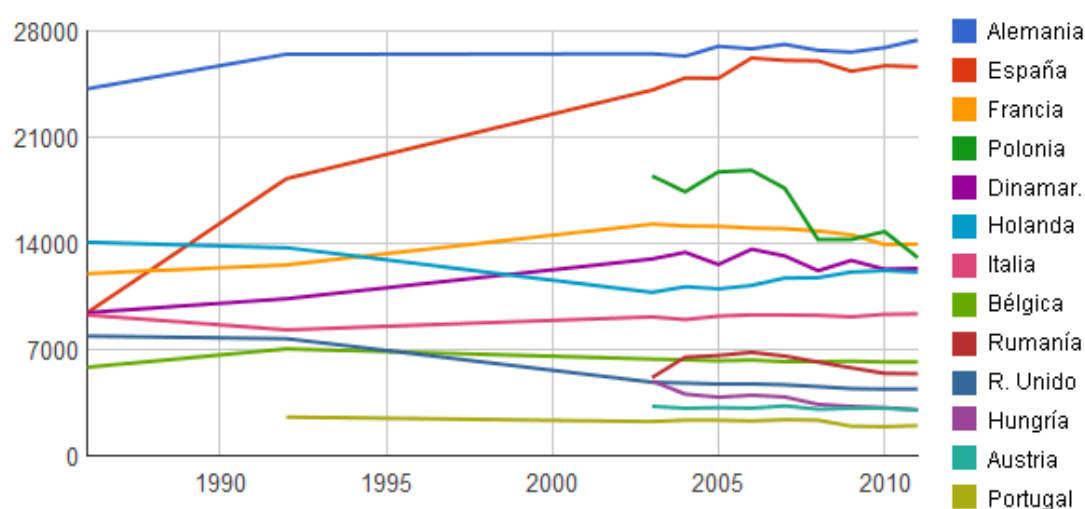


Figura 10. Evolución del censo porcino en España (miles de animales).

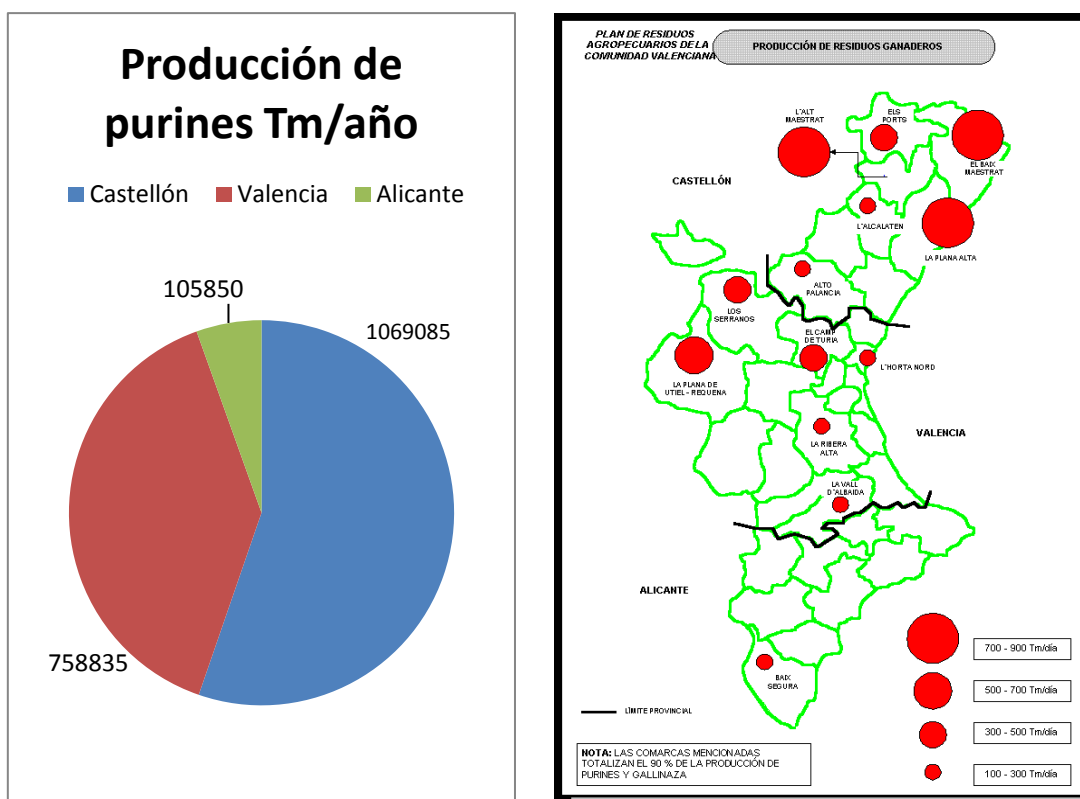
Fuente: MAGRAMA España y EUROSTAT (Año 2008).

Esto ha transformado el modelo de explotación ganadera hacia un modelo de cría intensiva de ganado que genera grandes cantidades de residuos en forma de purines, entendidos estos como la mezcla de los excrementos sólidos y líquidos (heces y orina) junto con las aguas de limpieza de las granjas, restos de comida de los propios animales y fugas del agua de los bebederos y del agua de lluvia. La composición química del purín dependerá del tipo de explotación así como de la edad de los animales, tipo de limpieza (manta o rejilla) y composición de los piensos. El censo de explotaciones porcinas en la Comunidad Valenciana según el Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA) es de 1259, de las cuales únicamente 2 corresponden a un modelo de explotación extensiva, lo cual pone de manifiesto la práctica desaparición de este tipo de explotaciones.

1.9.4.2. Modos de gestión de purines en la actualidad.

Durante años, los residuos generados por las granjas han sido utilizados como fertilizante orgánico natural sin muchos problemas, de hecho la aplicación directa en el ámbito agropecuario sigue considerada como el sistema de gestión de purines más natural, económico y eficiente en cuanto a la reutilización y reciclaje de recursos (Marx y col. 1990; Boopathy 1997; Akiyama y col. 2003; Yang y col. 2007). Los campos de cultivo son capaces de asimilar sin mayores problemas ciertas cantidades de purín por unidad de área. Sin embargo, la evolución del sector hacia sistemas de explotación intensivos, como ya hemos comentado anteriormente, ha generado una cantidad de residuos excesiva en las zonas de producción intensiva. Este hecho ha desencadenado serios problemas a la hora de gestionar estos residuos, incrementando los costes de producción debido a su transporte a zonas con menor concentración demográfica de animales. Todo ello ha obligado a la administración a buscar soluciones a dicho problema de una manera rentable tanto en el ámbito económico y ecológico, como en el socio-sanitario.

Se estima según fuentes de la Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació, que el total de granjas censadas en la Comunidad Valenciana generan una cantidad total de purines que ronda los 2 millones de toneladas, y están distribuidas en un 55% (1.069.085 Tm/año) en la provincia de Castellón, un 39% (758.835 Tm/año) en la de Valencia y un 6% en la de Alicante (105.850 Tm/año). Las zonas con mayor concentración de granjas son las que más purines generan como se puede apreciar en las figuras 11.1 y 11.2.



Figuras 11.1 y 11.2. Distribución de la producción de purines en la Comunidad Valenciana (Tm/año).

Fuente: Plan de residuos agropecuarios de la Comunidad Valenciana. CPAMA.

Actualmente, el purín se aplica en su gran mayoría directamente en el terreno mediante cubas con un sistema de aspersion-pulverización en su parte trasera (fig. 13), que generan algunas veces nubes de hasta 10 metros de altitud. En otras ocasiones el purín se descarga sobre el terreno con ayuda de mangueras en un proceso similar a un riego a manta (fig. 12) y recientemente se opta por sistemas de inyección subterránea (fig. 14) que disminuyen en cierto grado las molestias, principalmente por olores, que ocasionan los otros métodos mencionados. Adicionalmente, la aplicación directa del purín sobre el terreno ocasiona generación de gases que contribuyen al efecto invernadero y la proyección pulverizada de patógenos en el medio ambiente.



Figura 12. Riego a manta con purines.

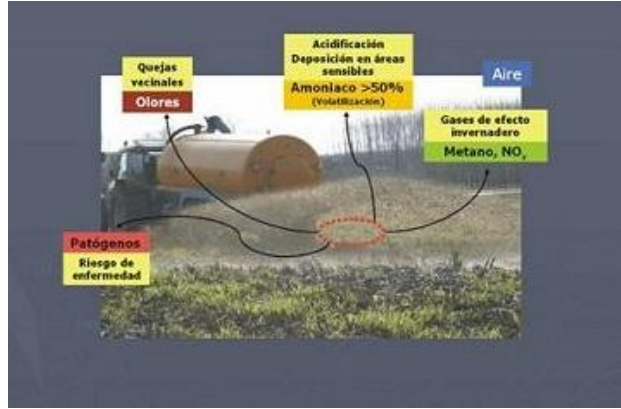


Figura 13. Riego por aspersión con purines.



Figura 14. Sistema de aplicación de purines al terreno por inyección subterránea.

Pese a todos los inconvenientes expuestos, la aplicación de los purines en terrenos agrícolas ha sido el método más rentable de reutilización, gestión y reciclaje de los mismos hasta hace pocos años. La ganadería intensiva concentrada en determinadas zonas ha generado unos excedentes que en muchos casos han conducido a una ineficiente gestión de los purines ocasionando serios problemas medioambientales y sanitarios.

La aplicación directa de purines sobre el terreno agrícola de forma descontrolada y con una gestión incorrecta ocasiona los siguientes efectos (fig. 15):

- a) Efectos sobre la atmósfera: malos olores, emisión de gases asfixiantes e irritantes frutos de la desnitrificación y biodegradación (CH_4 , N_2O y NH_3).
- b) Efectos causados al suelo: acidificación, excesiva nitrificación (Kotzerke y col. 2007), cambios en la salinidad (Li-Xian y col. 2007) y acumulación de metales pesados como Pb, Cu y Zn proveniente de los piensos.
- c) Efectos sobre las aguas: causados por la lixiviación de flujos de exceso con contaminación a base de nitratos, nitritos y metales pesados. Vertidos ilegales en zonas no autorizadas y escapes en balsas de almacenamiento no impermeabilizadas.
- d) Emisión de agentes patógenos al medio ambiente con el consiguiente riesgo para la salud pública.

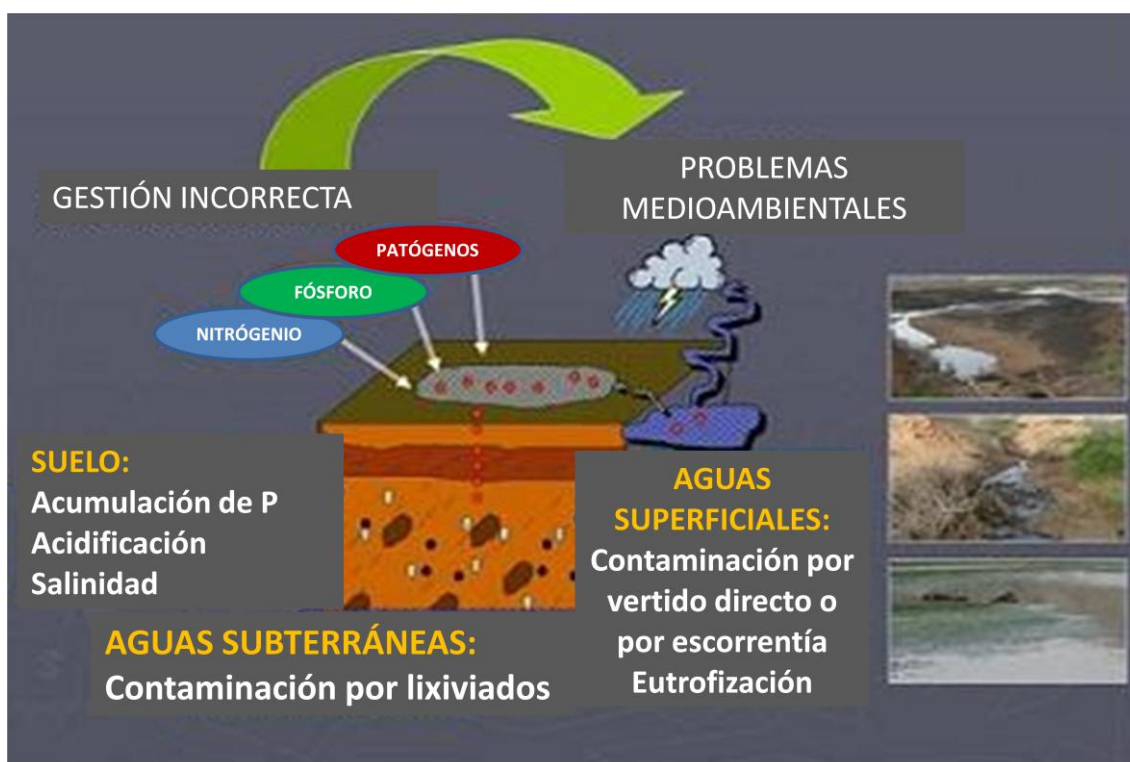


Figura 15. Problemas medioambientales por una gestión incorrecta de los purines.

1.9.5. Actuaciones.

En la bibliografía consultada aparecen varias vías en cuanto al tratamiento que deben seguir los purines generados. Tan sólo una cantidad de purines es asumible por el terreno agrícola, por lo que la gestión del excedente de purines supone un grave problema.

En España se ha suscitado un gran interés por parte tanto de los productores de purines, como de las administraciones, por el desarrollo y la aplicación de nuevas tecnologías para la depuración de efluentes ganaderos.

Sin embargo resulta tarea difícil el que converjan ventajas medio ambientales, técnicas, funcionales, económicas y legales en un mismo sistema. Adicionalmente, los purines presentan gran complejidad para ser eficazmente depurados por su peculiar composición con alta carga contaminante tanto orgánica como mineral. Ello dificulta la consecución de límites aceptables en la legislación de vertidos mediante la simple aplicación de sistemas de depuración tradicionales.

Hay zonas en donde es posible transportar los excedentes hacia otras zonas para su aplicación directa sobre el terreno, aunque esto no siempre es posible y por lo tanto aparecen otras alternativas.

En la figura 16, se resumen los diferentes tratamientos del purín aplicados en la actualidad y que se describen a continuación.

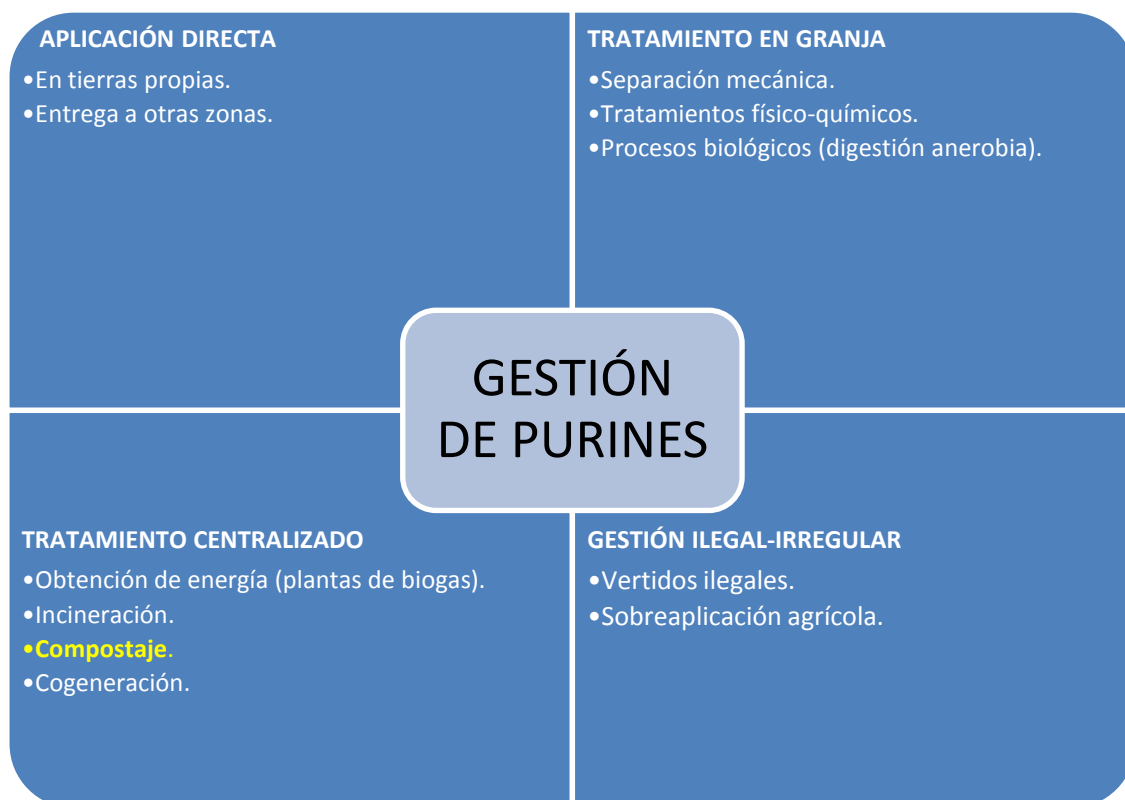


Figura 16. Tratamientos de purines en la actualidad.

1.9.5.1. Aplicación directa.

a) Mediante aspersión.

Consiste en la aplicación del purín sobre el terreno con ayuda de una cuba provista de un motor de aspersión en su parte trasera.

b) Riego a manta.

Aplicación directa con el uso de mangueras que proyectan el purín directamente sobre el terreno inundándolo.

c) Sistemas de inyección.

Recientemente se ha apostado por este método, ya que reduce los inconvenientes y las molestias ocasionadas por los anteriores sistemas, debido a que utiliza unos inyectores para infiltrar el purín en el terreno a

unos centímetros de profundidad, lo que reduce las proyecciones aéreas y los olores.

1.9.5.2. Tratamiento de los purines en granjas.

En algunas ocasiones los purines reciben un tratamiento previo en las mismas granjas para reducir su potencial contaminante antes de ser destinados a otro proceso depurativo o a la aplicación directa sobre terrenos agrícolas.

a) Separación mecánica.

Se han estudiado procesos de ultrafiltración, centrifugación (fig. 17) y osmosis con el objetivo de separar las fases sólidas y líquidas para la aplicación de esta en sistemas de riego, pero ya con una menor demanda química de oxígeno (DQO). Estos sistemas son de difícil implantación en el sector ganadero en general y en el porcino en particular debido a que resultan poco económicos por su alto coste de funcionamiento y mantenimiento, así como una moderada eficacia que ronda el 25% en la reducción de DQO.



Figura 17. Sistema de separación mecánica: centrifugadora de purines.

b) Tratamientos físico-químicos.

En varios proyectos piloto se ha evaluado la eficacia de tratamientos a base de la aplicación de cal y cloruro férrico a los purines (Laridi y col. 2005), observándose una reducción de la DQO (Zhu y col. 2001), aunque sin llegar

a los límites que marca la normativa vigente. Por otra parte no se supera la eliminación de nitrógeno amoniacal en más de un 30% en el efluente depurado, lo que no permite tampoco alcanzar valores legales de vertido. A todo esto se suma la alta concentración en amoníaco del efluente y un alto pH lo que hace inviable la utilización del efluente líquido para agua de lavado de las granjas por los consiguientes riesgos que comporta para el ganado.

c) Procesos biológicos.

Se ha demostrado experimentalmente que el proceso biológico aeróbico-anóxico-anaerobio en balsas (fig. 18), ha logrado altas cotas de efectividad para el tratamiento de purines, reduciendo todos los parámetros contaminantes incluido el nitrógeno mineral, por debajo de los límites que marca la legislación de vertidos. La aplicación de estos métodos junto con los descritos en el apartado a), son los que se han estudiado en este trabajo de investigación y son al parecer la combinación que más ventajas aporta de cara al futuro en la depuración de purines (Vanotti y col. 2007). No obstante la aplicación actual de estas técnicas a nivel de granja se limita al uso de lagunas de anaerobiosis, las cuales generan molestias por desprendimiento de gases en zonas cercanas a núcleos urbanos (Lim y col. 2003) y a las cuales se les está buscando alternativas.



Figura 18. Balsa impermeable para el tratamiento biológico de purines.

1.9.5.3. Tratamientos centralizados.

Este apartado describe las plantas de tratamiento y depuración que utilizan tecnologías complejas y una inversión económica considerable, por lo que para rentabilizar su funcionamiento deben tratar grandes cantidades de purín en una misma instalación, para atenuar los costes tecnológicos y logísticos (transporte de purines).

Las plantas existentes en la actualidad están situadas en zonas con una elevada concentración de explotaciones ganaderas próximas entre sí para facilitar el transporte de los purines hasta la planta, reduciendo así los costes derivados de su transporte.

Según las diferentes tecnologías empleadas, existen varios tipos de plantas centralizadas para el tratamiento de purines que se describen a continuación.

- a) **Plantas de biogás:** ha sido uno de los sistemas que más fuerza cobró en un primer momento, apoyado desde las administraciones con leyes como el **RD 2818/1998** de 23 diciembre sobre producción de energía eléctrica producida en centrales abastecidas con recursos renovables, residuos y cogeneración.

Sin embargo, estudios efectuados en plantas piloto de biogás han demostrado que únicamente se consigue una depuración máxima del 75% de la carga contaminante expresada en DQO (Aangelidaki y col. 2002), haciéndose necesaria la utilización de procesos complementarios de depuración para eliminar la contaminación de los efluentes generados en las granjas intensivas. Adicionalmente, hay que sumar la baja rentabilidad del proceso debido al reducido contenido energético de los purines.

- b) **Plantas de cogeneración:** para aumentar el contenido energético de los purines, en estas plantas se mezclan con otras sustancias tales como estiércoles, restos agroindustriales, residuos urbanos

orgánicos, grasas, harinas, etc. El proceso global puede verse sintetizado en la figura 19.

El proceso comienza con la recogida de los purines a tratar en una fosa de recepción dotada de un agitador que homogeniza el producto. Desde allí se bombea el purín hacia un digestor, donde tendrá lugar la biometanización (producción de gas metano por procesos de fermentación biológica). Posteriormente se adicionan al purín sustratos sólidos mediante un mecanismo de tornillo sin fin que transporta lentamente el material. El digestor está fabricado de hormigón armado y está dotado de calefacción, de manera que la temperatura en el interior es de 40°C aproximadamente y posee unas palas que mantienen homogenizado el producto a digerir. El efluente digerido se bombea a un tanque de almacenamiento desde donde se retira para su aplicación directa en agricultura como enmienda orgánica. El biogás obtenido en el proceso, previamente deshumidificado y desulfurizado, es llevado posteriormente a los motores de cogeneración, con un rendimiento eléctrico aproximado del 40%. La electricidad generada en el proceso es vendida a la red eléctrica y el calor producido se reutiliza en cubrir la demanda térmica de la planta.

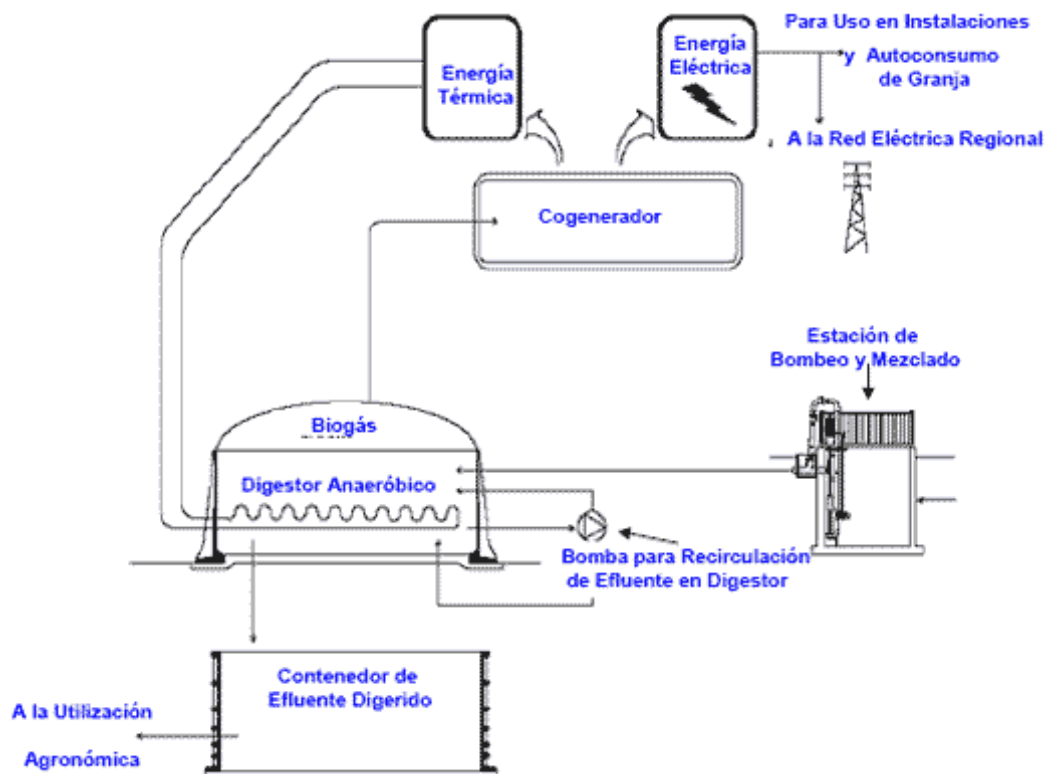


Figura 19. Funcionamiento de una planta básica de cogeneración con tratamiento de purines.

Fuente: www.engormix.com

- c) **Plantas de compostaje:** el funcionamiento de este tipo de plantas se detalla a continuación basándose en las plantas situadas en cinco poblaciones de la Comunidad Valenciana: Todolella, Albocàsser, Sant Mateu, Vall d’Alba y Salzadella, pertenecientes a un Plan Piloto promovido en la provincia de Castellón con la financiación de las distintas administraciones, con el objetivo de gestionar de una manera adecuada los purines generados en las granjas y que constituyen un grave problema a la hora de eliminarlos de forma segura, práctica y económica.

En las plantas de Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella se desarrolla una evaporación y compostaje de los purines brutos, trasladándose el compost sin madurar hasta la planta de Vall d’Alba en la que se realiza la maduración y transformación en abono órgano-mineral con la adición de los nutrientes necesarios. La cantidad de abono prevista que se producirá en esta planta es de 40.000 toneladas al año. En todas las plantas se utiliza como material

soporte para la fabricación del compost, tanto estiércoles secos producidos por la ganadería de la zona, como virutas de monte provenientes de podas, permitiendo así la valorización de estos otros residuos.

Para la gestión del purín bruto como abono directo se diseñó la ubicación de balsas de recepción con una capacidad total de 80.000 m³. La ubicación correcta de estas balsas es un condicionante necesario para el buen funcionamiento del sistema, ya que debe facilitar su uso por parte de usuarios.

A continuación, se describe el proceso de compostaje que se sigue en la planta situada en Vall d'Alba. Se ha seleccionado esta planta, puesto que constituye el núcleo central del proceso como receptora de los productos de compostaje de todas las demás y es la que reúne todos los procesos en un único emplazamiento físico, ya que en la planta de Todoella no se obtiene el producto final (pellet), y se transportan los sólidos de maduración de esta planta a la planta de Vall d'Alba para completar el proceso.

En primer lugar, los purines que llegan a la planta son depositados en una balsa receptora totalmente impermeabilizada (fig. 20) para pasar de ahí a la centrífuga (fig. 21) a través de un filtro de 40 µm que separa la fase líquida de la fase sólida.



Figura 20. Balsa receptora de purines.



Figura 21. Centrífuga.

Procesado de la fase líquida: una vez que sale de la centrifuga, el líquido pasa a una balsa anaerobia (fig. 22), donde permanecerá al menos durante 100 días. Durante este tiempo en esta balsa se producen procesos de

fermentación biológica con producción de gas metano entre otros y reducción de nitrógeno gracias a la adición de bacterias.

Esta balsa dispone de un sistema de refluo y de un sistema de recirculación que permite que los lodos precipitados en el fondo pasen nuevamente por la centrífuga.



Figura 22. Balsa anaerobia de la planta de tratamiento integral Vall d'Alba.

De la balsa anaerobia, el líquido pasa a dos balsas de fermentación aeróbica. La primera de ellas (fig. 23) posee un dispositivo de aireación mediante inyectores sumergidos. La segunda balsa de aerobiosis (fig. 24) oxigena el líquido mediante tres brazos de aireación superficial. En ambas balsas el líquido permanece durante 8 días.



Figura 23. Balsa de aerobiosis 1 Vall d'Alba.



Figura 24. Balsa aerobiosis 2 Vall d'Alba.

Una vez finalizado el proceso anaeróbico-aeróbico, el líquido obtenido es entonces trasladado a la balsa de stock, en la cual a diferencia de las otras balsas se puede apreciar crecimiento de pequeñas comunidades de algas, que son indicadores de una calidad óptima en términos biológicos, del efluente obtenido.

Procesado de la fase sólida: El producto sólido separado durante la centrifugación es conducido a la nave de fermentación para, después de ser mezclado con materiales vegetales y otros estiércoles procedentes de gallina, oveja y vaca, ser introducido en los túneles de fermentación. El sustrato vegetal ayuda a mantener una humedad en la biomasa a tratar, además de dar consistencia al producto, el cual durante los 10 primeros días de fermentación será humectado mecánicamente con la ayuda de maquinaria (fig. 25 y 27), con el líquido obtenido en la fase descrita anteriormente y que permanece hasta su uso en la balsa de stock.



Figura 25. Maquinaria empleada en túneles de fermentación.

FUNCIONAMIENTO DE LA PLANTA DE VALL D'ALBA



Figura 26. Funcionamiento de la planta con tratamiento integral de purines Vall d'Alba.

El tiempo total de fermentación en los túneles (fig. 28) es de unos 28 días, periodo durante el cual la mezcla sólida alcanza temperaturas de hasta 65°C debido a la actividad biológica fermentadora. Una vez concluido este proceso, el producto final de los túneles de fermentación es llevado a la nave de maduración, en donde permanecerá 90 días más hasta su definitivo procesamiento para transformarlo en el producto final en forma de extrusionado "pellet" y que es el que saldrá definitivamente al mercado.

FASE DE FERMENTACIÓN EN TÚNELES

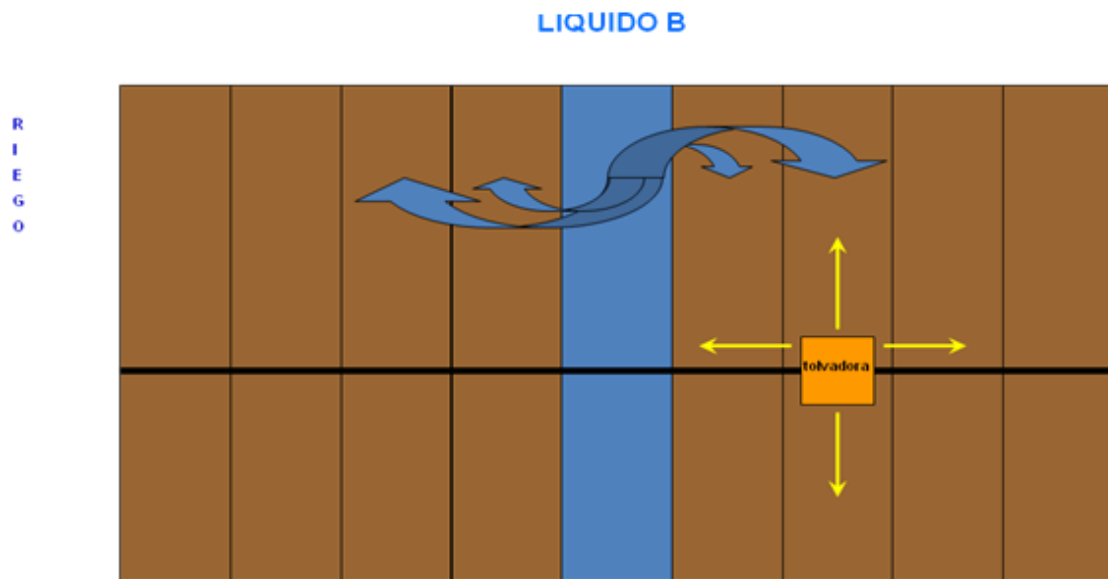


Figura 27. Esquema de la fase de fermentación en túneles con humectación.



Figura 28. Túneles de fermentación y canal de riego central.

Por otra parte, cabe destacar algunos aspectos importantes en el funcionamiento del proceso en conjunto y que podrían ser elementos a tener en cuenta en el presente estudio de detección del VHE en el procesado general.

A continuación se detallan varias consideraciones en el caso de las plantas de Salzadella, Albocàsser y Sant Mateu, en las cuales los purines que llegan no son sometidos a procesos de separación de fases y por lo tanto el sistema de compostaje varía. En estas plantas el purín que llega a ellas es

depositado al igual que en Vall d'Alba y Todolella, en una balsa receptora de iguales características, pero a diferencia del proceso que se lleva a cabo en las plantas con tratamiento integral, aquí el purín no es sometido a centrifugación, separación de fases y tratamiento separado, sino que el purín crudo, es llevado directamente a los túneles de fermentación para humectar sin procesado previo alguno, a la matriz sólida vegetal mezclada con otros estiércoles, lo que podría suponer tasas de depuración menos eficientes en el producto final de estas plantas. Dicho producto final es llevado a la planta de Vall d'Alba para ser introducido en la nave de maduración junto con otras partidas procedentes de las otras plantas, aumentando así el hipotético riesgo de contaminación de unas partidas "más depuradas" con otras "menos depuradas" y por lo tanto susceptibles de albergar patógenos.

2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la Comunidad Valenciana se produce una gran cantidad de purines debido al alto número de explotaciones porcinas con las que cuenta su territorio. Una mala gestión de los mismos puede convertirse en un problema de salud pública, con serios inconvenientes tales como: malos olores, contaminación de suelos y aguas por excesiva nitrificación y por último, diseminación de agentes patógenos.

En este sentido, anteriores estudios realizados en esta Comunidad (Fernández Barredo y col. 2006 y 2007), identificaron el VHE en el 50% de las fosas de purines en 21 granjas de cerdos situadas en la misma región geográfica en la que se llevó a cabo nuestro estudio. Por otra parte, otro estudio realizado por nuestro grupo de investigación (Galiana y col. 2010), estableció como factor de riesgo para contraer la hepatitis E, el contacto directo con ganado porcino. Estos hechos indican que una gran parte de los purines que producen las granjas están contaminados por VHE y pueden transmitir la enfermedad al ser humano.

Todo lo expuesto anteriormente revela que las actuaciones económicas derivadas sobre el medio ambiente influyen decisivamente en su calidad y afectan de modo significativo a la salud de las personas (Bigras-Poulin y col. 2004). Centrándonos sólo en el caso de hepatitis producidas por el VHE muchos son los ejemplos que corroboran estas cifras, tanto en zonas endémicas como en áreas consideradas tradicionalmente no endémicas como es el caso de España (Buti y col. 2004; Mateos y col. 2006; Pérez-Gracia y col. 2004; Pérez Gracia y col. 2012) y que van adquiriendo mayor importancia y relevancia sanitaria con el transcurso de los años.

Por ello, el desarrollo de proyectos como el plan piloto de la provincia de Castellón implantado en 2001, que garanticen que la aplicación de purines se realice con las mejores garantías higiénico-sanitarias es una prioridad en la política medio-ambiental y de salud pública.

Con el fin de evaluar la eficacia de los procesos que se realizan en dicho Plan Piloto en relación a la eliminación del VHE en los purines que llegan a estas plantas, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Detectar el VHE en muestras de purines procedentes de granjas de la Comunidad Valenciana que llegan a las plantas de compostaje que forman parte del Plan Piloto.
2. Detectar y valorar la presencia del VHE durante las diferentes fases del proceso de tratamiento de purines llevado a cabo en los distintos tipos de plantas muestreadas.
3. Determinar qué procesos del tratamiento realizado en las plantas, son los que producen una mayor tasa de inactivación del VHE.
4. Evaluar la presencia del VHE en el compost en forma de pellet que es comercializado como abono orgánico, y que constituye el producto final del proceso.
5. Comparar y evaluar las dos técnicas de detección del ARN-VHE: la RT-PCR a tiempo real y la RT-nested-PCR.
6. Analizar filogenéticamente los aislados del VHE detectados en las plantas de tratamiento de purines, para establecer homologías y similitudes con cepas humanas y porcinas.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron muestras obtenidas de las plantas del Plan Piloto de tratamiento de purines promovido en la provincia de Castellón. La implantación de este servicio pretende ser pionero en ofrecer un tratamiento global a los purines, tratando los excedentes hasta lograr un abono orgánico mineral que al comercializarse cubra los gastos derivados de su tratamiento.

Dicho Plan Piloto se implantó en la provincia de Castellón, ya que según la información ofrecida por el Plan de Gestión de Residuos Agropecuarios (PGRA) de la Conselleria de Territori i Habitatge, esta provincia es la que más purines produce con un total de 1.069.085 Tm/año (fig. 29), que representa el 53% de la producción total en la Comunidad Valenciana.

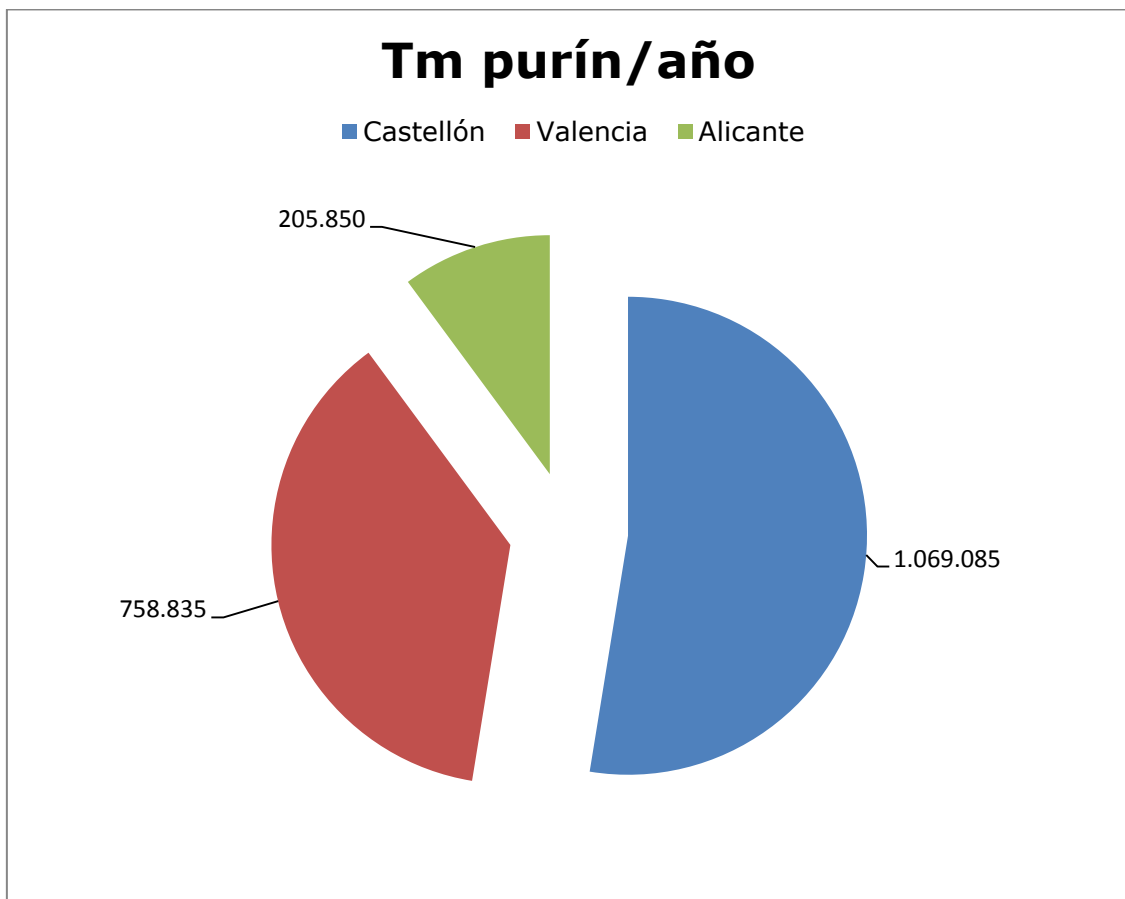


Figura 29. Producción de purines (Tm/año) en la Comunidad Valenciana distribuida por provincias.

Fuente: Conselleria de Territori i Habitatge. Plan de Gestión Residuos Agropecuarios. Año 2000.

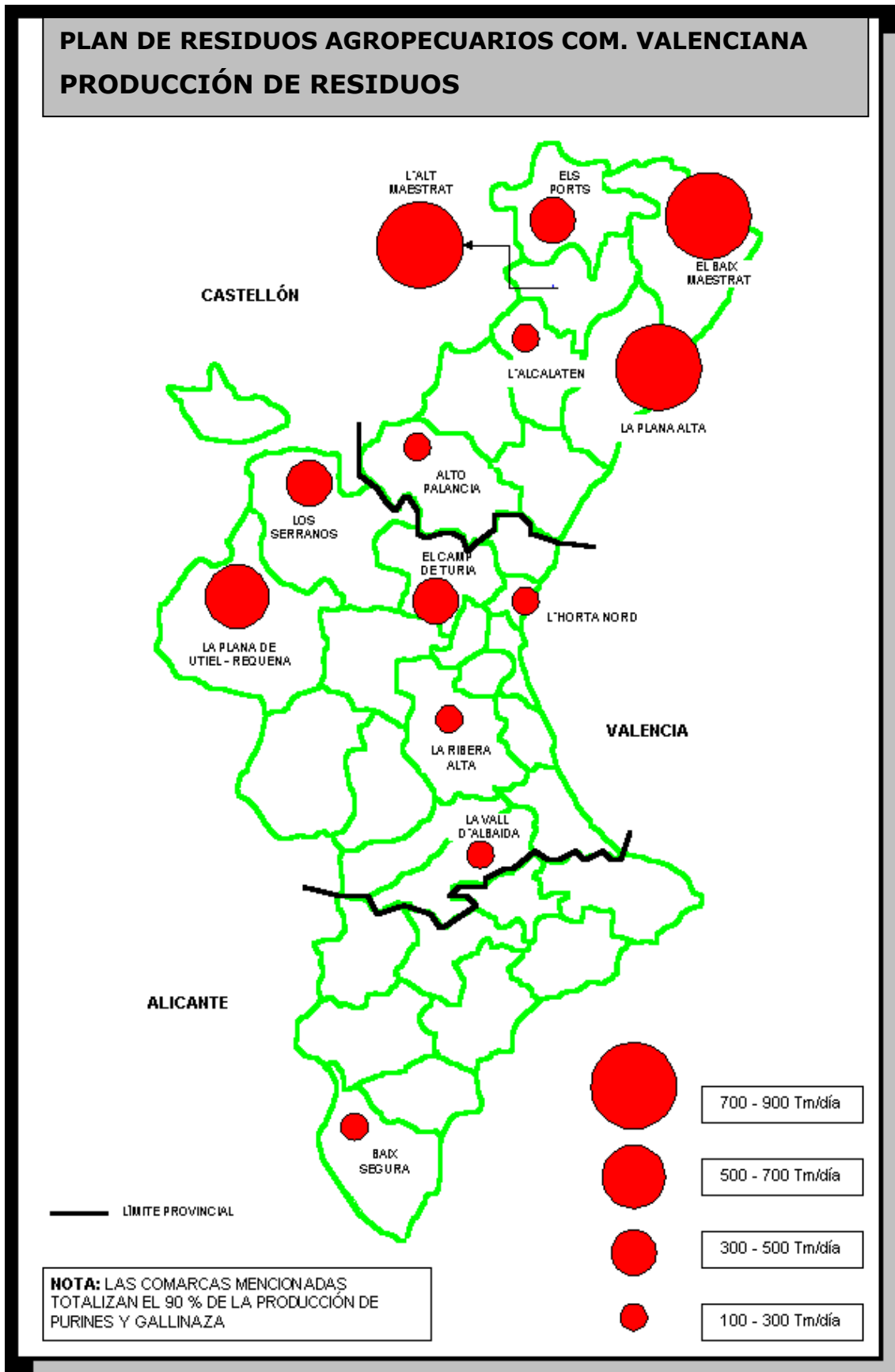


Figura 31. Mapa de producción de residuos ganaderos por comarcas.

Fuente: Conselleria de Territori i Habitatge. Año 2007.

Adicionalmente, en la ubicación de las plantas se tuvo en cuenta el déficit o exceso de subproductos ganaderos para nutrición de los suelos agrícolas (fig.31), así como el balance positivo o negativo de nutrientes en suelos agrícolas (fig. 32).

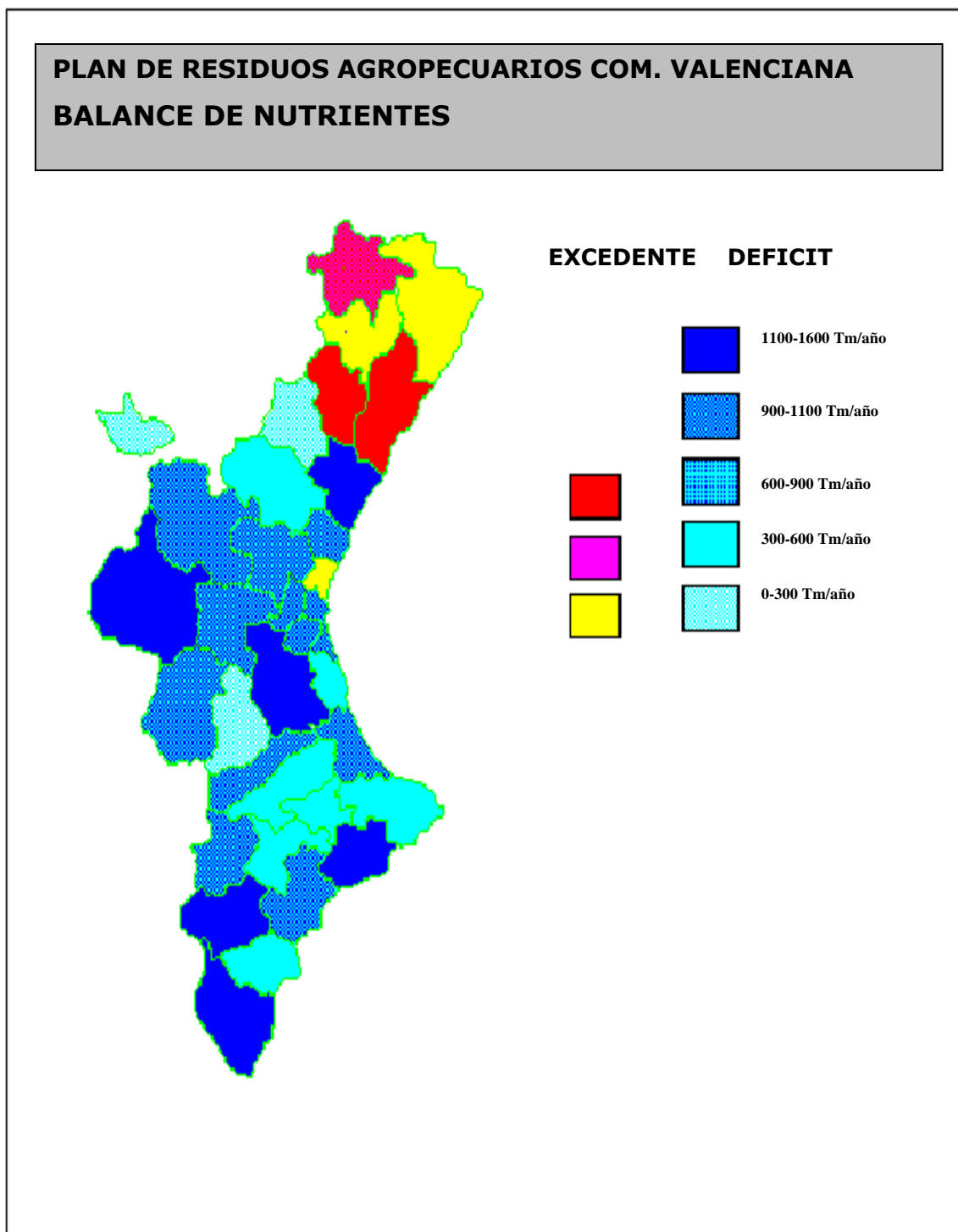


Figura 32. Mapa de balance de nutrientes en la Comunidad Valenciana.

Fuente: Conselleria de Territori i Habitatge. Año 2007.

3.1. MUESTRAS.

Los muestreos se realizaron en las plantas situadas en Vall d'Alba, Sant Mateu, Albocàsser, Salzadella y Todolella. En cada una de las plantas se tomaron muestras de cada una de las fases de depuración que en ellas se realizaban.

Identificación de las muestras.

Se estableció un código de 4 dígitos para clasificar las muestras de una manera abreviada atendiendo a su naturaleza sólida o líquida, punto del proceso donde fue recogida, fecha y planta muestreada.

Tipo muestra	Punto de proceso	Fecha	Planta
L: líquido	0: Balsa receptora		
	2: BA ^(*) punto 0		
	21: BA punto 1	A: 21/07/2008	
	22: BA punto 2	B: 24/11/2008	
	23: BA punto 3	C: 6/03/2009	A: Albocàsser
	24: BA punto 4	D: 22/06/2009	M: Sant Mateu
	3: Balsa aerobia 1	E: 22/01/2010	V: Vall d'Alba
	4: Balsa aerobia 2	F: 15/07/2010	S: Salzadella
S: sólido	R: Canal riego	G: 2/02/2011	T: Todolella
	7: Centrífuga	H: 6/06/2011	
	I: Inicio túnel	K: 2/04/2012	
	F: Final túnel		
	P: Pellet		

(*) Balsa anaerobia.

Así, por ejemplo la muestra L0AV se correspondería con una muestra líquida (L), tomada en la balsa receptora (0), en el muestreo realizado el día 21 de julio de 2008 (A) en la planta de Vall d'Alba (V).

Se detallan a continuación los puntos de muestreo de las plantas (marcados con puntos rojos), se especifican entre paréntesis los códigos de identificación de las muestras (fig. 33 y 34).

a) Plantas sin tratamiento integral: Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella.

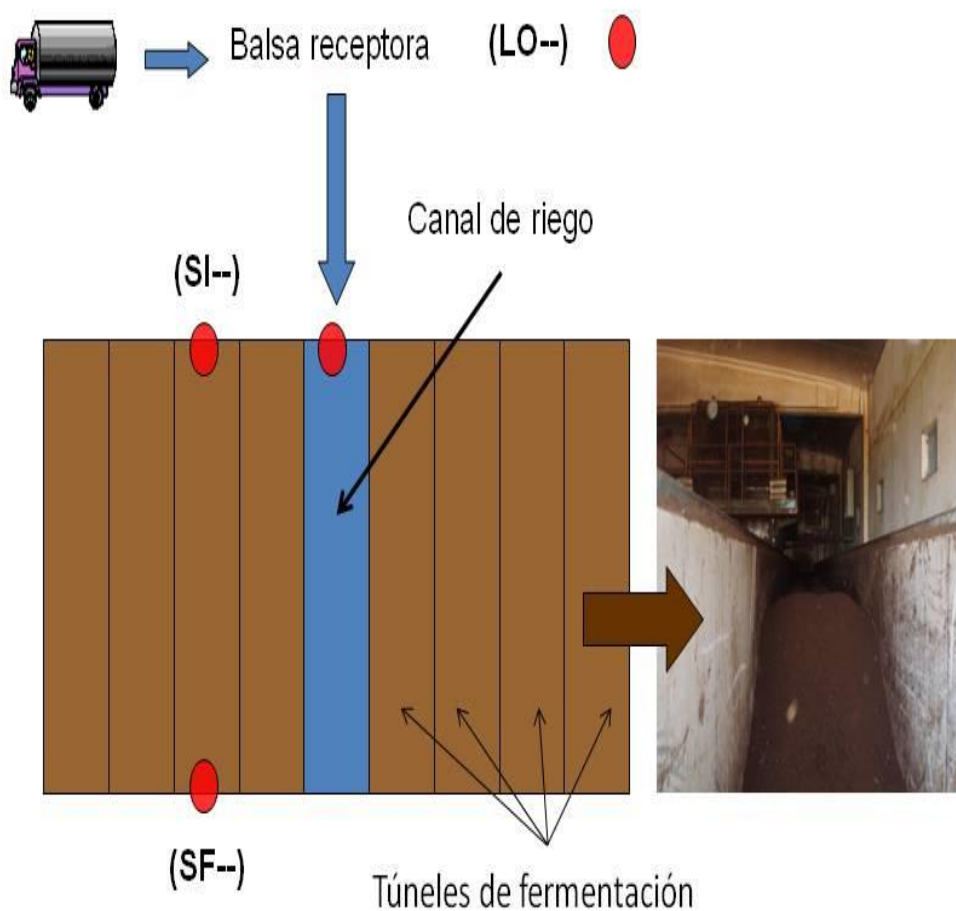


Figura 33. Puntos de muestreo en plantas sin tratamiento integral.

b) Plantas con tratamiento integral: Vall d'Alba y Todolella^(*).

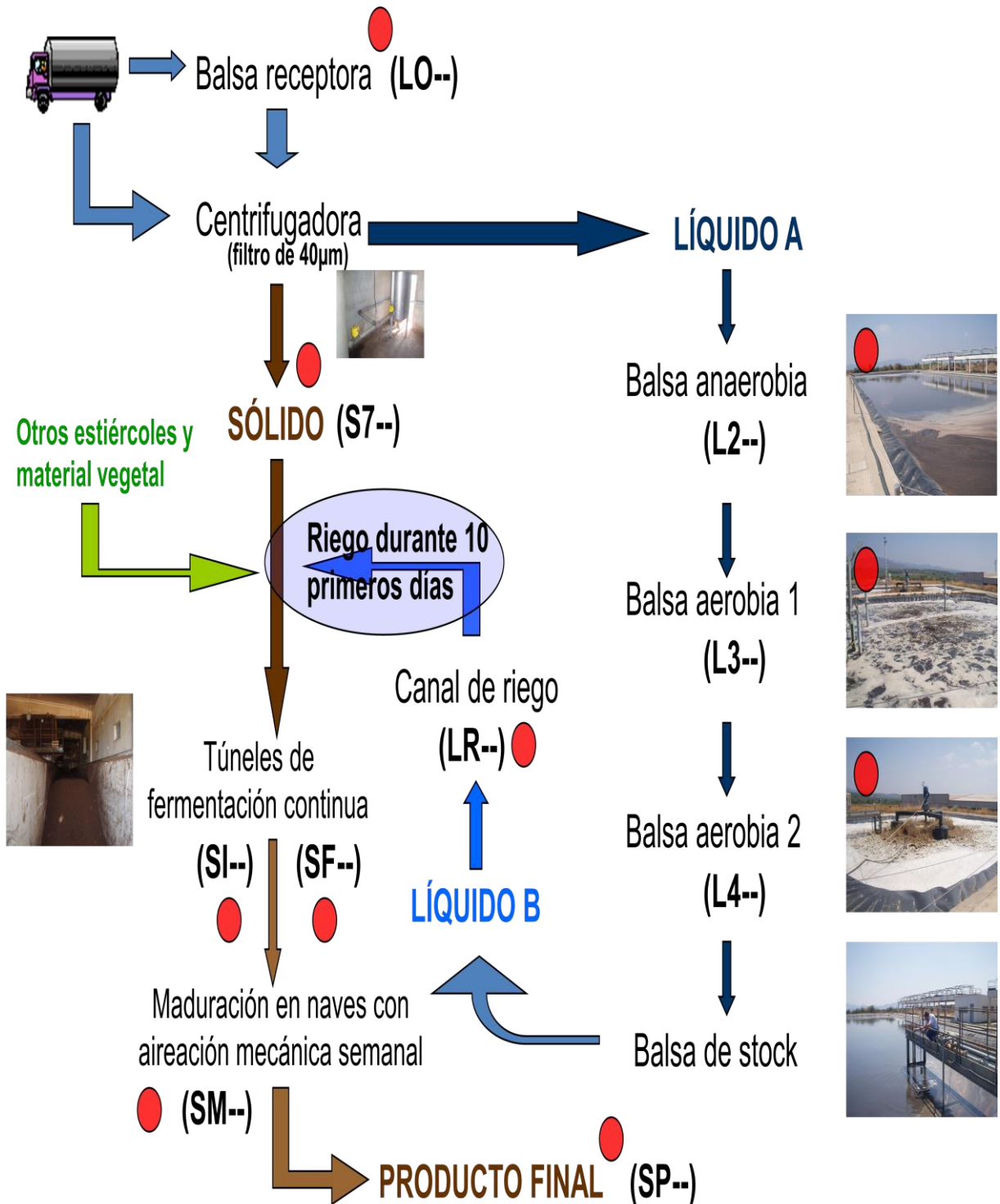


Figura 34. Puntos de muestreo en plantas sin tratamiento integral.

^(*) En la planta de Todolella no procesan producto final (pellet), por lo tanto no existe este tipo de muestra para esta planta.

El número total de muestras recogidas fue de 189, de las cuales 120 fueron líquidas y 69 sólidas. El número de muestras líquidas tomadas fue de 120 (63,5%), mayor al de muestras sólidas, 69 (36,5%), debido al mayor número de procesos a los que es sometida esta fracción del purín (fig. 35).

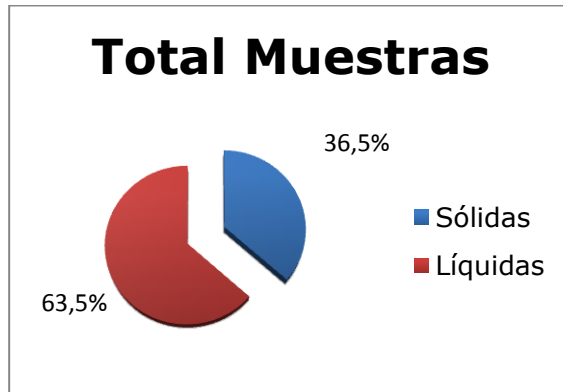


Figura 35. Distribución porcentual del total de muestras entre sólidas y líquidas.

Distribución muestras líquidas según punto de recogida.

Se recogieron 60 (50%) muestras de la balsa de anaerobiosis. Es un número elevado en relación al total de muestras líquidas, debido a la gran cantidad de producto existente en esta balsa y la consecuente necesidad de muestrear en diferentes puntos de la misma. Además se recogieron 18 (15%) muestras en las balsas receptoras, 24 (20%) muestras en las balsas de aerobiosis y 18 (15%) muestras en los canales de riego. (fig. 36)

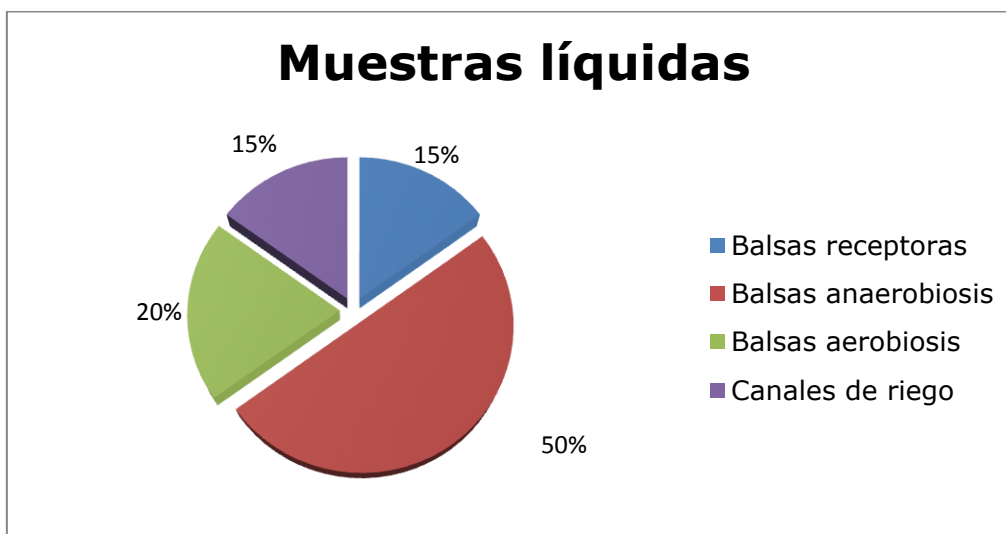


Figura 36. Distribución porcentual muestras líquidas según punto de muestreo.

Distribución muestras sólidas según punto de recogida.

El total de muestras sólidas recogidas fue de 69 (36,51%), distribuidas en los siguientes puntos de muestreo: 12 (17,39%) sólidos de centrífuga, 36 (52,17%) muestras tomadas en el inicio y el final de los túneles de fermentación, 12 (17,39%) muestras de sólido en naves de maduración y 9 (13,04%) muestras de pellet o producto final. (fig. 37)

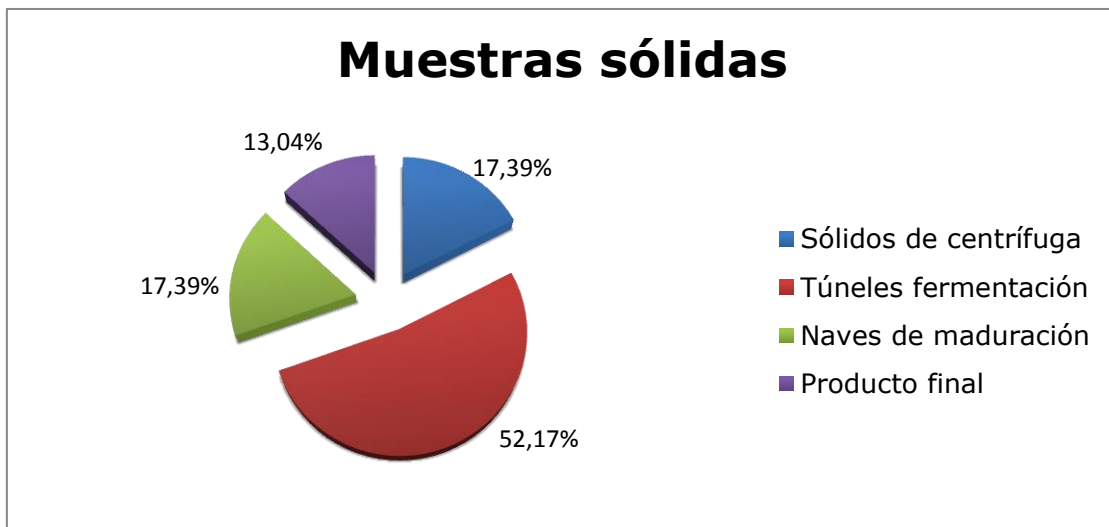


Figura 37. Distribución porcentual muestras sólidas según punto de muestreo.

Muestras según planta de tratamiento.

La planta de tratamiento en la que más muestras se recogieron, 126 (67%), fue Vall d'Alba (fig.38), debido al mayor número de procesos que reúne y a la mayor cantidad de purín tratado en la misma. Hay que destacar que la planta de Vall d'Alba es la única que se encarga de procesar el producto final (pellet), en este sentido los productos de las naves de maduración de Todolella son transportados a esta planta para ser sometidos a este proceso.

En la planta de Albocàsser, sólo se pudo realizar 1 recogida de muestras, ya que por problemas técnicos se paralizó el funcionamiento de la misma y no se pudieron realizar más muestreos.

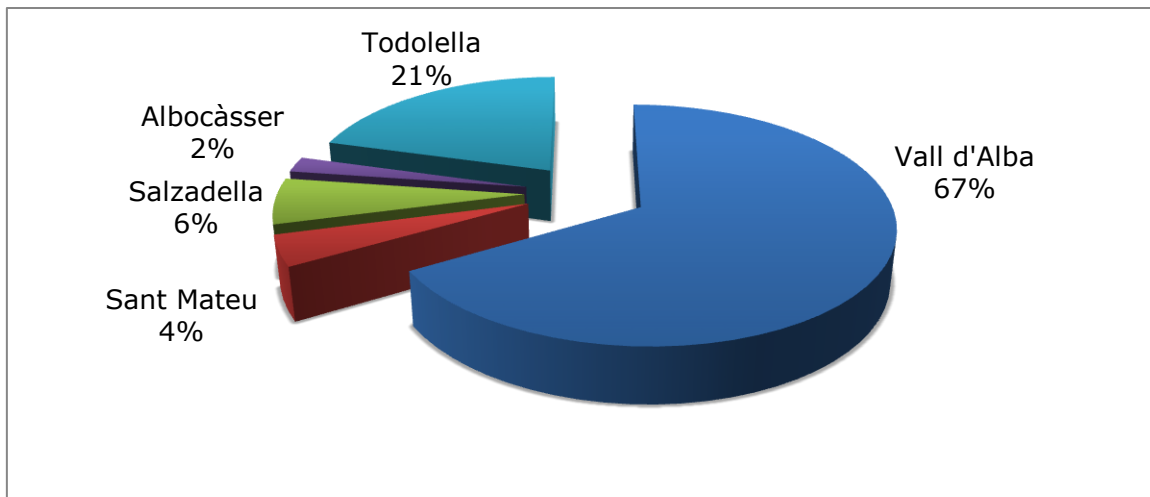


Figura 38. Distribución porcentual del total de muestras recogidas según la planta muestreada.

**Muestras recogidas en las plantas con tratamiento integral:
Vall d'Alba y Todolella.**

En las plantas de tratamiento integral de Vall d'Alba y Todolella se recogieron 165 (87,30%) de las 189 muestras recogidas, de las cuales 108 (65,45%) fueron líquidas y 57 (34,55%) fueron sólidas (fig. 39). El mayor número de muestras líquidas es debido al gran volumen de fracción líquida que se obtiene tras separar los purines en la centrífuga, y al mayor número de procesos a los cuales es sometida esta parte del purín.

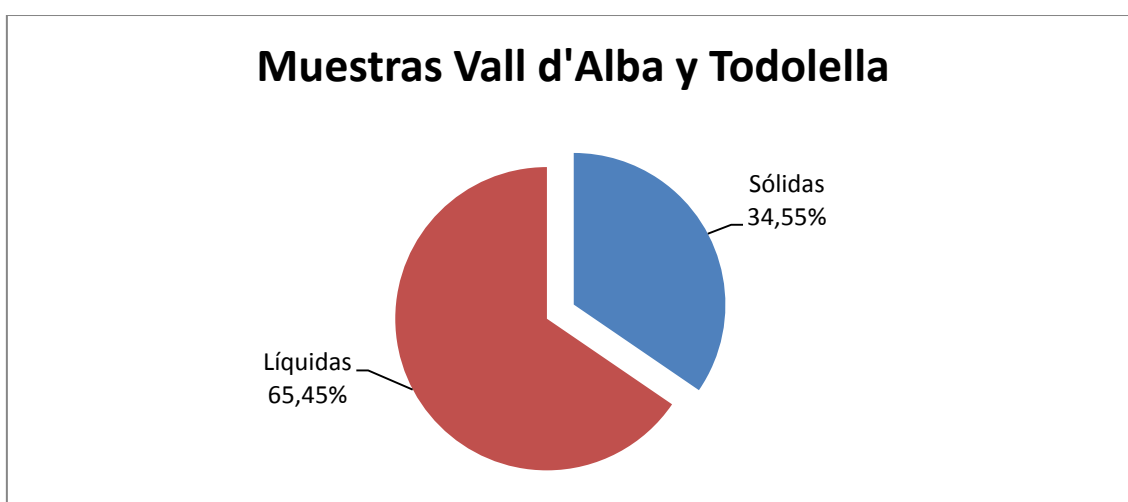


Figura 39. Porcentaje según muestras sólidas o líquidas en Vall d'Alba y Todolella.

Muestras recogidas en las plantas sin tratamiento integral: Salzadella, Sant Mateu y Albocàsser.

Se recogieron un total de 24 muestras (12,7% del total) en las 3 plantas que no realizaban un tratamiento integral de los purines, 12 (50%) fueron líquidas y 12 (50%) fueron sólidas. Estas muestras se distribuyeron según los siguientes puntos de muestreo (fig. 40): 6 (25%) muestras líquidas en balsas receptoras, 6 (25%) muestras líquidas en canales de riego, 6 (25%) muestras sólidas del tramo inicial de los túneles de fermentación y 6 (25%) muestras sólidas del tramo final de los túneles de fermentación.

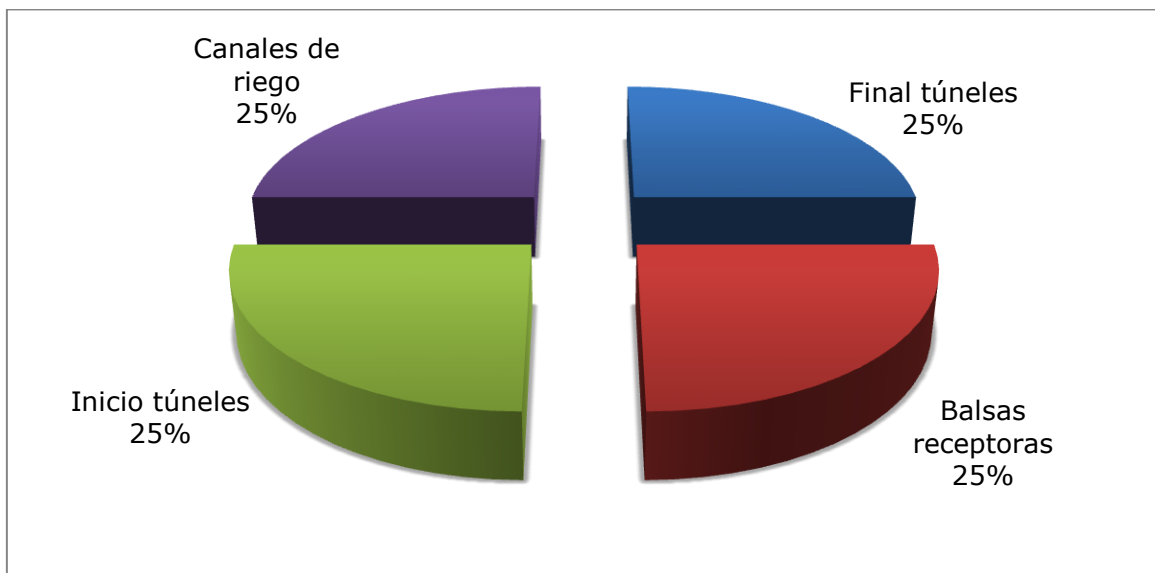


Figura 40. Distribución porcentual según punto de muestreo de las muestras recogidas en plantas sin tratamiento integral de purines.

Procedimiento de muestreo.

Las muestras se recogieron en tubos tipo falcon estériles de 50 mL con ayuda de un mango extensible al cual se acoplaban los mismos (fig. 41), siendo refrigeradas en nevera portátil hasta su llegada al laboratorio donde fueron procesadas en un tiempo inferior a 24 horas. El muestreo se realizó con todas las medidas oportunas para evitar la contaminación cruzada, tales como cambio de guantes y lavado con alcohol de los utensilios de muestreo. Adicionalmente se utilizaron recipientes colectores nuevos en la recogida de cada muestra.



Figura 41. Toma de muestras líquidas en balsas de aerobiosis.

3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Una vez recogidas las muestras, se centrifugaron en tubos falcon de 15 mL, a una temperatura de 4°C durante 1 hora a 3000 r.p.m. en una centrífuga DIGICEN-R; ORTO ALRESA, España. A continuación se transfirieron 1,5 mL del sobrenadante a tubos eppendorf estériles y se procedió a una segunda centrifugación a 14000 r.p.m. durante 10 minutos. Finalmente, se conservó el sobrenadante a una temperatura de -80°C hasta la extracción del ARN vírico.

Con las muestras sólidas se siguió el mismo procedimiento tras una dilución previa 1/10 (peso/volumen) en PBS estéril.

3.2.1. Extracción del ARN vírico.

Para la extracción del ARN vírico se utilizó un método comercial (QIAmp® Viral Mini Kit; Qiagen, USA) cuyo principio se basa en la adhesión del ARN a una membrana de silica-gel ubicada en una mini columna para posteriormente ser eluído con un tampón especial (fig. 42). Durante el proceso, se cumplieron estrictamente todas las medidas de precaución necesarias para evitar la contaminación cruzada de las muestras (uso de guantes, pipetas con filtro, espacio de trabajo descontaminado de una extracción a otra y separación física de las zonas de preparación de la

mezcla, realización de la PCR y detección de los productos amplificados). El procedimiento fue el siguiente:

- Se añadieron 140 μ l de muestra (sobrenadante alicuotado anteriormente) a 560 μ l de tampón de lisis 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 incubó 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 objeto de hacer descender las gotas de muestra desde la tapa del tubo y evitar contaminaciones de un tubo a otro al pipetear.
- Se añadieron 560 μ l de etanol absoluto (Panreac[®], España) y se agitaron en el vórtex durante 15 segundos. De este modo se consigue 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 realizaron 2 filtraciones con 2 tipos de tampón de lavado con unas características especiales 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.

- Finalmente, se añadió un tampón de elución que desprendió el ARN de la membrana mediante una centrifugación a 6000xg durante un minuto.
- El ARN obtenido se procesó inmediatamente para evitar que las RNAsas lo degradaran. El ARN restante, después de ser usado, se almacenó a -80°C.

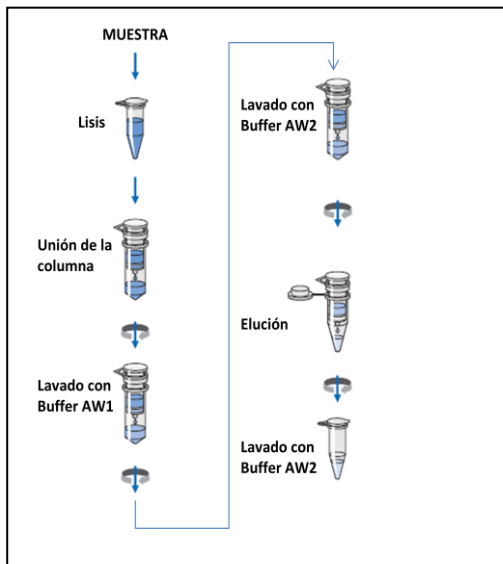


Figura 42. Pasos seguidos en el proceso de extracción del material genético empleando columnas de silica-gel.

3.2.2. Transcripción inversa del ARN vírico.

El ARN obtenido para poder ser amplificado y detectado por la reacción en cadena de la polimerasa, tiene que transformarse previamente en ADN complementario (ADNc).

El procedimiento fue el siguiente:

- Se mezclaron 10µl del ARN extraído (1ng- 5 µg), 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 4) 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 de nucleótidos 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 brevemente el tubo para asegurarnos una mezcla adecuada de todos los reactivos, dado que se trabaja con unos volúmenes muy pequeños.

- 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 µl (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 a la retrotranscriptasa y detener la reacción.

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

3.2.3. 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 cebadores 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 5) .

Tabla 5. Secuencias de los cebadores empleados en la amplificación del ADN.

	CEBADORES	SECUENCIA
EXTERNOS	3156N	5'-AATTATGCC(T)CAGTAC(T)CGG(A)GTTG-3'
	3157N	5'-CCCTTA(G)TCC(T)TGCTGA(C)GCATTCTC-3'
INTERNOS	3158N	5'-GTT(A)ATGCTT(C)TGCATA(T)CATGGCT-3'
	3159N	5'-AGCCGACGAAATCAATTCTGTC-3'

Los cebadores se obtuvieron de Huang y col. 2002, y están basados en las secuencias de 18 cepas humanas diferentes de VHE y en la cepa prototipo porcina de Estados Unidos. Estos cebadores son universales, es decir, pueden amplificar cualquier genotipo del VHE.

Para llevar a cabo esta reacción, se utilizaron 5 µl de ADNc en un volumen total de mezcla de reacción. La composición de dicha mezcla se describe en las tablas 6 y 7. Todos los pasos para elaborar dicha mezcla se realizaron en una cabina de flujo laminar con el objeto de evitar contaminaciones.

Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción para la primera PCR. C_i: concentración inicial. C_f: concentración final.

REACTIVO	C _i	VOLUMEN	C _f
Agua bidestilada estéril	---	30 µl	---
Tampón de reacción (Applied Biosystems,USA)	10X	5 µl	1X
Mezcla de dinucleótidos dTTP, dATP, dCTP, dGTP,)(Applied Biosystems,USA)	10 mM	4 µl	0,2 µM
MgCl ₂ (Applied Biosystems,USA)	23 mM	3 µl	1,5 µM
Taq polimerasa (Amplitaq gold®, Applied Biosystems,USA)	5U/ µl	0,5 µl	2,5 U/50 µl de reacción
Cebador 3156N (Qiagen®, Operon®)	20 µM	1,25 µl	0,5 µM
Cebador 3157N (Qiagen®, Operon®)	20 µM	1,25 µl	0,5 µM
Muestra de ADN _c	---	5 µl	---
Volumen total de reacción	50 µl		

Tabla 7. Composición de la mezcla de reacción para la segunda PCR. C_i: concentración inicial. C_f: concentración final.

REACTIVO	C _i	VOLUMEN	C _f
Agua bidestilada estéril	---	30 µl	---
Tampón de reacción (Applied Biosystems,USA)	10X	5 µl	1X
Mezcla de dinucleótidos dTTP, dATP, dCTP, dGTP,)(Applied Biosystems,USA)	10 mM	4 µl	0,2 µM
MgCl ₂ (Applied Biosystems,USA)	23 mM	3 µl	1,5 µM
Taq polimerasa (Amplitaq gold®, Applied Biosystems,USA)	5U/ µl	0,5 µl	2,5 U/50 µl de reacción
Cebador 3158N (Qiagen®, Operon®)	20 µM	1,25 µl	0,5 µM
Cebador 3159N (Qiagen®, Operon®)	20 µM	1,25 µl	0,5 µM
Muestra de ADN _c de la primera PCR	---	5 µl	---
Volumen total de reacción	50 µl		

En la tabla 8 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, cuya función es evitar amplificaciones inespecíficas a temperatura ambiente.

A continuación se realizaron 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y polimerización, para concluir con un ciclo 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).

Tabla 8. Protocolo de amplificación del ADN_c.

Proceso	Valores	Ciclos
Desnaturalización (Hot Start)	95°C / 9 minutos	1
Desnaturalización	94°C / 1 minuto	40
Hibridación	55°C / 30 segundos	
Polimerización	72°C / 1 minuto	
Polimerización residual	72°C / 7 minutos	1

El producto de la primera PCR, de 730 pares de bases de longitud, se utilizó como muestra para la segunda PCR. Se añadieron 5 µl 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. Al igual que el primero, se puede congelar a -80°C , o bien someterlo directamente a una electroforesis.

3.2.4. Electroforesis del producto amplificado.

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

- 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 $0,5 \mu\text{g/ml}$ para teñir el ADN.
- Se vertió sobre un molde en el que previamente se había colocado un peine para que cuando solidificara el gel dejase unos pocillos en los que cargar las muestras.
- Una vez solidificado el gel, se colocó dentro de la cubeta de electroforesis bañado en tampón TAE y se retiró el peine.
- A continuación, se mezclaron $5 \mu\text{l}$ de tampón de carga con $15 \mu\text{l}$ de producto final de 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 $3 \mu\text{l}$ del marcador de peso molecular más $5 \mu\text{l}$ de tampón de carga.
- Mediante una fuente de electroforesis (Power Pack 300Biorad[®], USA), se aplicó una corriente de 80 mV durante 1 hora a través del gel, la cual

genera un campo eléctrico responsable de la migración del ADN hasta una distancia proporcional a su peso molecular, en este caso el tamaño del fragmento es de 348 pares de bases.

3.3. RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.

Todas las muestras fueron analizadas también mediante RT-PCR a tiempo real.

Entre las diferentes variantes de la PCR a tiempo real, se decidió emplear la que utiliza sondas TaqMan[®] de hidrólisis debido a su mayor especificidad y sensibilidad en la detección de los diferentes genotipos de VHE en comparación con otras metodologías como la SYBR Green (Jothikumar y col. 2006; Enouf y col. 2006; Ward y col. 2009).

Las sondas TaqMan[®] llevan incorporadas un fluoróforo "reporter" FAM (fluoresceína) en el extremo 5' y un fluoróforo "quencher" BH1 (black hole 1) en el extremo 3' (fig. 43). La función del "quencher" es inhibir la fluorescencia del "reporter" cuando ambos están próximos entre sí. Estas sondas al ser específicas, hibridan con una región complementaria del ADN diana. Debido a la actividad exonucleasa de la ADN polimerasa, la sonda hibridada al fragmento a amplificar queda degradada, de manera que el fluoróforo "reporter" se libera del fluoróforo "quencher" emitiendo fluorescencia, que será directamente proporcional a la cantidad de ADN en la muestra (Jothikumar y col. 2006).

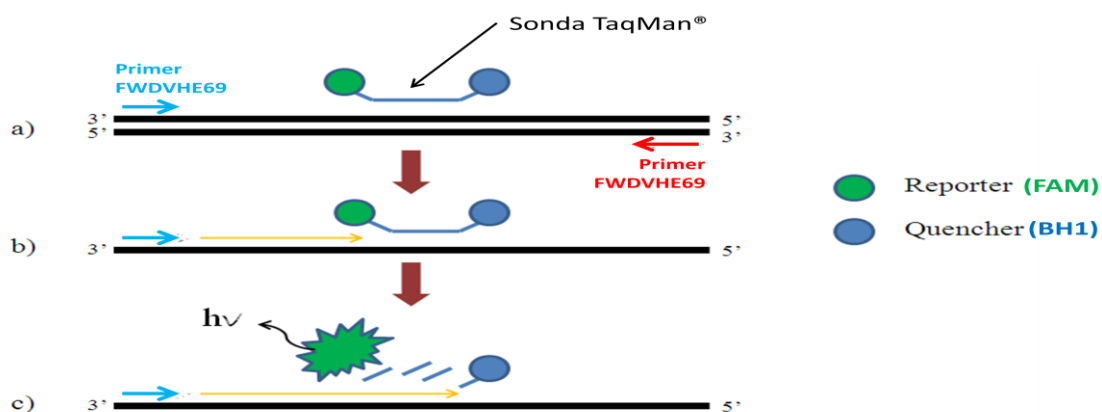


Figura 43. Funcionamiento de sonda TaqMan. a) Hibridación de la sonda con ADN diana. b) Elongación de la doble cadena de ADN por la ADN polimerasa. c) Hidrólisis enzimática de la sonda y emisión de fluorescencia por el fluoróforo reporter FAM (fluoresceína).

3.3.1. Realización de la curva estándar.

Para poder cuantificar el ADN obtenido en una PCR a tiempo real, es necesario realizar una curva estándar con una serie diluida de ADN diana de concentración conocida, con el objetivo de extrapolar los resultados de fluorescencia obtenidos en las muestras, con los resultados obtenidos en la curva estándar.

La curva estándar se elaboró a partir de diluciones conocidas de un plásmido que llevaba incorporado un fragmento con el ADN diana. La obtención de dicho plásmido se detalla a continuación.

3.3.1.1. Obtención del fragmento VHEClon69 para clonación por PCR.

Se amplificó mediante una RT-nested-PCR un fragmento de la región ORF3 de 69pb (VHEClon 69) a partir de ADN obtenido por retrotranscripción de ARN extraído de la cepa SpswCV2 perteneciente al genotipo 3 y con número de acceso al GenBank AY323506 (ver capítulo 3.2.1.), aislada en granjas porcinas de la Comunidad Valenciana (Fernández-Barredo y col. 2006). La región amplificada es una zona conservada en todos los genotipos.

En la tabla 9 se muestran los cebadores utilizados en la PCR para obtener el fragmento VHEClon69 (Jothikumar y col. 2006). Para su desarrollo se tuvieron en cuenta cepas de los 4 genotipos existentes de VHE, siendo por lo tanto universales en cuanto a la detección del virus. Para la transcripción inversa del ARN extraído se siguió el protocolo descrito en el capítulo 3.2.2., sustituyendo el cebador 3157N (tabla 4), por el REVVHE69 (tabla 9).

Tabla 9. Cebadores utilizados en la PCR para obtención del fragmento VHEClon69.

CEBADORES	SECUENCIA
FWDVHE69	5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'
REVVHE69	5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'

Para amplificar el fragmento a clonar en el plásmido, se utilizaron 5µl de ADN_c en un volumen total de 50µl de mezcla de reacción, cuya composición se detalla en la tabla 10. Se tuvieron en cuenta todas las medidas protocolarias para evitar contaminaciones.

Tabla 10. Composición de la mezcla de reacción para PCR VHEClon69. C_i: Concentración inicial. C_f: Concentración final.

REACTIVO	C _i	VOLUMEN	C _f
Agua bidestilada estéril	---	30 µl	---
Tampón de reacción (Applied Biosystems,USA)	10X	5 µl	1X
Mezcla de dinucleótidos dTTP, dATP, dCTP, dGTP,) (Applied Biosystems,USA)	10 mM	4 µl	0,2 µM
MgCl ₂ (Applied Biosystems,USA)	23 mM	3 µl	1,5 µM
Taq polimerasa (Amplitaq gold®, Applied Biosystems,USA)	5U/ µl	0,5 µl	2,5 U/50 µl de reacción
Cebador FWDVHE69 (Operon®,IZASA®)	20 µM	1,25 µl	0,5 µM
Cebador REVVHE69 (Operon®,IZASA®)	20 µM	1,25 µl	0,5 µM
Muestra de ADN _c obtenido por RT	---	5 µl	---
Volumen total de reacción	50 µl		

A continuación, se describe el protocolo de amplificación para la obtención del fragmento VHEClon69. Las temperaturas de hibridación se calcularon por el mismo procedimiento descrito en el capítulo 3.2.3., teniendo en cuenta las T_m proporcionadas por el fabricante de los oligonucleótidos. Se realizaron 10 ciclos iniciales a una temperatura de hibridación menor ($T=50^{\circ}\text{C}$), ya que al ser menos restrictiva para el alineamiento de los cebadores permitía obtener suficiente producto de partida para los posteriores 35 ciclos más restrictivos debido a la mayor temperatura a la que se producen, y así asegurar el éxito en la amplificación (Tabla 11).

Tabla 11. Protocolo amplificación fragmento VHEClon69.

PROCESO	VALORES	CICLOS
Desnaturalización (Hot Start)	95°C / 9 minutos	
Desnaturalización	94°C / 10 segundos	10
Hibridación	50°C / 20 segundos	
Polimerización	72°C / 15 segundos	
Desnaturalización	95°C / 10 segundos	35
Hibridación	55°C / 20 segundos	
Polimerización	72°C / 15 segundos	
Polimerización residual	72°C / 7 minutos	1

El producto obtenido de 69pb se confirmó mediante un gel de electroforesis según el procedimiento detallado en el capítulo 3.2.4., variando la composición del gel en agarosa a 3% en lugar del 2% utilizado en la observación de los productos de amplificación de la PCR anterior, debido al menor tamaño del fragmento.

3.3.1.2. Clonación en plásmido TOPO del fragmento VHEClon69.

Se obtuvieron mediante clonación en cepas bacterianas DH5α (Invitrogen®), copias del plásmido pCR®2.1-TOPO® que llevaban incorporado el fragmento VHEClon69. Este plásmido debido a sus características especiales, es utilizado para clonar productos obtenidos por PCR, ya que incorpora 2 extremos abiertos con 2 timinas terminales en los extremos 3', lo que permite la ligación de productos de PCR mediante la acción de un enzima Topoisomerasa I (Shuman 1991). Esta acción es posible debido a que la *Taq* Polimerasa empleada en la reacción de PCR, deja adeninas terminales en los extremos 5' de los amplicones obtenidos (fig. 44), permitiendo un clonaje tipo TA (Timina-Adenina) por parte de la Topoisomerasa I.

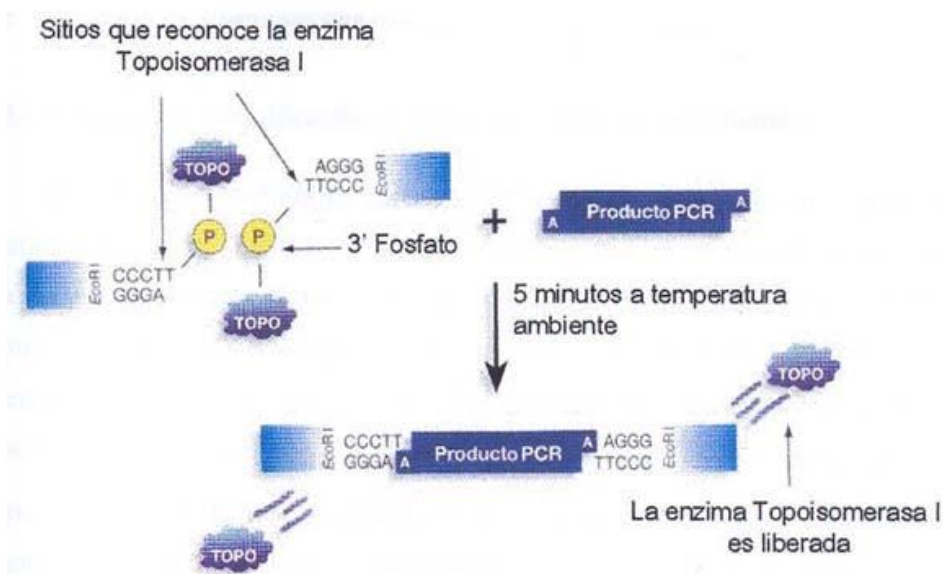


Figura 44. Mecanismo de ligación del fragmento VHEClon69 a plásmido TOPO mediante enzima Topoisomerasa I.

Se incubó la mezcla de reacción de clonación (Tabla 12) durante 5 minutos a temperatura ambiente (22-23°C). Transcurrido este tiempo se enfrió con hielo la mezcla, quedando el producto de PCR ligado al plásmido y preparado para la siguiente fase de clonación en las bacterias competentes DH5α.

Tabla 12. Composición mezcla de reacción para clonación del fragmento VHEClon69 en vector TOPO.

REACTIVOS	VOLUMEN
Producto PCR VHEClon69	2 µl
Solución salina 1.2 M NaCl 0.06 M MgCl ₂	1 µl
Agua bidestilada estéril	2 µl
Vector TOPO®	1 µl
Volumen final TOPO-VHEClon69	6 µl

3.3.1.3. Transformación de bacterias competentes DH5α® y selección de colonias con el inserto VHEClon69.

Para la obtención de copias del plásmido TOPO con el inserto VHEClon69, se procedió a clonar en bacterias competentes DH5α® el producto resultante del apartado anterior.

Para ello se mezclaron 2 µl de TOPO-VHEClon69 en un vial de 1,5 ml que contenía las células bacterianas One Shot® Chemically Competent *E.coli*. A continuación se incubó la mezcla en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se realizó un choque térmico introduciendo el vial con las bacterias competentes y el plásmido en un bloque térmico a 42°C durante 30 segundos, sin agitación.

Una vez extraído el vial del bloque térmico, se añadió a la mezcla 250 µl de medio S.O.C. (Tryptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10mM, glucosa 20mM) y se agitó en posición horizontal a 37°C durante 1h a 200 rpm.

Posteriormente, la mezcla resultante se sembró por agotamiento en placas de medio selectivo LB con XGal, IPTG y ampicilina, precalentadas a una

temperatura de 37°C. El plásmido TOPO (fig. 45) contiene insertados genes de resistencia a la ampicilina y a la kanamicina, de manera que sólo las bacterias que hayan adquirido el plásmido serán resistentes al medio selectivo. A su vez, la correcta inserción del fragmento VHEClon69, impide posicionalmente la acción del gen *lacZα* que codifica para la enzima β-galactosidasa, impidiendo el correcto metabolismo de XGal por parte de las bacterias transformadas. Este hecho se apreciará en el crecimiento de colonias de color blanco, que estarán formadas por las bacterias que han adquirido el plásmido con el inserto deseado (fig. 46).

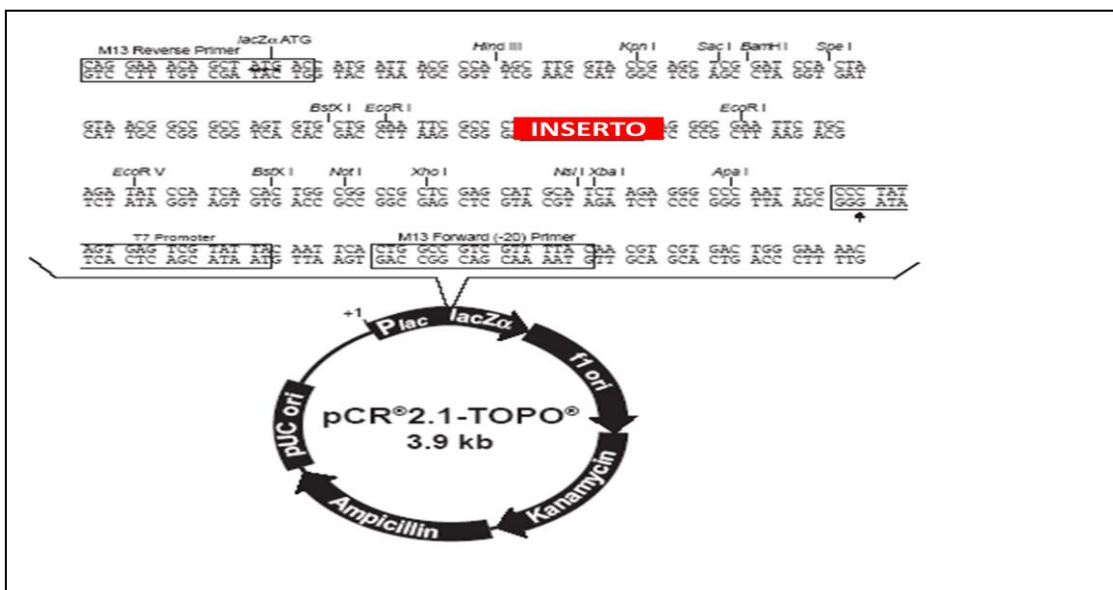


Figura 45. Mapa del plásmido pCR®2.1-TOPO®. Se detalla el lugar específico de unión del inserto VHEClon69.

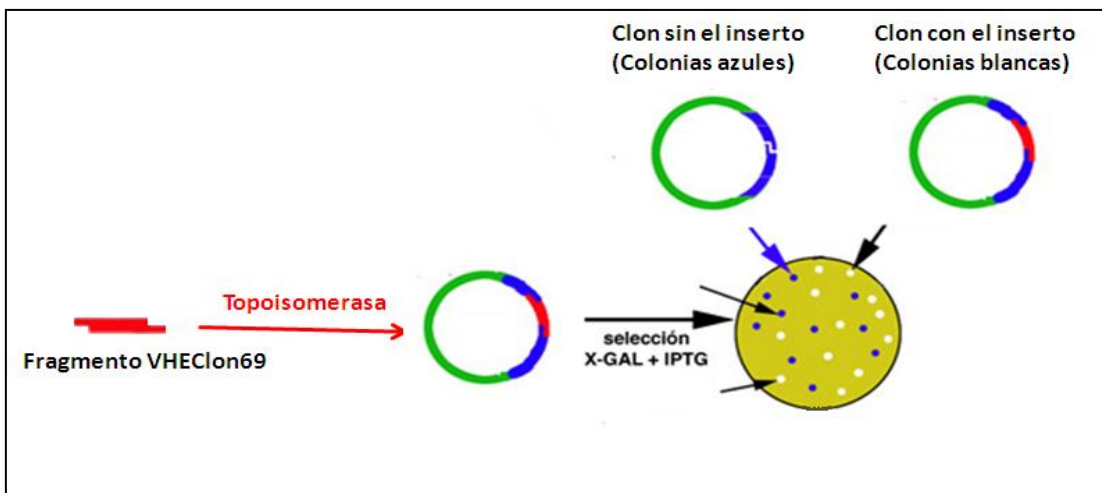


Figura 46. Obtención de clones con el inserto incorporado correctamente (colonias blancas).

3.3.1.4. Extracción y purificación del ADN plasmídico.

Se resembraron las colonias blancas, que supuestamente llevaban incorporado el inserto de forma correcta, en el medio selectivo LB con ampicilina y se incubaron a 37°C durante 12 horas, con el propósito de obtener una mayor biomasa.

Con el objetivo de verificar la presencia del plásmido con el inserto adecuado en los clones obtenidos, se realizó una PCR de colonia. Para ello, se introdujeron directamente en los tubos de reacción para PCR las puntas estériles con las que se habían transferido dichas colonias en el paso anterior, permitiéndose que algunas células bacterianas se desprendieran de las mismas y se incorporaran al medio de reacción de la PCR, aportando la suficiente cantidad de ADN plasmídico para la realización de la PCR, siguiendo el mismo protocolo que el detallado en el capítulo 3.3.1.1., verificándose mediante electroforesis la amplificación de un fragmento de 69 pb correspondiente al inserto.

A continuación, se procedió a la extracción del ADN plasmídico de los clones seleccionados y verificados por PCR de colonia, mediante el siguiente protocolo:

- Se resuspendieron 5 ml de cultivo en 250 µl de tampón E1 (50 mM Tris HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA) con ARNasa A (20 mg/ml Buffer E1).
- Se añadieron 250 µl de tampón E2 de lisis (200mM NaOH, 1% P/V SDS) y se mezclaron por inversión los tubos sin utilizar el vórtex. A continuación, se mantuvieron los tubos durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Para la precipitación del material genético se emplearon 350 µl de tampón E3 (Acetato potásico 3M) y se mezclaron los tubos por inversión, sin utilizar el vórtex. A continuación, se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga (mini spin; Eppendorf, Alemania).

- Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a una mini columna con membrana de silica-gel, para que el ADN plasmídico quedara adherido a ésta, centrifugando a 12000 r.p.m. durante 1 minuto para descartar el líquido y mantener solamente el filtro con el ADN adherido.
- Se añadieron 500 µl de tampón de lavado (Etanol 70%) a la columna y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 minuto y descartar el filtrado. Esta operación se repitió 2 veces.
- Para proceder a la elución del ADN plasmídico, se añadieron 75 µl de tampón TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0; 0,1 mM EDTA). Transcurrido 1 minuto, se centrifugaron los tubos con las columnas a 12000 r.p.m. durante 2 minutos y se recogió el filtrado en tubos receptores limpios, los cuales contenían el ADN plasmídico purificado.

En un siguiente paso se procedió a cuantificar el plásmido purificado obtenido, usando un espectofotómetro Nanodrop ND-1000 y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración del plásmido recombinante obtenida (25,2 ng/µl), se convirtió a número de copias de equivalentes genómicos de VHE de la siguiente manera:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de copias} = [(\text{concentración del plásmido}) / (\text{masa molar})] * 6,022 \times 10^{23}$$

3.3.1.5. Obtención de la recta patrón.

A partir de una solución stock de plásmido clonado, se realizó por triplicado una dilución seriada 1/10 desde 10^9 hasta 10^0 copias de equivalente genómico de VHE con la cual se obtuvo la curva estándar (fig. 47).

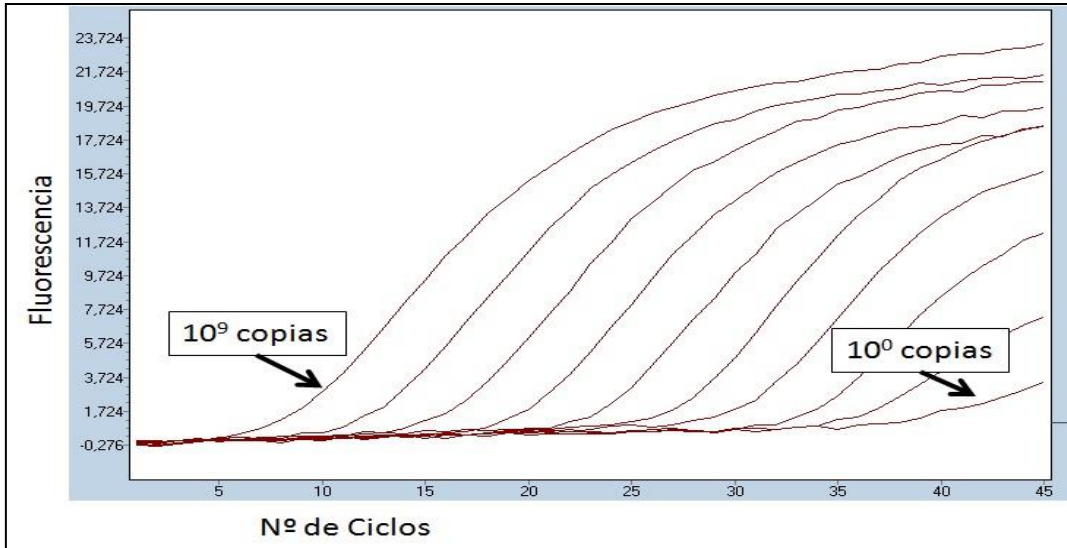


Figura 47. Cuantificación de una serie diluida del plásmido con el clon VHEClon69 mediante PCR a tiempo real.

Mediante transformación logarítmica se obtuvo una recta patrón (fig. 48), en la cual se interpolaron todos los Cp (crossing points) obtenidos con las muestras, lo cual permitió estimar la cantidad inicial de ADN molde.

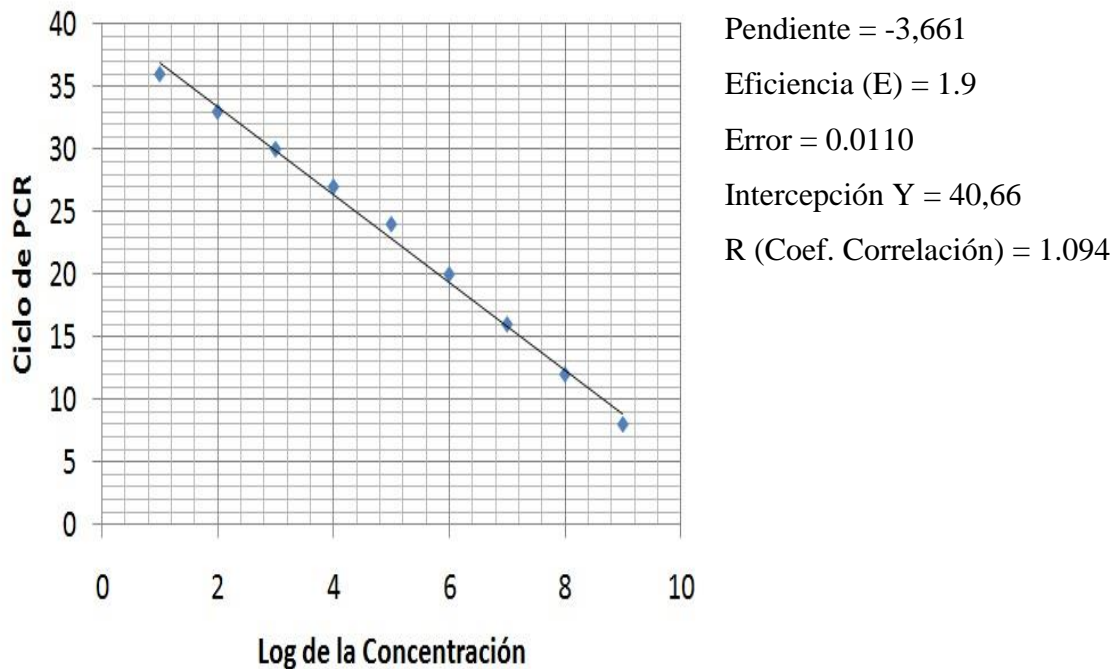


Figura 48. Recta patrón obtenida en la PCR a tiempo real. En el eje de abscisas se representa el logaritmo de la concentración de ADN referida a equivalentes genómicos de VHE. En el eje de ordenadas se representan los Cp.

Con los datos obtenidos, se estimó un límite de detección de 5 copias de equivalente genómico de VHE por tubo de reacción ($C_p=37$). Este límite de detección fue corroborado mediante el análisis por cuadruplicado de una muestra positiva anteriormente por RT-nested-PCR y posteriormente secuenciada (nºacceso GenBank DQ141122).

3.3.2. Protocolo de la RT-PCR a tiempo real.

La retrotranscripción y la PCR se realizaron en la misma reacción, empleando un kit comercial (QuantiTect® Probe RT-PCR; Qiagen, USA), que utiliza una Taq Polimerasa *Hot start* y una retrotranscriptasa omniscrypt.

A continuación se detallan los cebadores y la sonda TaqMan® utilizados en la RT-PCR a tiempo real (Tabla 13).

Tabla 13. Cebadores y sonda empleados en la RT-PCR a tiempo real (Jothikumar y col. 2006).

	NOMBRE	SECUENCIA
Cebadores	FWDVHE69	5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'
	REVVHE69	5'-AGGGGTTGGTTGGATGA-3'
Sonda	Probe VHE	FAM-5'-TGATTCTCAGCCCTTCGC-3'-BHQ1

Se mezclaron 9 µl de la mezcla de reacción y 1 µl de ARN extraído (1 ng - 5 µg) en placas de 0,2 ml x 96 pocillos TwinTec® real time (Eppendorf, Alemania), mediante soporte refrigerado para evitar plegamientos en la cadena de ARN. Posteriormente, se centrifugaron las placas a 8000 r.p.m. con el objetivo de que la mezcla y el ARN quedaran homogeneizados en cada pocillo antes de ser introducidos en el termociclador.

Las condiciones de la reacción se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Composición de la mezcla de reacción para la RT-PCR a tiempo real. C_i : Concentración inicial. C_f : Concentración final.

REACTIVO	C_i	VOLUMEN	C_f
QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	2,0	5 μ l	1,0 μ M
Cebador FWDVHE	10,0 μ M	0,3 μ l	0,3 μ M
Cebador REVVHE	10,0 μ M	0,3 μ l	0,3 μ M
Sonda ProbeVHE	10,0 μ M	0,2 μ l	0,2 μ M
QuantiTect RT Mix	25,0 μ M	0,1 μ l	0,25 μ M
H ₂ O bidestilada estéril	---	3,1 μ l	---
ARN	---	1 μ l	---
Volumen total de reacción	10 μ l		

El protocolo de la RT-PCR a tiempo real se realizó en un termociclador LightCycler[®] 480 (Roche Applied Science, USA) y constó de 3 fases, que se muestran resumidas en la tabla 15.

Tabla 15. Protocolo empleado en la RT-PCR a tiempo real.

TRANSCRIPCIÓN INVERSA				
Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo	Rampa (°C/s)	
1	50°C	30 minutos	4,8	
ACTIVACIÓN POLIMERASA (HOT START)				
Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo	Rampa (°C/s)	
1	94°C	15 minutos	4,8	
AMPLIFICACIÓN				
Nº Ciclos	Proceso	Temperatura	Tiempo	Rampa (°C/s)
50	Desnaturalización	94°C	15 segundos	4,8
	Hibridación Polimerización	60°C	1 minuto	2,5

a) Transcripción inversa: en esta fase se sintetiza el ADNc a partir del ARN extraído de la muestra, tiene una duración de 30 minutos a una temperatura de 50°C.

b) Activación inicial de la Taq Polimerasa (*Hot Start*): permite que la enzima encargada de sintetizar el ADN quede activada tras someterla a 94°C durante 15 minutos.

c) Amplificación: el ADNc generado, es amplificado por la Taq Polimerasa en 50 ciclos sucesivos, cada uno de los cuales consta de una fase inicial de desnaturalización a 94°C, seguida de una fase de hibridación y polimerización conjunta, realizada a 60°C durante un minuto. Durante esta fase cada una de las muestras emite una señal de fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de ADN de partida en cada ciclo de amplificación. Esta señal es captada por un receptor y extrapolada directamente con los valores de fluorescencia emitidos por los patrones diluidos de plásmido (curva estándar), permitiendo la cuantificación de equivalentes genómicos de VHE en cada muestra.

3.4. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS EN LA RT-NESTED-PCR.

Se realizó la secuenciación de los productos positivos de la RT-nested-PCR descrita en los apartado 3.2, para poder establecer una clasificación filogenética de las cepas de VHE aisladas en este estudio.

3.4.1. Purificación del producto de PCR mediante escisión de las bandas del gel de agarosa.

Se procedió a purificar los productos de PCR a partir del gel de agarosa utilizando el kit Qiaquick gel extraction kit® (Qiagen, USA).

Se escindió mediante un escalpelo estéril la banda de ADN 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 cada 3 minutos con vórtex para favorecer la completa disolución de la agarosa. Posteriormente, se añadieron 100 μL de isopropanol por cada 100 mg de gel inicial y se volvió a agitar con vórtex. La mezcla se transfirió a una columna de silica-gel dentro de un tubo de 2 mL y se centrifugó a 10000xg durante 1 minuto. Se descartó por decantación el líquido filtrado y se añadieron a la columna 500 μL de tampón QG para eliminar cualquier resto de agarosa mediante una centrifugación idéntica a la anterior. Tras eliminar el líquido de centrifugación, se añadieron 700 μL de tampón de lavado y se volvió a centrifugar en iguales condiciones. Tras este paso, se realizó una centrifugación adicional para descartar cualquier resto de tampón de lavado y se colocó la columna en un tubo estéril de 1,5 ml. Se añadieron 30 μL de tampón de elución y tras 1 minuto de incubación se centrifugó durante 1 minuto a 10000xg. El ADN obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso, excepto 2 μL que fueron utilizados para realizar una electroforesis en gel de agarosa con el objetivo de verificar que el proceso de purificación había sido correcto.

3.4.2. Reacción de secuenciación.

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

Para obtener las secuencias genómicas de las cadenas complementarias de ADN, se realizaron 2 reacciones de secuenciación por cada producto de PCR. La cantidad de ADN añadida en cada reacción osciló entre 50 y 100 ng/mL. La cantidad de ADN presente en el producto de PCR, se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa junto a un marcador de peso molecular calibrado y posteriormente mediante un programa de tratamiento de imágenes que permitió la cuantificación del ADN (Genetools, Syngene[®], USA).

La primera reacción de secuenciación para cada muestra se preparó de la siguiente manera en un volumen total de 10 μL (tabla 16):

Tabla 16. Composición de la mezcla de la primera reacción de secuenciación.

REACTIVO	CANTIDAD
Terminator ready reaction mix	2 μL
Tampón 5X	2 μL
DMSO	0,7 μL
Primer 3158N (0,8 μM)	2 μL
ADN	50-100 ng/reacción
Agua bidestilada estéril	Hasta 10 μL

La segunda reacción de secuenciación para cada muestra se preparó de la siguiente manera en un volumen total de 10 μL (tabla 17):

Tabla 17. Composición de la mezcla de la segunda reacción de secuenciación.

REACTIVO	CANTIDAD
Terminator ready reaction mix	2 μL
Tampón 5X	2 μL
DMSO	0,7 μL
Primer 3159N (0,8 μM)	2 μL
ADN	50-100 ng/reacción
Agua bidestilada estéril	Hasta 10 μL

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 cebador control 21M13 a una concentración final de 0,16 pmol/ μL .

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp® PCR system 9600 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA). Las condiciones de la reacción se detallan en la tabla 18:

Tabla 18. Protocolo de la reacción de secuenciación.

Proceso	Valores	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C / 3 minutos	1
Desnaturalización	96°C / 10 segundos	25
Hibridación	55°C / 5 segundos	
Polimerización	60°C / 4 minutos	

3.4.3. Precipitación de los productos de la secuenciación.

El protocolo de precipitación fue el siguiente:

- Se realizó una mezcla de etanol con acetato sódico 3M pH 4,6 y agua en las siguientes proporciones por cada producto de secuenciación: 62,5 µL de etanol 95%, 3 µL de acetato sódico 3M pH 4,6 y 24,5 µL de agua bidestilada estéril.
- Se añadieron los 90 µL de esta mezcla a los 10 µL de producto de secuenciación y se agitó vigorosamente la muestra.
- 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 descartándolo sobre un papel de filtro.
- Se añadieron 250 µL 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 introdujeron los tubos abiertos en una estufa a 37°C durante 5 minutos para que se secase el precipitado completamente.

3.4.4. Resuspensión de los precipitados de la reacción de secuenciación.

Se añadieron 30 μL de Template Supression 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, 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 Biosystem, USA) para ser analizados en un secuenciador ABI PRISM[®]310.

3.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS.

Las secuencias complementarias obtenidas se procesaron con el programa BioEdit[®] para obtener las secuencias definitivas. Dichas secuencias se introdujeron en la base de datos BLAST de Genbank para confirmar que pertenecían al fragmento de VHE que se quería amplificar.

Una vez comprobada la veracidad de los datos, se realizó un alineamiento múltiple de 172pb con un total de 166 secuencias de origen humano y porcino pertenecientes al genotipo 3 y que se detallan junto con los números de acceso, país de procedencia y referencia bibliográfica en la tabla 19.

Para el cálculo de las distancias genéticas se utilizó una matriz ClustalW 1.6, mientras que el análisis filogenético se realizó siguiendo el método "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[®] 4.0.

La determinación de la homología nucleotídica entre cepas se realizó mediante una matriz de similitud. Se realizaron los cálculos con el programa BioEdit, comparando los fragmentos de 172pb de las secuencias estudiadas.

Tabla 19. Secuencias del genotipo 3 de la base de datos del GenBank empleadas en el alineamiento múltiple y análisis filogenético junto con las cepas secuenciadas en el presente trabajo (mostradas en azul). Se detalla 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	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3a	01-21160-1	AF466659	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-12116-2	AF466677	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-14185-1	AF46685	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-15025-3	AF466684	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-15555A	AF466683	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-16139-1	AF466675	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-18356-1	AF466663	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-18934C1	AF466662	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-18934D1	AF466661	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-18934D2	AF466681	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-19248-3	AF466660	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-22807-2	AF466680	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	01-31692C1	AF466682	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	HE-JA4.	AB082560	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3a	HE-JA7.	AB082563	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3a	HE-JA8.	AB082564	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)

GENOTIPO	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3a	HE-JA15	AB105891	Japón	humano	(yazaki y col. 2003)
3a	HE-JA16	AB105892	Japón	humano	(yazaki y col. 2003)
3a	HE-JA20	AB115541	Japón	humano	(Sainokami y col. 2004)
3a	HE-JA22	AB115543	Japón	humano	(Sainokami y col. 2004)
3a	HE-JAS1	AB107366	Japón	humano	(Yamamoto y col. 2004)
3a	HA-JAS3	AB107368	Japón	humano	(Yamamoto y col. 2004)
3a	HE-JAI3	AB080579	Japón	humano	(Yakahashi y col. 2002)
3a	hKOR	AY641398	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	hKOR-DYL	AY714270	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	hKOR-HJY	AY714272	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	hKOR-HSY	AY714268	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	hKOR-JMA	AY714267	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	hKOR-NAB	AY714271	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	hKOR-SGK	AY714269	Corea	humano	(Ahn y col. 2005)
3a	KOR1	AF516178	Corea	porcino	(Choi y col. 2003)
3a	KOR2	AF516179	Corea	porcino	(Choi y col. 2003)
3a	KOR3	AF572942	Corea	porcino	(Choi y col. 2003)

GENOTIPO	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3a	NLSW22	AF336291	Holanda	porcino	(Van der Poel y col. 2001)
3a	NLSW122	AF336299	Holanda	porcino	(Van der Poel y col. 2001)
3a	swJ1-1	AB094203	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3a	swJ2-1	AB094207	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3a	swJ3-1	AB094212	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3a	swJ4-1	AB094215	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3a	swJ6-1	AB094217	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3a	swJ10-1	AB094238	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3a	swJ11-1	AB094240	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3a	swJ16-1	AB094267	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3a	swJ17-1	AB094272	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3a	swJL234	AB105903	Japón	porcino	(Yakazi y col. 2003)
3a	swJL325	AB105904	Japón	porcino	(Yakazi y col. 2003)
3a	UMC7A	AF466667	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	UMC7B	AF466664	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	UMC12B	AF466665	USA	porcino	(Huang y col. 2002)
3a	UMC13A	AF466678	USA	porcino	(Huang y col. 2002)

GENOTIPO	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3b	HE-JA5.	AB082561	Japón	humano	(Mizuo y col. 2006)
3b	HE-JA6.	AB082562	Japón	humano	(Mizuo y col. 2006)
3b	HE-JA9.	AB082565	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3b	HE-JA11.	AB082567	Japón	humano	(Mizuo y col. 2002)
3b	HE-JA21	AB115542	Japón	humano	(Sainokami y col. 2004)
3b	HE-JA23	AB115544	Japón	humano	(Sainokami y col. 2004)
3b	HE-JBD1	AB112743	Japón	humano	(Fukuda y col. 2004)
3b	HE-JBD2	AB154829	Japón	humano	(Fukuda y col. 2004)
3b	HE-JBD3	AB154830	Japón	humano	(Fukuda y col. 2004)
3b	HE-JF2	AB079763	Japón	humano	(Suzuki y col. 2002)
3b	HE-JO-1982	AB088418	Japón	humano	(Aikawa y col. 2002)
3b	swJ15-1	AB094256	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3b	swJ18-1	AB094275	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3b	swJ19-1	AB094279	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3b	swJ22-4	AB094296	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3b	swJ24-1	AB094306	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3b	swJ25-1	AB094317	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)

GENOTIPO	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3b	swJ681	AB073910	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3b	swJC1990	AB096756	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3b	swJL82	AB105898	Japón	porcino	(Yazaki y col. 2003)
3b	swJL97	AB105899	Japón	porcino	(Yazaki y col. 2003)
3b	swJ23-1	AB094305	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3b	swJL98	AB105900	Japón	porcino	(Yazaki y col. 2003)
3c	NLSW20	AF336290	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3c	NLSW36	AF336293	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3c	NLSW68	AY032756	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3c	NLSW99	AF336297	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3c	NLSW105	AF336298	Holanda	porcino	(van der Poel y col. 2001)
3c	Fr-10Y56	Hq682232	Francia	humano	(Renou y col. 2011)
3c	Mrs Pt8	JF900629	Francia	humano	(Colson y col. 2012)
3c	Mrs Pt14	JF900630	Francia	humano	(Colson y col. 2012)
3c	FR-45	EF494703	Francia	porcino	(Renou y col. 2007)
3c	TR19	JN398372	Francia	humano	(Abravanel y col. 2012)
3d	TW3SW	AF296167	Taiwán	porcino	(Wu y col. 2002)

GENOTIPO	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3d	TW13SW	AF296166	Taiwán	porcino	(Wu y col. 2002)
3d	TW12SW	AF296165	Taiwán	porcino	(Wu y col. 2002)
3e	P143/11/02	AF503512	UK	porcino	(Banks y col. 2004)
3e	P354/1/02	AF503511	UK	porcino	(Banks y col. 2004)
3e	Sendai	AB093535	Japón	humano	(Yajima y col. 203)
3e	swJ8-2	AB094227	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3e	swJ8-6	AB094231	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3e	swJ8-8	AB094233	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3e	swJ12-1	AB094250	Japón	porcino	(Takahashi y col. 2003)
3e	swJ791	AB073911	Japón	porcino	(Okamoto y col. 2001)
3e	NT8	AJ879574	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	NT1	AJ879566	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	NT7	AJ879573	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	NT6	AJ879572	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	NT5	AJ879571	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	NT3	AJ879569	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3e	NT11	AJ879567	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)

GENOTIPO	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3e	B1	FJ718747	Francia	porcino	(Kaba y col. 2009)
3e	UK 8734	AY362357	UK	humano	(Banks y col. 2004)
3f	U2	DQ141122	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	LOHV	KC145134	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	L1DV	KC145136	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	L2CV	KC145167	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	L2DV	KC145138	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	L3CV	KC145139	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	L22DV	KC145140	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	LOAV	KC145141	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	LODV	KC145142	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	LOEV	KC145143	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	LRCM	KC145144	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	LRDM	KC145145	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	S7CV	KC145146	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	LOHT	KC145133	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	L1HT	KC145147	España	porcino	(García y col. 2013)

GENOTIPO	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3f	L1HV	KC145132	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	LOCM	KC145135	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	LODS	KC145131	España	porcino	(García y col. 2013)
3f	941-HRC	EF523420	España	humano	(Pérez Gracia y col. 2007)
3f	NLSW15	AF332620	Holanda	porcino	(Van der Poel y col. 2001)
3f	NLSW28	AF336292	Holanda	porcino	(Van der Poel y col. 2001)
3f	NLSW50	AY032758	Holanda	porcino	(Van der Poel y col. 2001)
3f	NLSW76	AY032757	Holanda	porcino	(Van der Poel y col. 2001)
3f	NLSW82	AF336294	Holanda	porcino	(Van der Poel y col. 2001)
3f	NLSW85	AF336295	Holanda	porcino	(Van der Poel y col. 2001)
3f	NLSW91	AY032759	Holanda	porcino	(Van der Poel y col. 2001)
3f	VH1	AF195061	España	humano	(Pina y col. 2000)
3f	VH2	AF195062	España	humano	(Pina y col. 2000)
3f	E11	AF195063	España	agua residual matadero porcino	(Pina y col. 2000)
3f	SPSWMCV12	DQ141121	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SpswmCV7	DQ093568	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWMCV11	DQ141120	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)

GENOTIPO	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3f	SPSWMCV9	DQ141118	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	Spswfcv3	DQ093564	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWSCV17	DQ141126	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWSCV16	DQ141125	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	Spswscv8	DQ093569	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWSCV15	DQ141124	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	Spswfcv5	DQ093566	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWMCV10	DQ141119	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWSCV14	DQ141123	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	Spswscv4	DQ093565	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	U1	JQ522948	España	porcino	(Saiz y col. 2010)
3f	spswcv2	AY323506	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWSCV13	DQ141123	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWFCV22	EF523408	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWFCV23	EF523409	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWFCV24	EF523410	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWFCV25	EF523411	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)

GENOTIPO	CEPA	NºACCESO	PAÍS DE ORIGEN	HOSPEDADOR	REFERENCIA
3f	SPSWFCV26	EF523412	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWFCV27	EF523413	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWFCV28	EF523414	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	SPSWFCV29	EF523415	España	porcino	(Fdez.Barredo y col. 2006)
3f	FG	HQ148726	España	porcino	(Saiz y col. 2010)
3f	SPSWFCV29	EF523415	España	porcino	(Fdez. Barredo y col. 2007)
3f	SPSWFCV30	EF523416	España	porcino	(Fdez. Barredo y col. 2007)
3f	SPSWFCV31	EF523417	España	porcino	(Fdez. Barredo y col. 2007)
3f	SPSWFCV32	EF523418	España	porcino	(Fdez. Barredo y col. 2007)
3f	SPSWFCV33	EF523419	España	porcino	(Fdez. Barredo y col. 2007)
3f	77HRC	EF523421	España	humano	(Pérez Gracia y col. 2007)
3f	NT4	AJ879570	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3f	NT2	AJ879568	UK	humano	(Ijaz y col. 2005)
3f	Fr-44	EU667421	Francia	humano	(Tesse y col. 2008)

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos en el presente estudio mediante el test de Chi cuadrado, con el objetivo de comparar la disminución en la detección del ARN del VHE entre fases de tratamiento de purines consecutivas en el proceso global y determinar si esta disminución era significativa.

Por otra parte, se realizó un test de Wilcoxon para determinar si había diferencias significativas entre la sensibilidad en la detección del ARN del VHE entre las 2 técnicas empleadas: RT-nested-PCR y RT-PCR a tiempo real.

Todos los cálculos estadísticos fueron realizados mediante el programa SPSS® versión 15.0.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 189 muestras analizadas, se identificó el VHE en 33 (17,46%) mediante RT-nested-PCR y en 76 (40,21%) mediante RT-PCR a tiempo real. Estos datos coinciden con anteriores estudios en los cuales se observaba una mayor sensibilidad de la RT-PCR a tiempo real frente a la RT-nested-PCR de punto final (Jothikumar y col. 2006; Ward y col. 2009). En este sentido, la sensibilidad obtenida en la RT-PCR a tiempo real en el presente estudio fue de 5 equivalentes genómicos de ADN y una intercepción en Y de $C_p=41$, resultando ésta similar a la obtenida por Jothikumar y col. (2006) utilizando el mismo protocolo, con un límite de detección de 4 equivalentes genómicos de ADN y un mismo valor de intercepción en Y de $C_p=41$. Se obtuvieron también resultados similares en cuanto a la eficiencia de la técnica, que en nuestro caso fue de 0,88 frente a un valor de 0,9 obtenido por Jothikumar y col. (2006).

La distribución de las muestras positivas según la planta de tratamiento, así como las tasas de detección del ARN del VHE en función de la técnica empleada, se detallan en la tabla 20.

Tabla 20. Distribución de muestras positivas en las plantas de tratamiento.

Planta	Nº Muestreos	Nº Muestras	Muestras positivas RT-nested-PCR (%)	Muestras positivas RT-PCR tiempo real (%)
Vall d'Alba	9	126	22 (17,46)	51 (40,48)
Todolella	3	39	7 (17,95)	14 (35,89)
Sant Mateu	2	8	3 (37,5)	4 (50)
Albocàsser	1	4	0 (0)	3 (75)
Salzadella	3	12	1 (8,33)	4 (33,33)
Total	18	189	33 (17,46)	76 (40,21)

Hay que resaltar que en la planta situada en Albocàsser, sólo se realizó un muestreo ya que por problemas técnicos se paralizó el funcionamiento de la misma. Lo mismo ocurrió posteriormente con las plantas de Salzadella y Sant Mateu, ambas de tratamiento no integral de purines, en las cuales sólo se pudieron realizar 3 y 2 muestreos, respectivamente.

La planta de Vall d'Alba, al ser la planta que reúne el mayor número de procesos, es en la que mayor número de muestras se recogieron, ya que en esta planta a diferencia de la planta de Todolella también se obtiene el

producto final (pellet). Por otra parte, en la planta de Sant Mateu, el alto porcentaje de muestras positivas podría ser debido a que los purines no reciben un tratamiento integral y por lo tanto aumenta la probabilidad de encontrar el VHE en cualquiera de las muestras analizadas en esta planta.

De las 76 muestras en las que se identificó el VHE, 17 (22,37%) correspondieron a líquido de balsas de recepción de purines, 35 (46,05%) procedían de líquido de las balsas anaerobias, siendo este tipo de muestra la mayoritaria. Por otra parte, 7 (9,21%) muestras positivas se recogieron de la balsas de aerobiosis 1, 3 (3,95%) en la balsas de aerobiosis 2, 5 (6,58%) en canales de riego, 8 (10,53%) fueron muestras de sólido procedente de la centrífuga y 1 (1,32%) muestra únicamente resultó positiva en el inicio de uno de los túneles de fermentación de una planta con tratamiento no integral (fig. 49).

No se detectó el virus en ninguna de las muestras de producto final sólido, es decir, aquel que se destina directamente a la comercialización como compost en forma de pellet. Tampoco se detectó el ARN-VHE en partidas de producto sólido en las naves de maduración (penúltima fase en el proceso de tratamiento de los purines).



Figura 49. Distribución de las muestras positivas detectadas según punto de muestreo.

En la tabla 21, se indica el resultado positivo o negativo a la presencia de ARN-VHE en las muestras recogidas y analizadas tanto por RT-nested-PCR como por RT-PCR a tiempo real, así como la fecha de muestreo, punto de muestreo, procedencia y tipo de planta.

Tabla 21. Muestras obtenidas con fecha de recogida, lugar de muestreo, procedencia, tipo de tratamiento y resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y RT-PCR a tiempo real para la detección del ARN del VHE.

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
21/07/2008	LOAV	Balsa receptora	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
21/07/2008	L2AV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
21/07/2008	L21AV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
21/07/2008	L22AV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
21/07/2008	L23AV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
21/07/2008	L24AV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
21/07/2008	L3AV	Balsa aerobia 1	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
21/07/2008	L4AV	Balsa aerobia 2	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
21/07/2008	LRAV	Canal riego	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
21/07/2008	S7AV	Sólido centrífuga	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
21/07/2008	SIAV	Sólido inicio túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
21/07/2008	SFAV	Sólido final túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
21/07/2008	SMAV	Sólido naves de maduración	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
21/07/2008	SPAV	Sólido pellet final	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	LOBV	Balsa receptora	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
24/11/2008	L2BV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
24/11/2008	L21BV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
24/11/2008	L22BV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	L23BV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	L24BV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
24/11/2008	L3BV	Balsa aerobia 1	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	L4BV	Balsa aerobia 2	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	LRBV	Canal riego	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	S7BV	Sólido centrífuga	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	SIBV	Sólido inicio túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	SFBV	Sólido final túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	SMBV	Sólido naves de maduración	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	SPBV	Sólido pellet final	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	L0CV	Balsa receptora	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
6/03/2009	L2CV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
6/03/2009	L21CV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
6/03/2009	L22CV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
6/03/2009	L23CV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
6/03/2009	L24CV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
6/03/2009	L3CV	Balsa aerobia 1	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
6/03/2009	L4CV	Balsa aerobia 2	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
6/03/2009	LRCV	Canal riego	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	S7CV	Sólido centrífuga	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
6/03/2009	SICV	Sólido inicio túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	SFCV	Sólido final túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	SMCV	Sólido naves de maduración	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	SPCV	Sólido pellet final	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	L0DV	Balsa receptora	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
22/06/2009	L2DV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
22/06/2009	L21DV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	L22DV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
22/06/2009	L23DV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
22/06/2009	L24DV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
22/06/2009	L3DV	Balsa aerobia 1	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	L4DV	Balsa aerobia 2	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	LRDV	Canal riego	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
22/06/2009	S7DV	Sólido centrífuga	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	SIDV	Sólido inicio túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	SFDV	Sólido final túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	SMDV	Sólido naves de maduración	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	SPDV	Sólido pellet final	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/01/2010	L0EV	Balsa receptora	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
22/01/2010	L2EV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
22/01/2010	L21EV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/01/2010	L22EV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
22/01/2010	L23EV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/01/2010	L24EV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
22/01/2010	L3EV	Balsa aerobia 1	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
22/01/2010	L4EV	Balsa aerobia 2	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/01/2010	LREV	Canal riego	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/01/2010	S7EV	Sólido centrífuga	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/01/2010	SIEV	Sólido inicio túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/01/2010	SFEV	Sólido final túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
22/01/2010	SMEV	Sólido naves de maduración	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/01/2010	SPEV	Sólido pellet final	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
15/07/2010	L0FV	Balsa receptora	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
15/07/2010	L2FV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
15/07/2010	L21FV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
15/07/2010	L22FV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
15/07/2010	L23FV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
15/07/2010	L24FV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
15/07/2010	L3FV	Balsa aerobia 1	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
15/07/2010	L4FV	Balsa aerobia 2	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
15/07/2010	LRFV	Canal riego	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
15/07/2010	S7FV	Sólido centrífuga	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
15/07/2010	S1FV	Sólido inicio túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
15/07/2010	SFFV	Sólido final túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
15/07/2010	SMFV	Sólido naves de maduración	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
15/07/2010	SPFV	Sólido pellet final	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	L0GV	Balsa receptora	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
2/02/2011	L2GV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/02/2011	L21GV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/02/2011	L22GV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/02/2011	L23GV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	L24GV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/02/2011	L3GV	Balsa aerobia 1	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/02/2011	L4GV	Balsa aerobia 2	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	LRGV	Canal riego	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	S7GV	Sólido centrífuga	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/02/2011	SIGV	Sólido inicio túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	SFGV	Sólido final túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	SMGV	Sólido naves de maduración	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	SPGV	Sólido pellet final	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	L0HV	Balsa receptora	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
6/06/2011	L2HV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
6/06/2011	L21HV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	L22HV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
6/06/2011	L23HV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	L24HV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	L3HV	Balsa aerobia 1	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
6/06/2011	L4HV	Balsa aerobia 2	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	LRHV	Canal riego	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	S7HV	Sólido centrífuga	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	SIHV	Sólido inicio túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	SFHV	Sólido final túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	SMHV	Sólido naves de maduración	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	SPHV	Sólido pellet final	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	L0KV	Balsa receptora	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
2/04/2012	L2KV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
2/04/2012	L21KV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
2/04/2012	L22KV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/04/2012	L23KV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	L24KV	Balsa anaerobia	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	L3KV	Balsa aerobia 1	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
2/04/2012	L4KV	Balsa aerobia 2	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	LRKV	Canal riego	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	S7KV	Sólido centrífuga	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/04/2012	SIKV	Sólido inicio túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	SFKV	Sólido final túneles	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	SMKV	Sólido naves de maduración	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	SPKV	Sólido pellet final	Vall d'Alba	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	L0GT	Balsa receptora	Todolella	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
2/02/2011	L2GT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/02/2011	L21GT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/02/2011	L22GT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	L23GT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	L24GT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	L3GT	Balsa aerobia 1	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	L4GT	Balsa aerobia 2	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	LRGT	Canal riego	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	S7GT	Sólido centrífuga	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
2/02/2011	SIGT	Sólido inicio túneles	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	SFGT	Sólido final túneles	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/02/2011	SMGT	Sólido naves de maduración	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	LOHT	Balsa receptora	Todolella	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
6/06/2011	L2HT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
6/06/2011	L21HT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
6/06/2011	L22HT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	L23HT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	L24HT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	L3HT	Balsa aerobia 1	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	L4HT	Balsa aerobia 2	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	LRHT	Canal riego	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	S7HT	Sólido centrífuga	Todolella	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
6/06/2011	SIHT	Sólido inicio túneles	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	SFHT	Sólido final túneles	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/06/2011	SMHT	Sólido naves de maduración	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	L0KT	Balsa receptora	Todolella	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
2/04/2012	L2KT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
2/04/2012	L21KT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/04/2012	L22KT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/04/2012	L23KT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	L24KT	Balsa anaerobia	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	L3KT	Balsa aerobia 1	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	POSITIVO
2/04/2012	L4KT	Balsa aerobia 2	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	LRKT	Canal riego	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	S7KT	Sólido centrífuga	Todolella	Tto. Integral	POSITIVO	POSITIVO
2/04/2012	SIKT	Sólido inicio túneles	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	SFKT	Sólido final túneles	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
2/04/2012	SMKT	Sólido naves de maduración	Todolella	Tto. Integral	NEGATIVO	NEGATIVO
21/07/2008	LOAA	Balsa receptora	Albocàsser	Tto. No integral	NEGATIVO	POSITIVO
21/07/2008	LRAA	Canal riego	Albocàsser	Tto. No integral	NEGATIVO	POSITIVO
21/07/2008	SIAA	Sólido inicio túneles	Albocàsser	Tto. No integral	NEGATIVO	POSITIVO
21/07/2008	SFAA	Sólido final túneles	Albocàsser	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	LOBS	Balsa receptora	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	POSITIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
24/11/2008	LRBS	Canal riego	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	POSITIVO
24/11/2008	SIBS	Sólido inicio túneles	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
24/11/2008	SFBS	Sólido final túneles	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	LOCS	Balsa receptora	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	LRCS	Canal riego	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	POSITIVO
6/03/2009	SICS	Sólido inicio túneles	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	SFCS	Sólido final túneles	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	LOCM	Balsa receptora	S. Mateu	Tto. No integral	POSITIVO	POSITIVO
6/03/2009	LRCM	Canal riego	S. Mateu	Tto. No integral	POSITIVO	POSITIVO
6/03/2009	SICM	Sólido inicio túneles	S. Mateu	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
6/03/2009	SFCM	Sólido final túneles	S. Mateu	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	LODS	Balsa receptora	Salzadella	Tto. No integral	POSITIVO	POSITIVO
22/06/2009	LRDS	Canal riego	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	SIDS	Sólido inicio túneles	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	SFDS	Sólido final túneles	Salzadella	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	LODM	Balsa receptora	S. Mateu	Tto. No integral	NEGATIVO	POSITIVO
22/06/2009	LRDM	Canal riego	S. Mateu	Tto. No integral	POSITIVO	POSITIVO

Fecha	Código	Clave	Municipio	Tipo de planta	Resultado RT-nested-PCR	Resultado RT-PCR a tiempo real
22/06/2009	SIDM	Sólido inicio túneles	S. Mateu	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO
22/06/2009	SFDM	Sólido final túneles	S. Mateu	Tto. No integral	NEGATIVO	NEGATIVO

4.1. RESULTADOS SEGÚN TIPO DE PLANTA.

4.1.1. Plantas con tratamiento integral de purines: Vall d'Alba y Todolella.

Se recogieron un total de 126 muestras en la planta de Vall d'Alba, siendo 81 (64,29%) líquidas y 45 (35,71) sólidas. En la planta de Todolella se recogieron un total de 39 muestras, siendo 27 (69,23%) líquidas y 12 (30,77%) sólidas.

4.1.1.1. Muestras líquidas.

En la planta de Vall d'Alba se tomaron 81 muestras líquidas en 9 muestreos diferentes, de las que 46 (56,79%) fueron positivas a la presencia del ARN del VHE y se recogieron en los siguientes puntos de muestreo: 9 (19,57%) en la balsa receptora de purines, 28 (60,87%) en la balsa de anaerobiosis, 6 (13,04%) en la balsa de aerobiosis 1 y 3 (6,52%) en la balsa de aerobiosis 2 (fig. 50).

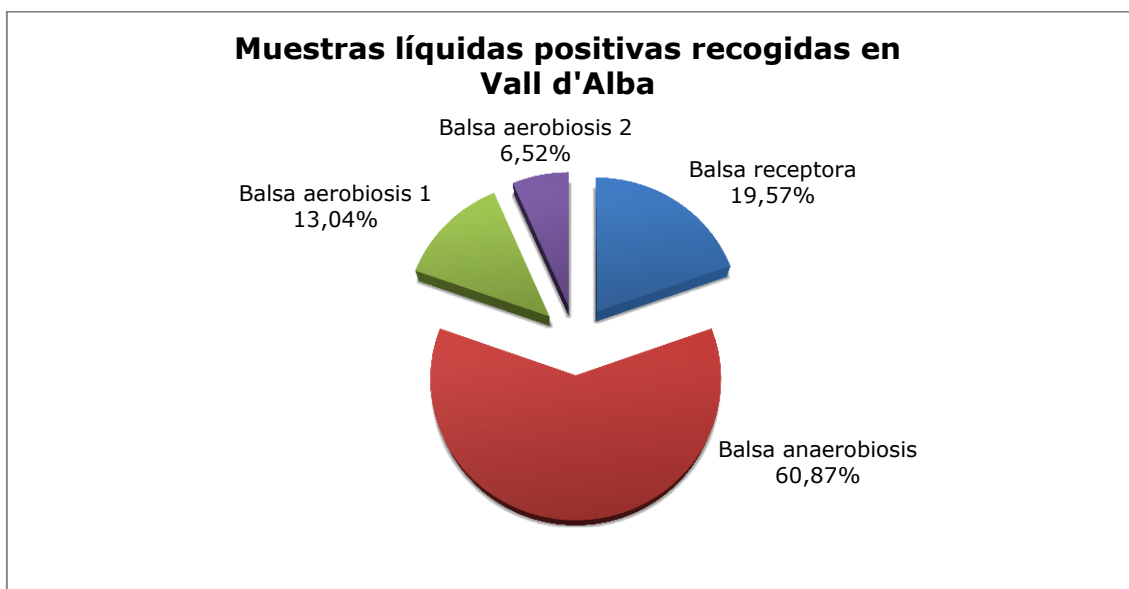


Figura 50. Distribución porcentual de las muestras positivas líquidas tomadas en la planta con tratamiento integral de purines de Vall d'Alba.

En la planta de Todoilella se recogieron 27 muestras líquidas en 3 muestreos diferentes, resultando positivas 11 (40,74%) de ellas a la presencia del ARN del VHE. La distribución de las muestras líquidas positivas según el punto de muestreo, fue la siguiente: 3 (27,27%) en la balsa receptora de purines, 7 (63,64%) en la balsa de anaerobiosis y 1 (9,09%) en la balsa de aerobiosis 1 (fig. 51).

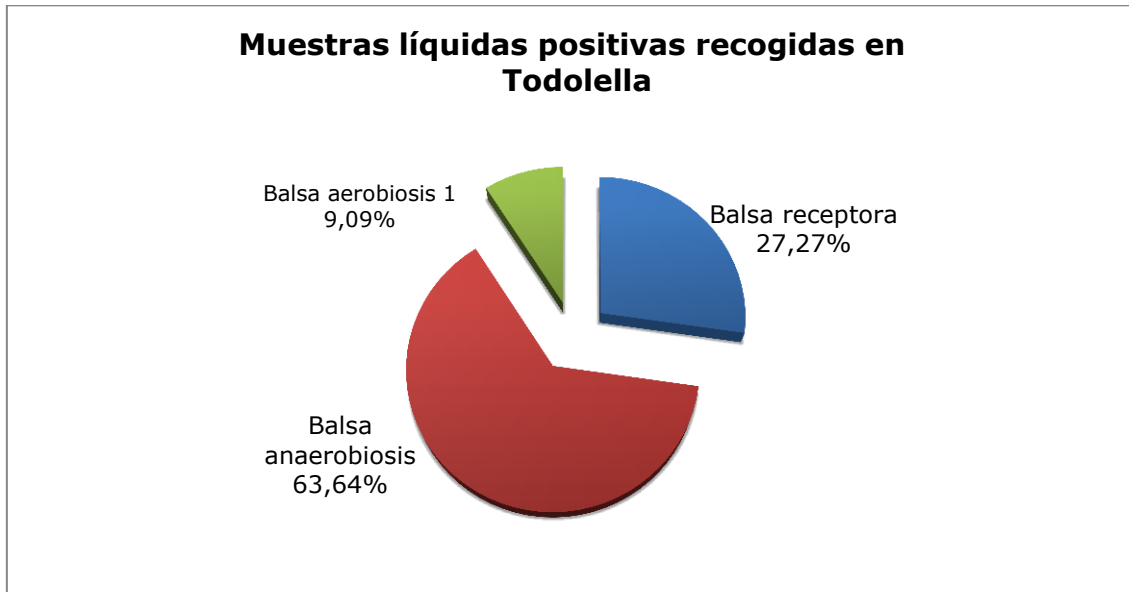


Figura 51. Distribución porcentual de las muestras positivas líquidas tomadas en la planta con tratamiento integral de purines de Todoilella.

- **Balsas receptoras.**

Se detectó el ARN-VHE en todos los muestreos efectuados en la balsa receptora de purines en la planta de Vall d'Alba cuando se analizó mediante RT-PCR a tiempo real, no habiendo diferencias significativas ($P > 0,05$) cuando se realizó el análisis con RT-nested-PCR (Tabla 22). Este dato indica que los purines que llegan a esta planta de tratamiento, están contaminados por el VHE. Estos resultados coinciden con un estudio realizado en 21 granjas porcinas de la Comunidad Valenciana en el que se detectó un 50% de prevalencia del VHE en fosas de purines (Fernandez-Barredo y col. 2006). Adicionalmente, se ha detectado el VHE en otros estudios similares realizados en diferentes zonas geográficas, así se detectó una prevalencia del 68% en un estudio de 28 granjas en EEUU

(Kasorndorkbua y col. 2005), un 68,5% en 14 granjas en Brasil (Gardinali y col. 2012) y un 100% en un estudio en 5 granjas realizado en Portugal (Berto y col. 2012b).

En otro reciente trabajo (Berto y col. 2012a), realizado en explotaciones porcinas de diferentes países de la Unión Europea, se detectó un 44% de prevalencia del VHE en 20 granjas estudiadas en Reino Unido, un 30% en 5 granjas en Portugal, un 23% en 10 granjas de Italia y un 73% de las muestras analizadas en una granja en Holanda. En este estudio no aparecen datos significativos en cuanto a la detección del ARN-VHE en granjas de España y República Checa, este dato es debido al reducido tamaño de muestras analizadas en las granjas estudiadas en estos países.

Los datos mostrados anteriormente confirman la amplia diseminación del VHE en los purines generados en las explotaciones porcinas en los diferentes países estudiados.

Tabla 22. Resultados obtenidos en la balsa receptora de Vall d’Alba. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia del ARN-VHE.

Punto de muestreo: balsa receptora Vall d’Alba													
PLANTA	MUESTREOS										% Positivos RT- nested-PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real	
	A	B	C	D	E	F	G	H	K				
Vall d’Alba	amarillo	naranja	verde	amarillo	naranja	amarillo	naranja	amarillo	naranja	amarillo	naranja	88,89	100

En lo que respecta a la balsa receptora de Todoilella, se detectó el VHE en 3 de los 3 muestreos realizados (Tabla 23). Estadísticamente, no hubo diferencias significativas en cuanto a las tasas de detección empleando RT-nested-PCR o RT-PCR a tiempo real ($p > 0,05$). Este hecho puede ser debido al bajo número de muestreos realizados en esta planta y a la alta

probabilidad de encontrar VHE en las balsas receptoras, ya que éstas contienen purines en crudo llegados directamente desde diferentes granjas y sin ser sometidos a ningún tratamiento.

Tabla 23. Resultados obtenidos en la balsa receptora de TodoIella. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: balsa receptora TodoIella												
PLANTA	MUESTREOS									% Positivos RT- nested-PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real	
	A	B	C	D	E	F	G	H	K			
TodoIella	No muestreado						■	■	■	■	100	100

Se sugiere que la mayor tasa de detección obtenida en este estudio en las balsas receptoras, es debida a la presencia de gran cantidad de purines contaminados con VHE procedentes de varias granjas diferentes en la misma balsa receptora.

- **Balsas anaerobias.**

En la balsa anaerobia de la planta de Vall d'Alba se detectó el ARN-VHE en el 100% de los muestreos, poniéndose de manifiesto una significativa mayor tasa de detección al emplear la RT-PCR a tiempo real frente a la RT-nested-PCR ($P < 0,05$), con la que se detectó el VHE en 7 (77,77%) de los 9 muestreos (Tabla 24). La menor tasa de detección del VHE en esta balsa utilizando RT-nested-PCR puede ser debida a un efecto de dilución, ya que el volumen de esta balsa es de 3.853 m³ frente a los 552 m³ de capacidad que tiene la balsa receptora, lo que haría que la concentración de partículas víricas en estas muestras estuviera por debajo del límite de detección con esta técnica, pudiendo ser detectable con la RT-PCR a tiempo real.

Tabla 24. Resultados obtenidos en la balsa anaerobia de Vall d’Alba. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: balsa anaerobia Vall d’Alba													
PLANTA	MUESTREOS										% Positivos RT- nested-PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real	
	A	B	C	D	E	F	G	H	K				
Vall d’Alba	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	verde	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	77,77	100

En la balsa anaerobia de la planta de Todolella se obtuvieron unos resultados similares a los obtenidos en el mismo punto del proceso en la planta de Vall d’Alba (Tabla 25). De este modo, en 3 (100%) de los 3 muestreos se detectó la presencia de VHE mediante RT-PCR a tiempo real y en 2 (66,67%) mediante RT-nested-PCR, no resultando significativos estos valores, debido al bajo número de muestreos.

Tabla 25. Resultados obtenidos en la balsa anaerobia de Todolella. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: balsa anaerobia Todolella													
PLANTA	MUESTREOS										% Positivos RT- nested-PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real	
	A	B	C	D	E	F	G	H	K				
Todolella	No muestreado						verde	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	66,67	100

No existe ninguna publicación que estudie la resistencia del VHE a procesos de depuración anaerobios, pero existen estudios sobre resistencia de virus entéricos porcinos a diferentes tecnologías para tratar purines. En uno de estos estudios (Costantini y col. 2007), se confirmó la reducción en la detección de virus entéricos porcinos de la familia *Caliciviridae*, tras someter los purines a digestiones anaerobias.

En otro trabajo (Viancelli y col. 2013), se estudiaron dos sistemas diferentes de tratamiento de purines, uno de ellos desarrollaba un procedimiento similar al que se realizó en las plantas de compostaje analizadas en el presente estudio. En ese sistema de depuración se detectaron disminuciones significativas de bacterias patógenas como *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*, debido en gran medida a una reducción drástica en la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y a procesos de hidrólisis que acompañan a las reacciones propias de la degradación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno, llevadas a cabo por bacterias anaerobias, sin embargo, no se detectó una menor presencia de adenovirus porcino (PAdV), parvovirus porcino (PPV) y torque teno virus (TTV) después de someter el purín a una separación mecánica sólido-líquido y a un posterior tratamiento anaerobio-aerobio.

Otro factor determinante en la eficiencia de la digestión anaerobia y la consecuente inactivación de patógenos, es la temperatura (Masse y col. 2010; Sakar y col. 2009). Las balsas situadas en las plantas de compostaje estudiadas se encuentran a temperatura ambiente y por lo tanto, la temperatura que alcanzan los líquidos en su interior tiene una fuerte influencia del exterior y se encuentra en todo momento en rangos de temperatura que varían entre 20°C y 30°C, mientras que las temperaturas óptimas de inactivación de patógenos se encuentran en el rango de temperaturas entre 50°C y 70°C.

En 2008, un estudio realizado en plantas de estabilización de residuos sólidos en EEUU (Viau y col. 2009), concluyó que los adenovirus patógenos humanos eran capaces de resistir tratamientos anaeróbicos a temperaturas menores a 37°C. En 2012, otra investigación (Wong y col. 2012) indicaba

que varios tipos de adenovirus bovino y poliomavirus bovino podían resistir tratamientos anaeróbicos en condiciones de temperatura menores a 37°C, en sistemas de depuración de purines convencionales utilizados en explotaciones ganaderas de EEUU. En el mismo sentido, Wong y col. en 2009, recalcaron la necesidad de someter las deyecciones ganaderas a procesos de depuración debido a la amplia difusión de patógenos que podría implicar su aplicación en los campos de cultivo (Wong y col. 2009). En este estudio, se detectaron adenovirus bovinos y poliomavirus bovinos, en el efluente de diferentes sistemas de tratamientos anaeróbicos de deyecciones ganaderas, analizados en instalaciones estadounidenses.

Todos estos datos indican que un gran número de virus entéricos porcinos y humanos son capaces de resistir la fase de digestión anaerobia a la cual son sometidos los purines en estas balsas, incluido el VHE según los resultados obtenidos en nuestro estudio.

- **Balsa de aerobiosis 1.**

La balsa de aerobiosis 1 procesa el efluente líquido que de manera gradual va abandonando la balsa anaerobia. En los resultados obtenidos en ambas plantas en estas balsas, se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) en la detección del ARN-VHE.

En el caso de la balsa de aerobiosis 1 de la planta de Vall d'Alba, se detectó mediante RT-nested-PCR el VHE en 1 muestreo (11,11%) de los 9 realizados (muestreo C), mientras que ese porcentaje se elevó de manera significativa al 66,67% cuando se analizaron las muestras por RT-PCR a tiempo real ($p < 0,05$), detectándose el ARN-VHE en 6 de los 9 muestreos realizados (muestreos A, C, E, F, G y H) (Tabla 26).

Tabla 26. Resultados obtenidos en la balsa de aerobiosis 1 de Vall d'Alba. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: balsa aerobiosis 1 Vall d'Alba													
PLANTA	MUESTREOS										% Positivos RT- nested- PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real	
	A	B	C	D	E	F	G	H	K				
Vall d'Alba												11,11	66,67

En la balsa de aerobiosis 1 de la planta de Todolella se observó de igual manera, un descenso en la detección del VHE respecto a los resultados obtenidos en la balsa de anaerobiosis. En este caso, sólo se detectó la presencia del virus mediante RT-PCR a tiempo real en 1 muestreo (33,33%) de los 3 realizados (muestreo K), lo que indica que la concentración del mismo se reduce significativamente (Tabla 27).

Tabla 27. Resultados obtenidos en la balsa de aerobiosis 1 de Todolella. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: balsa aerobiosis 1 Todolella													
PLANTA	MUESTREOS										% Positivos RT- nested- PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real	
	A	B	C	D	E	F	G	H	K				
Todolella	No muestreado											0	33,33

- **Balsas de aerobiosis 2.**

No se detectó la presencia del VHE en ninguna de las balsas de aerobiosis 2 mediante RT-nested-PCR, lo cual indica que la concentración del virus ha disminuido sustancialmente llegado a este punto del tratamiento. Se detectó el VHE mediante PCR a tiempo real en 3 (33,33%) de los 9 muestreos efectuados en la planta de Vall d’Alba (muestreos A, C y F) (Tabla 28).

Tabla 28. Resultados obtenidos en la balsa de aerobiosis 2 de Vall d’Alba. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: balsa aerobiosis 2 Vall d’Alba													
PLANTA	MUESTREOS									% Positivos	% Positivos		
	A	B	C	D	E	F	G	H	K	RT- nested-PCR	RT-PCR Tiempo Real		
Vall d’Alba	Verde	Naranja	Verde	Verde	Verde	Verde	Naranja	Verde	Verde	Verde	Verde	0	33,33

En la planta de Todolella no se detectó el VHE en ninguno de los muestreos realizados en la balsa de aerobiosis 2, sugiriendo este dato que este proceso reduce la concentración del VHE hasta valores no detectables por RT-PCR a tiempo real (Tabla 29).

Tabla 29. Resultados obtenidos en la balsa de aerobiosis 2 de TodoIella. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia del ARN-VHE.

Punto de muestreo: balsa aerobiosis 2 TodoIella												
PLANTA	MUESTREOS									% Positivos RT- nested- PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real	
	A	B	C	D	E	F	G	H	K			
TodoIella	No muestreado										0	0

Hay pocos estudios que analicen la resistencia de virus a procesos de depuración aeróbicos a temperatura ambiente, como es el caso de las balsas de aerobiosis de las plantas aquí estudiadas. Uno de estos estudios (Lund y col. 1983), concluía que la aireación mecánica en balsas de purines era especialmente efectiva en la eliminación de enterovirus porcinos, lográndose descensos significativos de concentración de partículas víricas en balsas con aireación continua durante 3-4 días a una temperatura de 20°C. Además, en otros estudios (Juris y col. 1993; Plachy y col. 1995), se constató que la aireación continua era eficaz en la eliminación de *Salmonella spp.* y de huevos de *Ascaris suum*.

Estos datos coinciden con los obtenidos en un estudio (Costantini y col. 2007), que confirmó que el tratamiento aerobio era capaz de reducir la concentración hasta límites indetectables por RT-nested-PCR de virus, como los rotavirus tipos A, B y C, capaces de resistir procesos anaeróbicos.

En este sentido, Strauch y col. en 1986 estudiando enterovirus y rotavirus, observaron altas tasas de inactivación de estos virus en tratamientos aeróbicos de purines. En concreto, analizaron un sistema de tratamiento aeróbico continuo y en 2 fases, similar al de las plantas estudiadas en este trabajo, con la diferencia de que trabajaban a temperaturas superiores a los 60°C, durante un tiempo aproximado de 5 días, que consideraron suficiente

como un método efectivo de eliminación de microorganismos de los purines estudiados.

En conclusión, el tratamiento aeróbico de la fracción líquida de los purines tiene un efecto decisivo en la reducción de patógenos, incluido el VHE según los resultados obtenidos en el presente estudio. La tasa de inactivación de estos patógenos está relacionada con la presencia, alta competitividad y actividad de microorganismos aeróbicos, que junto con los altos valores de pH alcanzados en los procesos oxidativos que tienen lugar en estas balsas, condicionan la degradación de las membranas biológicas y cápsides víricas de los agentes patógenos presentes en el medio.

- **Canales de riego.**

En este estudio no se detectó el VHE en plantas con tratamiento integral en muestras líquidas tomadas en procesos posteriores a la balsa de aerobiosis 2, correspondientes a los canales de riego de las dos plantas, lo que sugiere que el VHE puede ser inactivado en el proceso anaeróbico-aeróbico y por lo tanto, reducir su presencia a niveles no detectables por RT-PCR a tiempo real (Tabla 30).

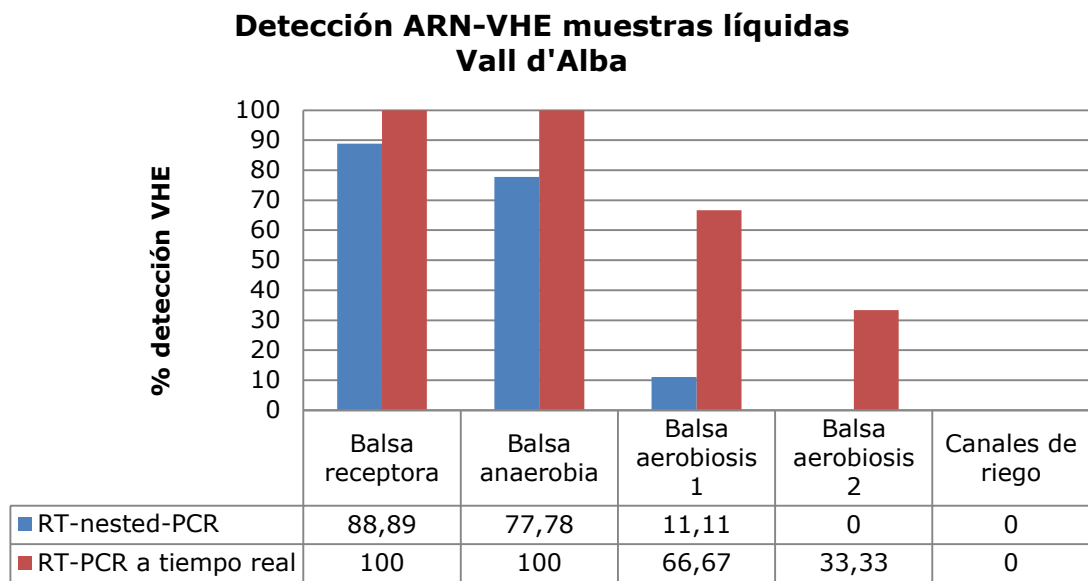
Tabla 30. Resultados obtenidos en los canales de riego de Vall d’Alba y de Todolella. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: canales de riego Vall d’Alba y Todolella												
PLANTA	MUESTREOS										% Positivos	% Positivos
	A	B	C	D	E	F	G	H	K	RT- nested-PCR	RT-PCR Tiempo Real	
Vall d’Alba	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	0	0
Todolella	No muestreado						Verde	Verde	Verde	Verde	0	0

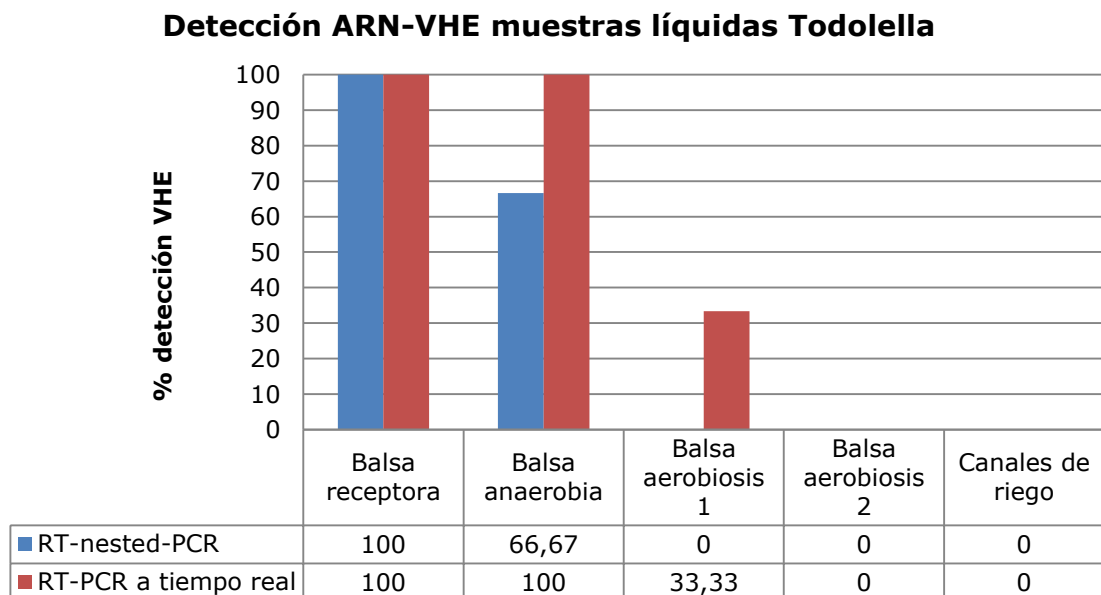
- **Tratamiento global de la fracción líquida en las plantas de tratamiento integral de Vall d’Alba y Todolella.**

En las gráficas 1 y 2, se muestra el descenso porcentual en la detección del ARN-VHE en el transcurso del tratamiento de la fracción líquida de los purines en las plantas de compostaje con tratamiento integral, tanto con RT-nested-PCR como con RT-PCR a tiempo real.

Gráfica 1. Detección del ARN-VHE en las diferentes fases de tratamiento de la fracción líquida de los purines en la planta de tratamiento integral de Vall d’Alba.



Gráfica 2. Detección del ARN-VHE en las diferentes fases de tratamiento de la fracción líquida de los purines en la planta de tratamiento integral de Todolella.



4.1.1.2. Muestras sólidas.

Se recogieron 45 muestras sólidas en la planta de Vall d'Alba. Las muestras recogidas se distribuyeron de la siguiente forma: 9 (20%) en la centrífuga de purines, 9 (20%) en el inicio de los túneles de fermentación, 9 (20%) en el final de los túneles de fermentación, 9 (20%) en las naves de maduración y 9 (20%) muestras correspondientes al producto final o pellet (fig. 52). Únicamente se detectó el VHE en 5 muestras, todas correspondientes a material recogido en la centrífuga de purines, el cual no había sido sometido a ningún proceso de depuración y llevaba escaso tiempo separado de la fracción líquida.

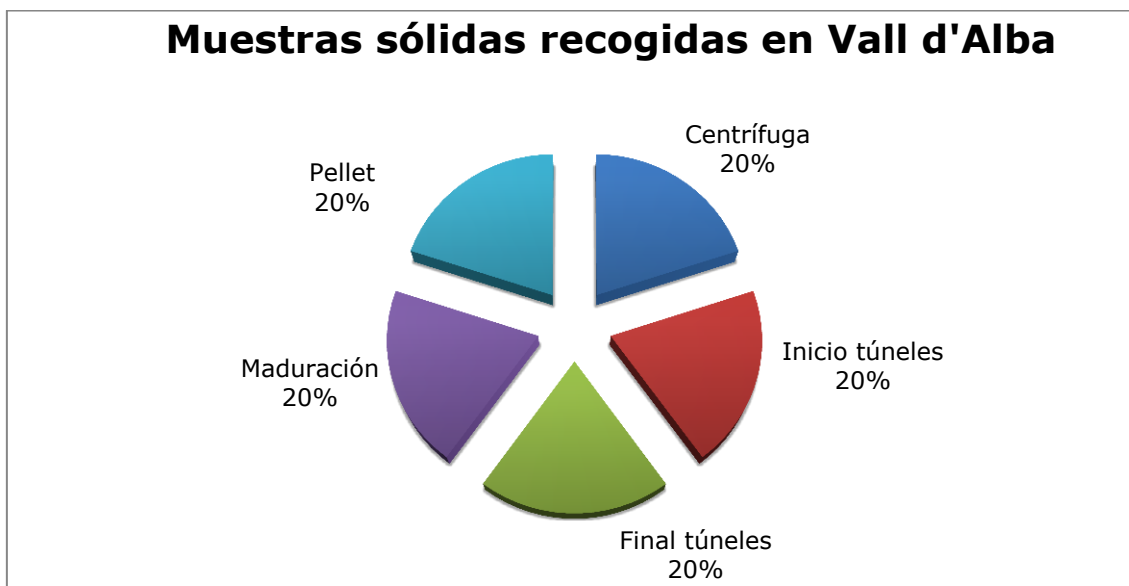


Figura 52. Distribución de las muestras sólidas recogidas en la planta de Vall d'Alba, según punto de muestreo.

En la planta de Todolella, se tomaron 12 muestras sólidas distribuidas de la siguiente forma: 3 (25%) en la centrífuga de purines, 3 (25%) en el inicio de los túneles de fermentación, 3 (25%) en el final de los túneles de fermentación y 3 (25%) en las naves de maduración (fig. 53). En estas muestras sólo se detectó el ARN del VHE en las procedentes de la centrífuga de purines, al igual que lo ocurrido en las muestras sólidas recogidas en la planta de Vall d'Alba.

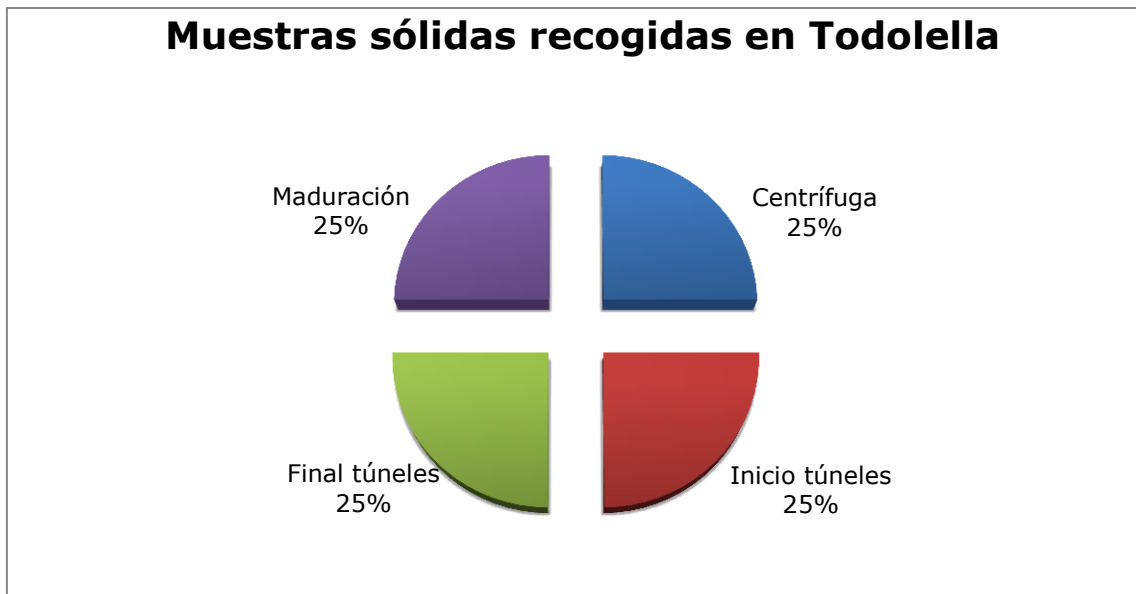


Figura 53. Distribución de las muestras sólidas recogidas en la planta de Todolella, según punto de muestreo.

- **Sólidos de centrífuga.**

De las 7 muestreos realizados en Vall d'Alba, sólo 1 (14,29%) muestreo resultó positivo mediante RT-nested-PCR (muestreo C), aumentando significativamente este porcentaje hasta el 55,56% ($p < 0,05$), al analizarse las muestras por RT-PCR a tiempo real (muestreos A, C, F, G y K).

En la planta de Todolella, 2 (66,67%) de los 3 muestreos resultaron positivos mediante RT-nested-PCR (muestreos H y K) y 3 (100%) muestreos (muestreos G, H y K) mediante RT-PCR a tiempo real (Tabla 31).

producción de sustancias antivíricas producidas por microorganismos presentes en el suelo (Hurst y col. 1980; Sobsey y col. 1980).

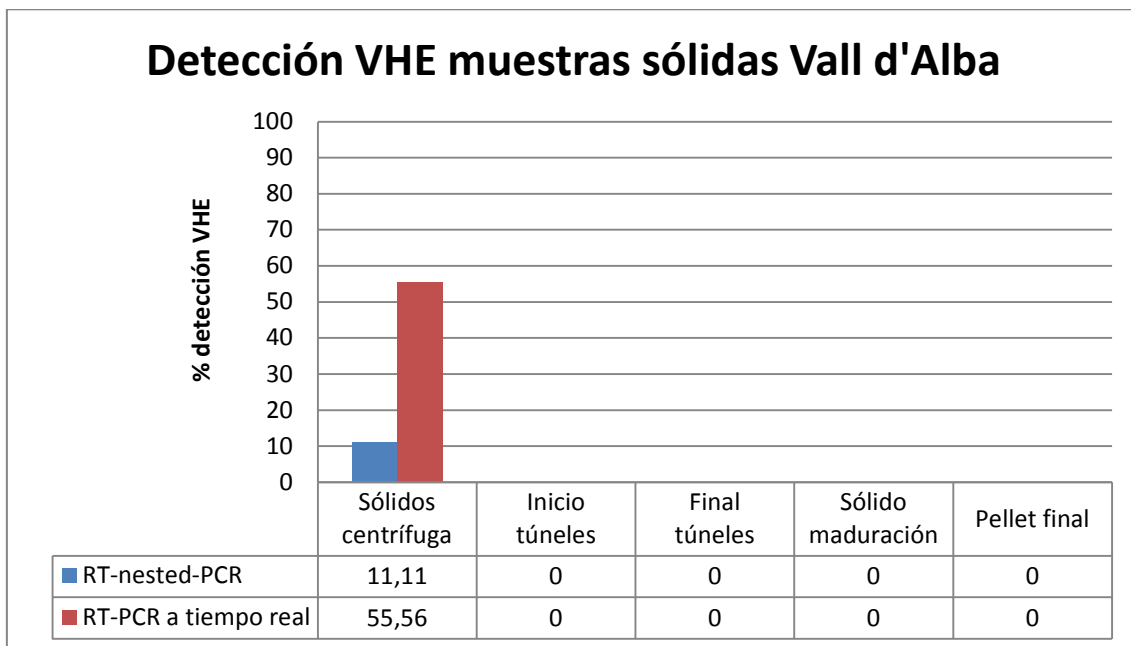
- **Túneles de fermentación y naves de maduración.**

En ninguna de las muestras sólidas correspondientes a producto sometido a tratamiento de fermentación en túneles y maduración en naves se detectó el VHE, lo que sugiere que este virus no resiste las temperaturas a las que se somete el material tratado en estos procesos de fermentación, que alcanza aproximadamente los 65°C. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en un estudio (Emerson y col. 2005), realizado en laboratorio con las cepas Mex 14, Akluj y Sar55 del VHE correspondientes a los genotipos 1 y 2. En dicho estudio, se observó una inactivación del 50% de las partículas de VHE a temperaturas entre 45-50°C, y una inactivación total a 60°C (Cepas Akluj y Sar55), siendo ligeramente mayor la temperatura de inactivación para eliminar el 100% de las cepas Mex14 (Emerson y col. 2005).

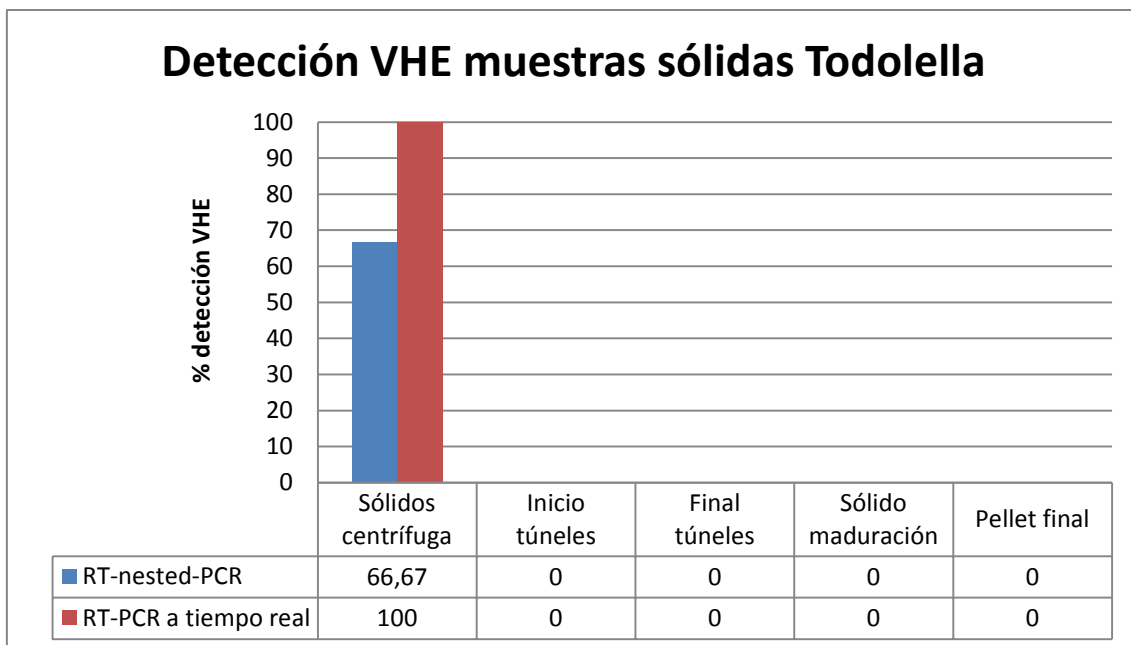
- **Tratamiento global de la fracción sólida en las plantas de tratamiento integral de Vall d'Alba y Todolella.**

Las tasas de detección del ARN del VHE en las muestras sólidas recogidas en diferentes lugares en las plantas de tratamiento integral de Todolella y Vall d'Alba se muestran en las gráficas 3 y 4. Se vuelve a constatar una significativa mayor sensibilidad de la RT-PCR a tiempo real frente a la RT-nested-PCR ($p < 0,05$).

Gráfica 3. Detección del ARN-VHE (%), en las diferentes fases de tratamiento de la fracción sólida de los purines en la planta de tratamiento integral de Vall d'Alba.



Gráfica 4. Detección del ARN-VHE (%), en las diferentes fases de tratamiento de la fracción sólida de los purines en la planta de tratamiento integral de Todolella.



4.1.2. Plantas sin tratamiento integral de purines: Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella.

4.1.2.1. Muestras líquidas.

De las 12 muestras líquidas recogidas en estas plantas, 10 (83,33%) fueron positivas a la presencia del VHE. La distribución porcentual se describe en la figura 54.














Figura 54. Distribución porcentual de muestras líquidas positivas detectadas en plantas sin tratamiento integral de purines.

- **Balsas receptoras.**

En la Tabla 32 se muestra el resultado obtenido en cuanto a la detección del ARN del VHE en las balsas receptoras de las plantas sin tratamiento integral. No se obtuvieron datos significativos en cuanto a la mayor sensibilidad de la RT-PCR a tiempo real frente a la RT-nested-PCR debido al escaso número de muestreos realizados en estas plantas, condicionado en algunos casos por el desmantelamiento de algunas instalaciones en el transcurso del presente estudio, como es el caso de Albocàsser, y en otros casos por la falta de actividad de las plantas por problemas técnicos, como fue el caso de las plantas de Sant Mateu y Salzadella.

Al igual que las plantas con tratamiento integral, las tasas de detección del ARN del VHE en estas balsas receptoras fueron elevadas y confirman la llegada de purines contaminados con el VHE a las plantas con tratamiento no integral.

Tabla 32. Resultados obtenidos en los líquidos procedentes de las balsas receptoras de purines de Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: balsa receptora Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella											
PLANTA	MUESTREOS									% Positivos RT- nested-PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real
	A	B	C	D	E	F	G	H	K		
Albocàsser			No muestreado							0	100
Sant Mateu	No muestreado						No muestreado			50	100
Salzadella							No muestreado			33,33	66,67

- **Canales de riego.**

Las tasas de detección del ARN del VHE en los canales de riego de las plantas con tratamiento no integral (Tabla 33), fueron idénticas a los datos obtenidos en las balsas receptoras y no se apreciaron diferencias significativas. Este hecho es debido a que el material contenido en los canales de riego de estas plantas procede directamente de las balsas receptoras sin haber sido sometido a ningún tratamiento.

Tabla 33. Resultados obtenidos en los líquidos procedentes de los canales de riego de Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: canales de riego Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella											
PLANTA	MUESTREOS									% Positivos RT- nested-PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real
	A	B	C	D	E	F	G	H	K		
Albocàsser	Verde	Naranja	No muestreado						0	100	
Sant Mateu	No muestreado		Verde	Naranja	Verde	Naranja	No muestreado			100	100
Salzadella		Verde	Naranja	Verde	Naranja	Verde	No muestreado			0	66,67

4.1.2.2. Muestras sólidas.

Se recogieron un total de 12 muestras sólidas en las plantas sin tratamiento integral de purines, la distribución porcentual de las mismas según punto de muestreo se detalla a continuación (fig. 55).

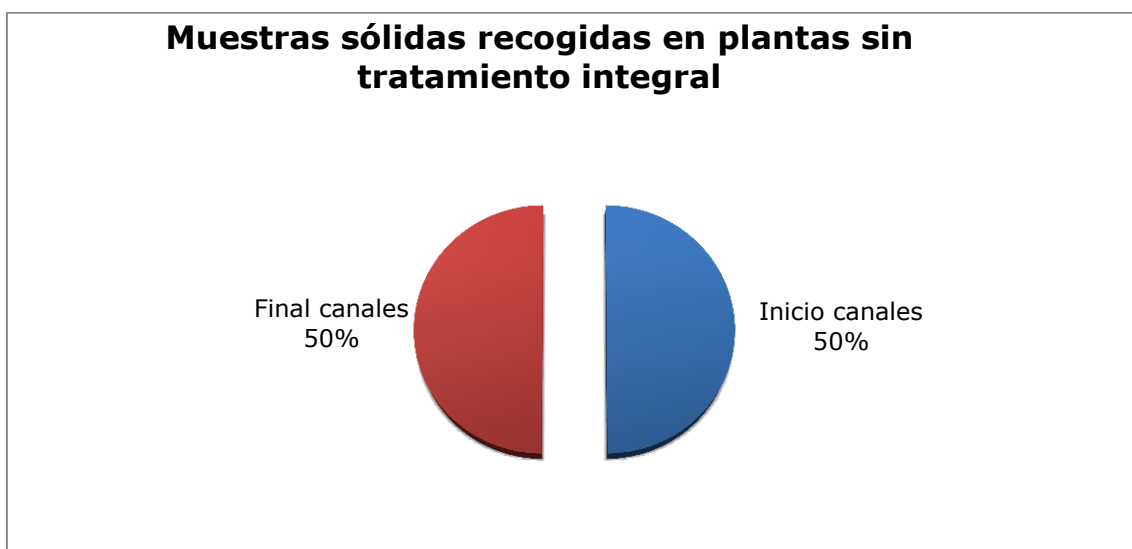












Figura 55. Distribución porcentual de las muestras sólidas recogidas en plantas sin tratamiento integral.

De estas 12 muestras sólidas, sólo 1 (8,33%) resultó positiva a VHE mediante RT-PCR a tiempo real y correspondió a la muestra recogida en el inicio de los túneles de fermentación de la planta de Albocàsser en el muestreo A (Tabla 34), no detectándose en las muestras recogidas al final de los túneles que representan el material que es conducido a la planta de tratamiento integral de Vall d'Alba.

Tabla 34. Resultados obtenidos en los sólidos recogidos en el inicio de las túneles de fermentación de Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella. En la parte inferior a cada muestreo aparecen 2 columnas, la izquierda corresponde al resultado del análisis mediante RT-nested-PCR y la derecha al resultado obtenido con RT-PCR a tiempo real. En color **amarillo**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-nested-PCR. En color **naranja**, muestreos positivos a la presencia de ARN-VHE mediante RT-PCR a tiempo real. En color **verde**, resultados negativos a la presencia de ARN-VHE.

Punto de muestreo: inicio de túneles fermentación												
Albocàsser, Sant Mateu y Salzadella												
PLANTA	MUESTREOS									% Positivos RT- nested-PCR	% Positivos RT-PCR Tiempo Real	
	A	B	C	D	E	F	G	H	K			
Albocàsser			No muestreado							0	100	
Sant Mateu	No muestreado					No muestreado				0	0	
Salzadella							No muestreado				0	0

En estas plantas sin tratamiento integral, el producto sólido que estaba en los túneles de fermentación, era humectado con purines que no habían recibido ningún tratamiento y que dieron resultado positivo a VHE en las balsas receptoras o en los canales de riego de donde procedían. Este hecho se realizaba incluso en el tramo final de los túneles de fermentación, aunque no es la práctica habitual en este proceso, pero se realizaba debido a la necesidad de eliminar excedentes de purín que había en estas plantas. Este hecho, suponía que los purines en algunas ocasiones no permanecían más de 6-7 días en dichos túneles, lo cual debía de tenerse en cuenta.

Si bien es cierto que, la resistencia de partículas víricas en matrices sólidas parece ser menor que en líquidos (Pesaro y col. 1995), son varios los estudios que indican que el VHE presenta una alta resistencia ambiental, habiéndose detectado en ríos, purines y aguas residuales (Albinana-Gimenez y col. 2006; Clemente-Casares y col. 2003; Grimm y col. 2002; Hazam y col. 2010; Meng 2011; Parashar y col. 2011; Toole y col. 2006; Ziemer y col. 2010) y cabría la posibilidad de que las partidas que son trasladadas desde estas plantas hasta las naves de maduración, y que han sido humectadas con purines no tratados pocos días antes, podrían contaminar partidas que sí recibieron un tratamiento integral, aunque nosotros no hemos detectado el ARN-VHE en el producto final que se obtiene en estas plantas y que es trasladado hasta las naves de maduración. Recordemos que las naves de maduración están situadas en la planta de Vall d'Alba, la cual recoge producto de las demás instalaciones.

Estos datos indican que el material sólido mezclado con los purines en los túneles de fermentación, permanecen el tiempo necesario y alcanzan una temperatura suficiente para que se produzca la inactivación del VHE.

4.2. VALORACIÓN GLOBAL DEL PROCESO DE TRATAMIENTO DE PURINES.

Numerosos estudios han sido realizados para evaluar la resistencia de otros virus (Fongaro y col. 2012; Viancelli y col. 2012a; Viancelli y col. 2012b; Viancelli y col. 2013; Ziemer y col. 2010) a diferentes procesos de depuración, pero este es el primer estudio que evalúa la efectividad del compostaje en la inactivación del VHE. Todos los anteriores trabajos coinciden en que la temperatura es un factor determinante en la inactivación de partículas víricas en procesos de compostaje. Así, en un estudio realizado en 1969 por Willey y col., con lodos de depuradora de aguas residuales que contenían poliovirus tipo I, no detectaron la presencia del virus después de someter las muestras a temperaturas entre 60°C y 70°, durante 1 hora en el laboratorio.

Hirovani y col. en 1988, mantuvieron en el laboratorio muestras de purines con colifagos en condiciones de compostaje a 10°C, 20°C, 30°C y 60°C, siendo estos detectables después de 23 días sometidos a las 3 temperaturas menores, pero reduciendo su concentración cuando las muestras eran sometidas a 60°C durante 5 días.

Senne y col. en 1994, realizaron una investigación con el virus de la gripe aviar (HPAI) y con el adenovirus que causa el síndrome de caída de puesta (EDS-76) (Senne y col. 1994), observando que temperaturas inferiores a 55°C eran suficientes para inactivar a la mayoría de estos virus en pilas de compostaje que incluían restos de canales de matadero de aves. Tras 10 días de compostaje en los que se monitorizaron temperaturas entre 41°C y 55°C, en las capas superior e inferior, respectivamente, de la pila de compostaje, no se detectó el virus HPAI y sólo 1 muestra resultó positiva a la presencia del virus EDS-76. Tras un periodo adicional de compostaje de 10 días, sumando un total de 20 días que es un tiempo similar al transcurrido en los túneles de fermentación de las plantas estudiadas en el presente trabajo, ninguno de los virus fue detectado, a pesar de que en las capas inferiores de la pila de compostaje no se midieron temperaturas superiores a 43°C.

En 2005, en otro estudio publicado (McQuiston y col. 2005), se recomendaba el compostaje como un método eficaz para evitar la diseminación del virus de la gripe aviar H7N2, lo que parece indicar que efectivamente el compostaje durante 20-21 días en túneles de fermentación es suficiente para la inactivación de virus.

No obstante, Strauch y col. en 1983, observaron que el virus huérfano entérico citopático bovino (ECBO), perteneciente a la familia *Picornaviridae*, resistió picos de temperatura de 82°C en un sistema de compostaje con reactores aeróbicos, lo que les hizo suponer que podrían haber diferencias de temperatura significativas en el interior de la masa de compostaje, lo que permitía que los virus más resistentes al calor sobrevivieran.

En otro trabajo (Paluszak y col. 2012), en el que se estudió el herpesvirus porcino I, causante de la enfermedad de Aujeszky, se estableció en menos de 1 hora el tiempo necesario para la inactivación completa de este agente infeccioso cuando era sometido a temperaturas cercanas a los 50°C. Aunque los autores matizaron que estos datos fueron obtenidos en laboratorio, mientras que en las pilas de compostaje los datos difieren debido a la diferencia de temperaturas a las cuales se encuentra el material en las mismas, aumentando hasta las 44 horas, en algunos casos, el tiempo para la total inactivación. En este estudio, se recomendaba el compostaje como un método eficaz para la inactivación del herpesvirus porcino I.

Elving y col., en 2012 observaron que el virus de la influenza aviar H7N1, se inactivaba a temperaturas cercanas a los 35°C, aunque observaron que no se alcanzaban temperaturas superiores a 50°C en algunos puntos de las pilas de compostaje, por ejemplo en la superficie de las mismas. En el caso de las plantas de compostaje estudiadas en el presente trabajo, las pilas de compostaje son removidas y mezcladas mecánicamente con cierta periodicidad, asegurando así, que todo el material sometido al proceso de compostaje alcanza, en determinados momentos, temperaturas cercanas a los 65°C.

En otra publicación (Feachem y col. 1983), observaron que en el caso de los adenovirus, reovirus y enterovirus se requerían temperaturas de 30°C durante 3 meses, 40°C durante 2 semanas, 50°C durante 1 día o 60°C durante 2 horas para su inactivación, en las primeras fases del compostaje realizado en plantas de tratamiento de aguas residuales. En este sentido, Guardabassi y col. en 2003, concluyeron que los virus que están presentes con mayor frecuencia en plantas de compostaje son virus sin envoltura, como adenovirus, astrovirus, calicivirus, virus de la hepatitis A (VHA) y VHE. El VHA y el parvovirus porcino, resultaron ser más resistentes a procesos de compostaje a altas temperaturas. En el caso del VHA, se inactivó cuando las muestras se sometieron a 60°C durante 10 horas y en el caso del parvovirus porcino, se requirió un tiempo de compostaje de 8 días a una temperatura de 55°C, aunque no concretaban el tipo de sistema

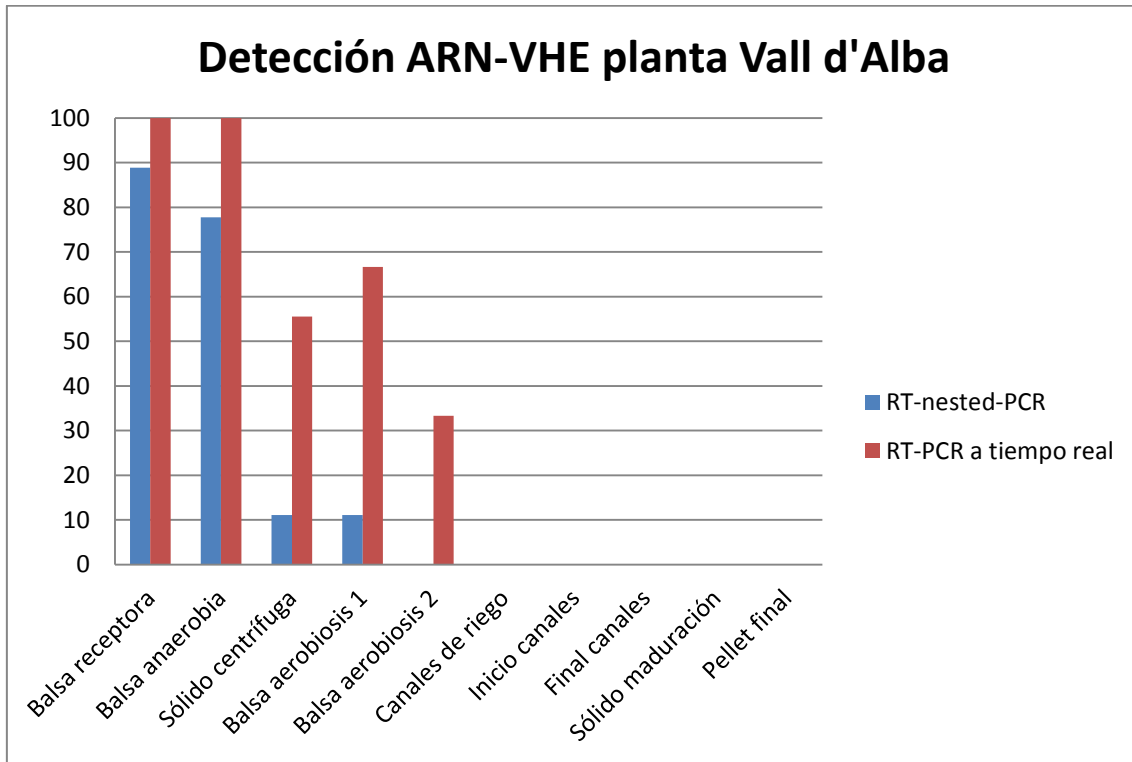
de compostaje empleado. Este estudio no aportaba ningún dato concreto en cuanto a la resistencia del VHE a procesos de compostaje.

En el transcurso de la depuración de los purines en las plantas con tratamiento integral que hemos estudiado, se observa una disminución en la detección del virus a medida que los purines van avanzando en el proceso global de depuración (gráficas 5 y 6), resultando especialmente significativa en la balsa de aerobiosis 1 de las plantas de tratamiento integral ($p < 0,05$), señalado con una flecha roja en la figura 56, sugiriendo este dato que una gran parte de las partículas víricas son inactivadas en este punto del proceso global.

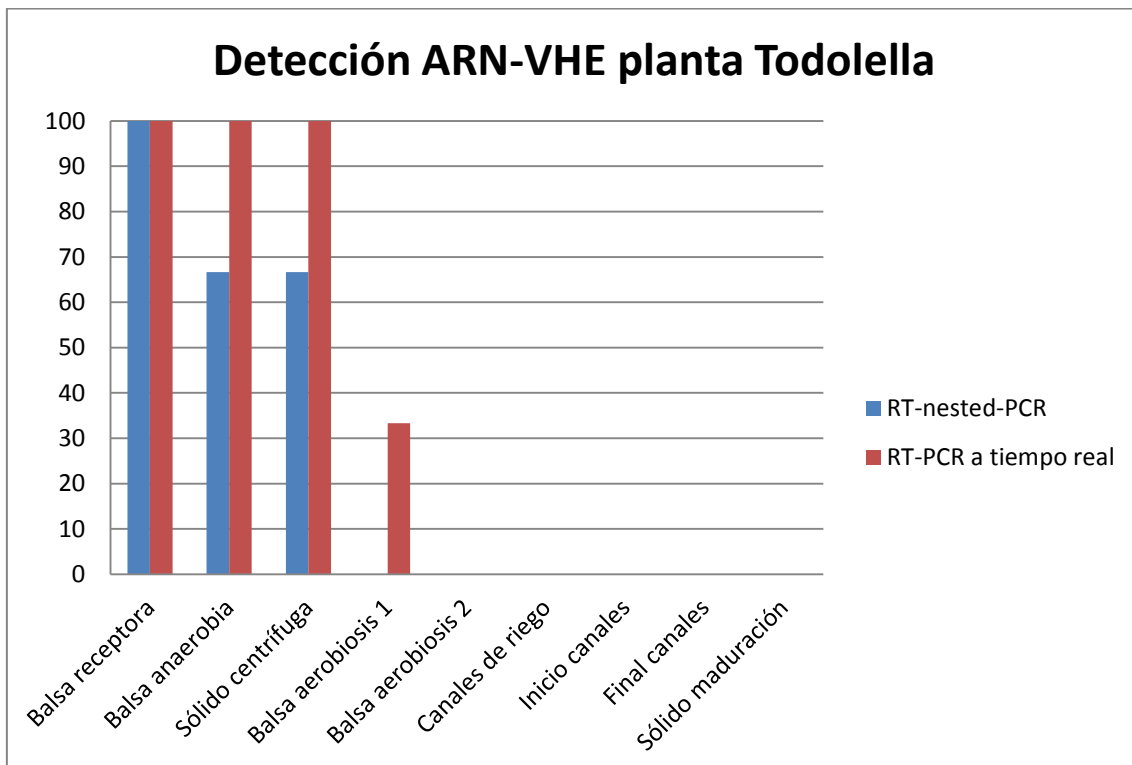
Los factores determinantes para su eliminación durante el proceso global de compostaje, incluyen aspectos químicos, físicos y biológicos que ejercen un efecto sinérgico en cuanto a la inactivación de los agentes patógenos presentes en los purines, incluido el VHE.

En definitiva, los datos obtenidos en nuestro estudio indican que el conjunto de procesos a los que son sometidos los purines en las plantas de tratamiento, son suficientes para la inactivación del VHE.

Gráfica 5. Disminución de las tasas de detección del ARN-VHE mediante RT-nested-PCR y RT-PCR a tiempo real, en la planta de compostaje con tratamiento integral de purines de Vall d'Alba a medida que los purines avanzan en el proceso global de depuración.



Gráfica 6. Disminución de las tasas de detección del ARN-VHE mediante RT-nested-PCR y RT-PCR a tiempo real, en la planta de compostaje con tratamiento integral de purines de Todolella a medida que los purines avanzan en el proceso global de depuración.



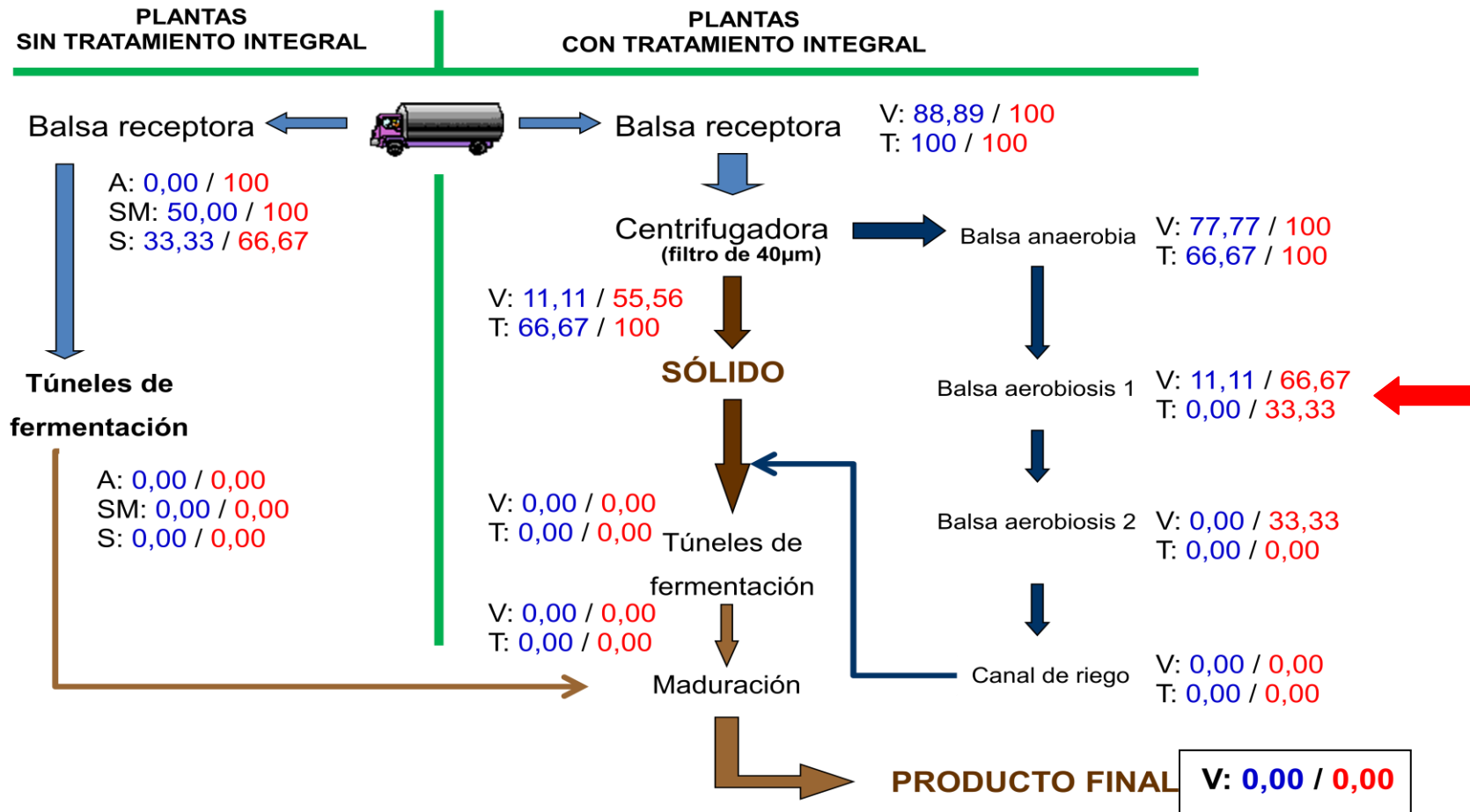


Figura 56. Esquema del proceso global de tratamiento de purines en las plantas de compostaje estudiadas en el presente estudio. En color azul se muestran las tasas de detección del ARN-VHE mediante RT-nested-PCR y en color rojo, las tasas de detección del ARN-VHE mediante RT-PCR a tiempo real en cada punto de muestreo. Con una flecha **roja**, se indica el punto donde se observa una disminución más significativa en cuanto a la detección del ARN-VHE. (V: Vall d'Alba; T: Todoella; A: Albocàsser; SM: Sant Mateu; S: Salzadella)

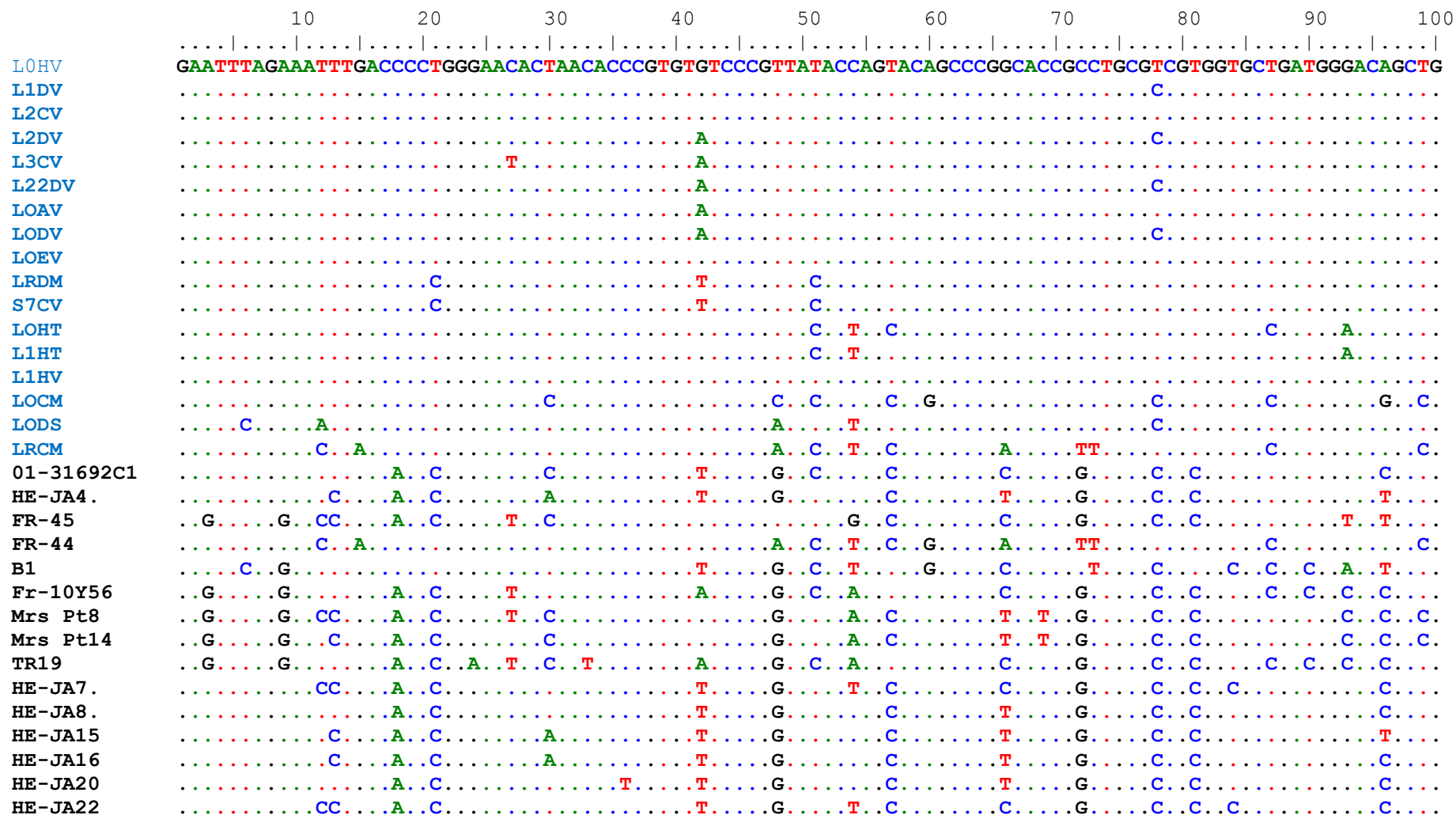
4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS DE VHE PORCINAS AISLADAS.

Del total de muestras positivas a la presencia de ARN del VHE obtenidas en el presente estudio, 17 fueron secuenciadas para proceder a su caracterización y clasificación filogenética.

Se realizó un alineamiento de un fragmento de 172 pb perteneciente a la región ORF2 del genoma del VHE (fig. 57). Para el estudio filogenético se emplearon 166 secuencias de cepas del genotipo 3: 116 forman parte de una amplia revisión de la filogenia del VHE realizada por Lu y col. en 2005, 17 son las secuencias de los aislados del presente trabajo y el resto de secuencias corresponde a cepas porcinas identificadas en granjas de cerdos de la Comunidad Valenciana y a cepas humanas y porcinas aisladas en España y Francia.

Los números de acceso del GenBank, hospedador, país de origen y referencia de las secuencias mencionadas han sido detallados anteriormente en la sección 3.5 (Tabla 19), del capítulo "Material y Métodos".

Figura 57. Alineamiento de 172 nucleótidos de los 17 aislados en este estudio (en color azul) y el resto de secuencias pertenecientes al genotipo 3. Los puntos hacen referencia a los sitios conservados con respecto a la secuencia L0HV.



```

HE-JAS1      .....CC...A.C.....T...G...T.C.....C...G...C.C.C.....C...
HA-JAS3      .....A.C.....T...G...C...T...G...C.C.....C...
HE-JAI3      .....C...A.C...T.C.....C...G...T.C.....C...G...C.....C...
hKOR         .....A.C.....C...T...G.C...C...C...G...C...A...C...
hKOR-DYL     .....A.C.....C.T...C...G...C...T.C...G...C.C.....C...
hKOR-HJY     .....A.C.....C.T...C...G...C...T.C...G...C.C.....C...
hKOR-HSY     .....A.C.....C.T...C...G...C...T.C...G...C.C.....C...
hKOR-JMA     .....A.C.....C.T...C...G...C...T.C...G...C.C.....C...
hKOR-NAB     .....A.C.....C.T...C...G...C...T.C...T.G...C.C.....C...
hKOR-SGK     .....A.C.....C.T...C...G...C...T.C...G...C.C.....C...
KOR1         .....A.C.....C...T...G.C...C...C...G...C...A...C...
KOR2         .....A.C.....C...T...G.C...C...C...G...C...A...C...
KOR3         .....A.C.....C.T...C...G...C...C...T.C...G...C.C.....C...
U2           .....C.....C.T.....C...
NLSW22       .....CC...A.C...T.C.....T.A.G...C...C...G...C.C...T.C...
NLSW122      .....CC...A.C...C.....T.A.G...C...C...G...C.C.C...T.T...
swJ1-1       .G.....A.C...C...C.T.A.G...C...T.T.G...C.C.....C...
swJ2-1       .G.....A.C...C.....A.G...C...C...T.G...C.C.....C...
swJ3-1       .....G.C...G.C.....T.A.G...C...C...G...C.C.....C...
swJ4-1       .....C.A.C.....T.A.G...C...A.GT...C.C.....C...
swJ6-1       .....C.A.C.....T...G...C...C...T.G...C.C.....C...
swJ10-1      .....C.A.....T...G...C...C...G...C.C...C...C...
swJ11-1      .....A.C...C.....T.A.G...C...G...T.C.C.....C...
swJ16-1      .....A.C...C.....C.A.G...C...G...C.C.....T...
swJ17-1      .....C.A.C...C.....T.A.G.C...C...GT...C.C.....C...
swJL234      .....C.A.C...A...T...G...C...T...G...C.C.....Y...
swJL325      .....C.A.C...A...T...G...C...T...G...C.C.....Y...
UMC7A        .....A.A.....T...G...C...G...C...C...C...C...
UMC7B        .G.....A.C...T...T...G...C...C...G...C...C...C...
UMC12B       .....A.C.....T...G...C...C...G...C.C...C...C...
UMC13A       .....G.C...A.C.....T...G...C...C...G...C.C...T...
HE-JA5       .....G...A...T.C...T...A.T.A.C.T.C...C...T.G...C.C...C.C...
HE-JA6       .....G...A.C...T...A...A...T...C...G...C.C...C.C...C...
U2           .....C.....C.T.....C...
941-HRC      .....C.....C...
HE-JA9       .....C.G...A...C...A...A...T.C...T.T.G...C...C.C...C.C...
HE-JA11      .....C.G...A.A.C...A...G...T.C...C...G...C...Y.C.C...C...
    
```


NLSW28G.C.....C.....A.....C.T.C.....T.A.T.TT.....C.C.....C.
NLSW50	.G.....C.....C.T.....T.C.....A.TT.C.....C.....C.
NLSW76	.G.....C.....T.....T.....A.TT.C.....C.C.....C.
NLSW82C.T.C.....A.T.TT.A.....C.C.....C.
NLSW85C.....C.....A.TT.....C.....T.....C.
NLSW91C.....C.....T.C.C.T.C.....A.TT.....C.C.....C.
VH1C.....A.....C.T.C.....A.TT.C.....C.....T.T.C.
VH2A.....A.C.T.....TT.C.....C.....C.
E11C.T.....C.....C.
SPSWMCV12C.....C.T.....C.....C.
Spswmcv7C.....C.....C.G.A.T.....C.....C.....C.
SPSWMCV11	.G.....C.T.....C.C.....C.G.A.T.....C.....C.....G.C.
SPSWMCV9C.....C.T.....C.....C.
Spswfcv3C.T.....A.....C.....C.
SPSWSCV17C.....C.T.....C.....C.
SPSWSCV16C.....C.T.....C.....C.
Spswscv8C.....C.T.....C.....C.
SPSWSCV15C.....C.T.....C.....C.
Spswfcv5C.....C.T.....C.....C.
SPSWMCV10C.....C.T.....C.....C.
SPSWSCV14C.....C.T.....C.....C.
Spswscv4C.....C.T.....C.....C.
U1C.....C.T.....C.....C.
spswcv2C.....C.T.....C.....C.
SPSWSCV13C.....C.T.....C.....C.
SPSWFCV22C.A.T.....C.....T.C.....T.....G.....A.T.TT.....C.C.G.C.....G.
SPSWFCV23C.A.T.....C.....T.C.....T.....G.....A.T.TT.....C.C.G.C.....G.
SPSWFCV24C.A.T.....C.....T.C.....T.....G.....A.T.TT.....C.C.G.C.....G.
SPSWFCV25C.A.T.....C.....T.C.....T.....G.....A.T.TT.....C.C.G.C.....G.
SPSWFCV26C.A.T.....C.....T.C.....T.....G.....A.T.TT.....C.C.G.C.....G.
SPSWFCV26C.A.T.....C.....T.C.....T.....G.....A.T.TT.....C.C.G.C.....G.
SPSWFCV27C.A.T.....C.....T.C.....T.....G.....A.T.TT.....C.C.G.C.....G.
SPSWFCV28C.A.T.....C.....T.C.....T.....G.....A.T.TT.....C.C.G.C.....G.
FGC.T.....A.....C.....C.
SPSWFCV29C.....C.....C.
SPSWFCV30C.....C.....C.
SPSWFCV31C.....C.....C.

```

SPSWFCV32 .....C.....
SPSWFCV33 .....C.....T.....C.....T.....C.....C.....
77HU .....C.....T.....T.....C.....
NT8 .....C.....C.....G.....C.....T.....C.....G.....T.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....T.....
NT7 .....CC.....T.....C.....C.....G.....C.....T.....C.....G.....T.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....A.....T.....
NT6 .....G.....C.....C.....A.....G.....C.....T.....C.....G.....T.....T.....TT.....A.....C.....C.....T.....C.....
NT5 .....G.....A.....G.....C.....T.....C.....G.....T.....T.....C.....C.....C.....A.....T.....
NT4 .....C.....T.....T.....T.....T.....G.....TT.....C.....C.....T.....G.....C.....
NT3 .....G.....G.....C.....T.....T.....T.....C.....T.....C.....G.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....T.....C.....
NT2 .....A.....T.....C.....T.....C.....A.....TT.....C.....C.....T.....G.....C.....
NT11 .....G.....C.....G.....T.....C.....G.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....T.....C.....
NT1 .....G.....C.....C.....G.....T.....C.....T.....T.....C.....C.....C.....T.....

```

110 120 130 140 150 160 170

```

L0HV AGCTCACAACCACATGCAGCCACACGTTTTATGAAGGACTTGCAATTCACCGGGACAAATGGTGTGGTGAGG
L1DV .....T.....C.....
L2CV .....T.....C.....
L2DV .....
L3CV .....
L22DV .....
LOAV .....
LODV .....
LOEV .....
LRDM .....C.....
S7CV .....T.....C.....
LOHT .....T.....C.....
L1HT .....T.....
L1HV .....
LOCM .....T.....T.....C.....T.....G.....C.....C.....A.....
LODS .....
LRCM .....T.....T.....T.....A.....
01-31692C1 .....T.....C.....A.....C.....T.....A.....C.....T.....C.....G.....C.....C.....
HE-JA4 .....T.....C.....A.....C.....T.....A.....T.....T.....C.....G.....C.....

```

```

FR-45      .A..T..C..T..A..T.....G.....C.....A..C.....T.....C..G.....
FR-44      ....T.....T.....T.....T..T..A.....
B1         .....G.....G..C..C.....C..C.....T.....G.....C..C.....
Fr-10Y56   ....T..T..T..G.....G..C.....C..T.....T.....T..G..C..G.....
Mrs Pt8    .A..T..C.....A..G.....G..C.....C.....C.....T..G.....G..C.....
Mrs Pt14   .A..T..C.....A..G.....G..C..C.....C.....C.....T..G.....G..C.....
TR19      ....T..T..T..G.....G..C..C.....C.....T.....G..C..G.....
HE-JA7.    .....C.....A.....T.....T..T..C..G.....C.....A.....
HE-JA8.    .....C.....A.....T.....T..T..C..G.....
HE-JA15    ....T..C.....A.....C.....T..A.....T..T..C..G.....
HE-JA16    ....T..C.....A.....C.....T..A.....T..T..C..G..C.....
HE-JA20    ....T..C.....A.....T.....T..T..C..G..C.....
HE-JA22    .....C.....A.....T.....T..T..C..G.....C.....A.....
HE-JAS1    .....C.....A.....T.....T..T..C..G.....C.....A.....
HA-JAS3    ....T..C.....A.....T.....T..T..C..G..C.....
HE-JAI3    .....C.....A.....C.....A..TC.....T..T..C..G..C.....
hKOR      ....T..T.....A.....A..T.....T..T..C..G.....C.....C.....
hKOR-DYL   .A..T..T.....A.....C.....A..TC..T.....T..T..C..T.....C.....C.....
hKOR-HJY   .A..T..T.....A.....C.....A..TC..T.....T..T..C..T.....C.....
hKOR-HSY   .A..T..T.....A.....C.....A..TC..T.....T..T..C..T.....C.....
hKOR-JMA   .A..T..T.....A.....C.....A..TC..T.....T..T..C..T.....C.....
hKOR-NAB   .A..T..T.....A.....C.....A..TC..T.....T..T..C..T.....C.....
hKOR-SGK   .A..T..T.....A.....C.....A..TC..T.....T..T..C..T.....C.....
KOR1      ....T..T.....A.....A..T.....T..T..C..G.....C.....
KOR2      ....T..T.....A.....A..T.....T..T..C..G.....C.....
KOR3      .A..T..T.....A.....C.....A..TC.....T..T..C..T.....C.....
U2        ....T.....
NLSW22    ....T..C..T..A.....A..C.....T..T..C..G..C.....
NLSW122   ....T..T.....A.....C.....A..T.....C..T..T..C..TG.....C.....
swJ1-1    ....T..C.....A.....C.....TC.....T..T..C..G.....C.....
swJ2-1    ....T..T.....A.....C.....TC.....T..T..C..G..C..C.....
swJ3-1    ....T..T.....A.....C.....T.....T.....C..G..C.....
swJ4-1    ....T..T.....A.....A..TC.....T..T..C..G..C..C.....
swJ6-1    .....C.....A.....A..C.....C..T..T..C.....C.....
swJ10-1   .....C.....A..G.....A..C.....C..T..T..C.....C.....C.....
swJ11-1   ....T..T.....A.....C..C.....TC.....T..T..C..G.....C.....
swJ16-1   ....T..C.....A.....C.....TC.....T..C..G..C..C.....

```

```

swJ17-1      ...T.T...A.....C.....TC.....T.C.G.C.C.....
swJL234     ...T.C...A.....C.....T.A...T.T.C.G.Y.....
swJL325     ...T.C...A.....C.....T.A...T.T.C.G.Y.....
UMC7A       ...T.T...G.....C.....C.....T.T.T.G.C.C.C.....
UMC7B       .A.T...A.....C.....TC.....T.T.T.G.C.C.....
UMC12B      ...T.T.T.G.....T.T.T.G.C.....
UMC13A      .A.T.C...A.....C.....TC...C...T.C.G.C.C.....
HE-JA5      ...T.T.G.G...G.....T.C.G...A...A.....
HE-JA6      .A.T.C.T.G.G...G.....A.C...T.T.C.G...G.C.C...
U2          ...T.....
941-HRC     .....C.....
HE-JA9      ...T.C...G.G...G.....T.C.G...G...A.....
HE-JA11     ...T.C.T.G.G...G...C...TC.....T.C.G...G...A.....
HE-JA21     ...T.T.T.G.G...G...A.C...T.C.G...G...A.....
HE-JA23     ...T.C.T.G.G...G.G...A.C...C...T.C.G.C.G...A.....
HE-JBD1     .....C.T.A.G...G.....T.G...A.....
HE-JBD2     ...T.C.T.G.G.....TC...C...T.G...G...C.....
HE-JBD3     ...T.C.T.G.G.T.G...A.C...T...C...G.....
HE-JF2      ...T.C...G.G...G.....C.....T.T.G...A.....
HE-JO-1982  .A...C.T.G.G...G.....C.....T.T.G...G.....
swJ15-1     ...T.C.T.G.G...G...C...C...C.T.T.C.G.Y.G.....
swJ18-1     ...T.C...G.G...G.....T.C.G...G...A.....
swJ19-1     ...T.C...G.T...C.....T.T.T.G...G.....
swJ22-4     ...T.C.T.G.G...G.G...C...T.C.G...A...C.A.....
swJ23-1     .....C...G.G.T.T...C...C...C.T...C.G...G...C.....
swJ24-1     ...T.C...G.G.....C.....T.T.G...G.....
swJ25-1     ...T.C...R.G...G...A.....T.C.G...G...A.....
swJ681      ...T.T.T.G.G...G.....T.....T.C.G...A...A.....
swJC1990    ...T.T.T.G.G...G.....T.C.G...A.....
swJL82      ...T.C.T.G.G...G...A.TC...C.T.T.C...G.....
swJL97      .....C...G.G...G.....C.....C.G...G.C...A.....
swJL98      .....C...G.G...G.....C.....C.G...G.C...A.....
NLSW20     .A...C.T.A.G...G...C...C...T.G...G.....
NLSW36     .A.T.T.T.A.G...T...C...C...C...C.G...G.C.C...
NLSW68     ...T.C...A.G...G.C.C...C...C...T.G...G.C...
NLSW99     ...T.C...G.G...T.C.C...C...C...T.TG...G.C...A.....
NLSW105    ...T.C...G.G...T.C...C...C...T.G...G.C.....

```


TW3SW T T . A G . C . C A . C T . A . C . G G . C . C . . .
 TW12SW T T . A G . C . C A . C T . A . C . G G . C . C . . .
 TW13SW T A G . C . C A . C T . A . C . G G . C . C . . .
 P143/11/02 G G G . C . C C . . . C . T . T G . C . C . C
 P354/1/02 G . T T G C C . . . C G C
 Sendai G C G . C . C C . A G C
 swJ8-2 . A . T . C G G . C C T . T G C . C . C . . .
 swJ8-6 . A . T . C G G . C C T . T G C Y
 swJ8-8 . A . T . T G G . C C T . T G C C
 swJ12-1 T . G G G . C . C T C T . T T G C C
 swJ791 G C G . C . C C . A G C
 UK 8734 T . G G G C C . . . C T G C . C
 NLSW15 T . G G G C C G C . C
 NLSW28 G C G C G C . C
 NLSW50 T T T T T T C
 NLSW76 T T T T T T C
 NLSW82 C C C C C C
 NLSW85 T . G G G C C T T C
 NLSW91 T C T T T T T C
 VH1 T T T T T T C
 VH2 T T C T T T T C
 E11 T T T T T T T C
 SPSWMCV12 T T T T T T T C
 SpswmCV7 T T C . . . T . T G C . C . A
 SPSWMCV11 T . . . T . C C C . . . C . T G C . A
 SPSWMCV9 T T T T T T T C
 SpswfcV3 T T C C C C C
 SPSWSCV17 T T T T T T T C
 SPSWSCV16 T T T T T T T C
 SpswscV8 T T T T T T T C
 SPSWSCV15 T T T T T T T C
 SpswfcV5 T T T T T T T C
 SPSWMCV10 T T T T T T T C
 SPSWSCV14 T T T T T T T C
 SpswscV4 T T T T T T T C
 U1 T T T T T T T C
 spswCV2 T T T T T T T C

Al realizar un estudio por separado de las secuencias de los aislados obtenidos y pertenecientes al subtipo 3f, se puede observar que aparece un grupo principal de 11 muestras pertenecientes a aislados de las balsas receptoras de las plantas de Vall d'Alba y Salzadella y a diferentes muestras tomadas en la balsa anaerobia y aerobia 1 de la planta de Vall d'Alba (fig. 53).

En un segundo grupo, se observan 2 cepas: S7CV y LRDM pertenecientes a sólido de centrifuga de la planta de Vall d'Alba y a canal de riego de la planta de Sant Mateu respectivamente, ambas muy cercanas a una cepa humana (941-HRC) aislada en un paciente del Hospital Ramón y Cajal de Madrid (fig. 59), con la cual comparten un 98,2% y un 98,8% de similitud nucleotídica (Tabla 35).

La cepa LRCM, perteneciente a una muestra positiva recogida en el canal de riego de la planta de Sant Mateu, guarda una estrecha relación filogenética con dos cepas humanas del VHE, la FR-44 aislada de un paciente con hepatitis E en el Hospital Val de Grace de París en el año 2008 y con la que presenta un 98,8% de homología nucleotídica; y con la cepa VH2, correspondiente a una cepa humana aislada de un paciente en Barcelona (Pina y col. 2000), con la que comparte un 96,5% de similitud nucleotídica (Tabla 35).

Los aislados LOEV, LOHV y LIHV, todos ellos procedentes de la planta de Vall d'Alba, presentaron de igual modo una elevada similitud nucleotídica (97%) con un aislado humano (77-HU) procedente de una muestra de suero de un paciente del hospital Ramón y Cajal de Madrid con hepatitis E, que además resultó ser trabajador en un matadero.

Estos datos coinciden con estudios realizados en otros países, en los que se observó una elevada homología entre cepas humanas y porcinas aisladas en la misma zona geográfica (Meng y col. 1997; Hsieh y col. 1999; Takahashi y col. 2003; Ijaz y col. 2005; Ahn y col. 2005; Colson y col. 2010; Wenzel y col. 2011), lo que confirma la consideración del VHE como un agente

zoonótico y un problema emergente de salud pública en países desarrollados.

En relación a los aislados LOHT y L1HT, ambos de la planta de Todoilella, aparecen relacionados filogenéticamente con cepas porcinas aisladas en la misma zona geográfica (SPSWMCV3-18), en un estudio realizado en granjas de cerdos (Fernández-Barredo y col. 2006) y también con la cepa E11 (Pina y col. 200) perteneciente a las aguas residuales de un matadero de cerdos en Barcelona (fig. 59).

El aislado perteneciente a la muestra LOCM de la balsa receptora de Sant Mateu, guarda estrecha relación con aislados de cepas porcinas identificados por Fernández-Barredo y col. en 2006 (SPSWMCV7 y SPSWMCV11) en fosas de purines de la misma zona geográfica estudiada en este trabajo.

Estos datos sugieren que estas cepas se mantienen circulando entre las granjas de cerdos, actuando el ganado porcino como reservorio y fuente de diseminación continua del VHE.

Por otra parte, todos los aislados en nuestro estudio guardan una elevada similitud nucleotídica con un grupo de cepas porcinas identificadas en Holanda y que oscila entre el 85,4% de la cepa LOCM con la cepa NLSW28 y el 95,9% de la cepa LOHT con la cepa NSLW15. La causa más probable de esta proximidad filogenética es que Holanda es el primer exportador de ganado porcino vivo, en concreto de lechones, y España es el tercer importador de lechones de Europa. Este dato, implica que diferentes cepas de VHE tendrían una movilidad elevada dentro de la Unión Europea debido al tránsito de ganado porcino entre países y que a su vez estas cepas perduran en las granjas.

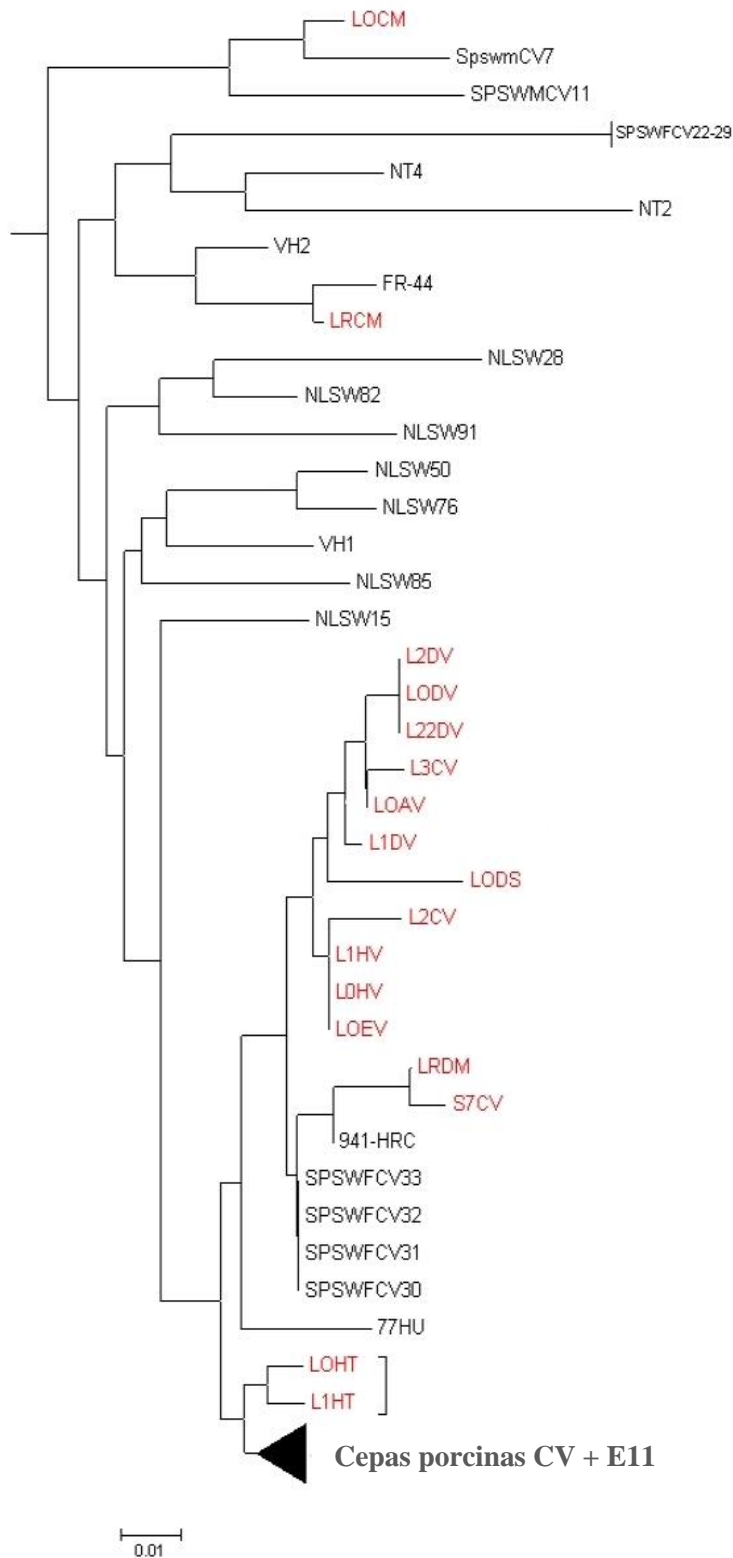


Figura 59. Árbol filogenético de las cepas de VHE pertenecientes al subtipo 3f. En color rojo se muestran los aislados del presente estudio y la relación que guardan con el resto de cepas pertenecientes al subtipo 3f del genotipo 3.

Tabla 35. Matriz de similitud nucleotídica basada en la comparación de un fragmento de 172 pb de las 17 cepas aisladas en este estudio con el resto de aislados del subtipo 3f.

Secuencia	LOHV	L1DV	L2CV	L2DV	L3CV	L22DV	LOAV	LODV	LOEV	LRCM	LRDM	S7CV	LOHT	L1HT	L1HV	LOCM	L0DS
941-HRC	98,8	98,2	97,6	97,6	97,6	97,6	98,2	97,6	98,8	91,2	98,8	98,2	95,9	97,6	98,8	91,2	95,9
FR-44	90,1	89,5	88,9	88,9	88,9	88,9	89,5	88,9	90,1	98,8	88,9	89,5	91,8	91,2	90,1	90,1	90,1
NLSW15	93,0	92,4	91,8	91,8	91,8	91,8	92,4	91,8	93,0	91,8	91,8	91,2	95,9	94,1	93,0	90,1	91,8
NLSW28	88,9	88,3	87,7	87,7	87,7	87,7	88,3	87,7	88,9	90,6	90,1	89,5	90,6	88,9	88,9	85,4	87,7
NLSW50	91,2	91,8	90,1	91,2	91,2	91,2	90,6	91,2	91,2	91,8	88,9	88,3	91,8	91,2	91,2	88,3	90,6
NLSW76	91,2	91,8	91,2	91,2	91,2	91,2	90,6	91,2	91,2	90,6	88,9	88,3	90,6	91,2	91,2	87,2	90,6
NLSW82	92,4	91,8	91,2	91,2	91,2	91,2	91,8	91,2	92,4	93,0	91,2	90,6	93,0	92,4	92,4	87,2	90,6
NLSW85	93,6	93,0	92,4	92,4	92,4	92,4	93,0	92,4	93,6	91,8	91,2	90,6	92,4	93,0	93,6	89,5	90,6
NLSW91	90,1	89,5	88,9	88,9	88,9	88,9	89,5	88,9	90,1	93,6	88,9	88,3	90,6	90,1	90,1	89,5	89,5
VH1	91,2	91,8	90,1	91,2	90,1	91,2	90,6	91,2	91,2	93,0	91,2	90,6	93,6	93,0	91,2	90,1	90,6
VH2	92,4	93,0	91,2	92,4	91,2	92,4	91,8	92,4	92,4	96,5	91,2	91,8	93,0	93,6	92,4	91,2	93,0
E11	97,6	97,0	96,5	96,5	96,5	96,5	97,0	96,5	97,6	93,6	96,5	95,9	98,2	98,8	97,6	91,2	95,9
SPSWMCV12	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SpswmCV7	88,3	88,9	87,2	88,3	87,2	88,3	87,7	88,3	88,3	90,6	87,2	87,7	88,9	88,3	88,3	95,9	87,2
SPSWMCV11	86,6	87,2	86,6	86,6	85,4	86,6	86,0	86,6	86,6	86,6	85,4	86,0	87,2	86,6	86,6	91,8	85,4
SPSWMCV9	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SpswfcV3	95,9	95,3	95,9	94,7	94,7	94,7	95,3	94,7	95,9	93,0	94,7	94,1	96,5	97,0	95,9	89,5	94,1
SPSWSCV17	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SPSWSCV16	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SpswscV8	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SPSWSCV15	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SpswfcV5	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SPSWSCV14	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SpswscV4	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
spswCV2	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SPSWSCV13	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	93,0	95,9	95,3	97,6	98,2	97,0	90,6	95,3
SPSWFCV22	86,0	86,6	85,4	86,0	84,8	86,0	85,4	86,0	86,0	88,3	84,8	85,4	85,4	86,0	86,0	86,6	86,6
SPSWFCV23	86,0	86,6	85,4	86,0	84,8	86,0	85,4	86,0	86,0	88,3	84,8	85,4	85,4	86,0	86,0	86,6	86,6
SPSWFCV24	86,0	86,6	85,4	86,0	84,8	86,0	85,4	86,0	86,0	88,3	84,8	85,4	85,4	86,0	86,0	86,6	86,6
SPSWFCV25	86,0	86,6	85,4	86,0	84,8	86,0	85,4	86,0	86,0	88,3	84,8	85,4	85,4	86,0	86,0	86,6	86,6
SPSWFCV26	86,0	86,6	85,4	86,0	84,8	86,0	85,4	86,0	86,0	88,3	84,8	85,4	85,4	86,0	86,0	86,6	86,6
SPSWFCV27	86,0	86,6	85,4	86,0	84,8	86,0	85,4	86,0	86,0	88,3	84,8	85,4	85,4	86,0	86,0	86,6	86,6
SPSWFCV28	86,0	86,6	85,4	86,0	84,8	86,0	85,4	86,0	86,0	88,3	84,8	85,4	85,4	86,0	86,0	86,6	86,6
SPSWFCV29	86,0	86,6	85,4	86,0	84,8	86,0	85,4	86,0	86,0	88,3	84,8	85,4	85,4	86,0	86,0	86,6	86,6
SPSWFCV30	99,4	98,8	98,2	98,2	98,2	98,2	98,8	98,2	99,4	91,8	98,2	97,6	96,5	98,2	99,4	90,6	96,5
SPSWFCV31	99,4	98,8	98,2	98,2	98,2	98,2	98,8	98,2	99,4	91,8	98,2	97,6	96,5	98,2	99,4	90,6	96,5
SPSWFCV32	99,4	98,8	98,2	98,2	98,2	98,2	98,8	98,2	99,4	91,8	98,2	97,6	96,5	98,2	99,4	90,6	96,5
SPSWFCV33	99,4	98,8	98,2	98,2	98,2	98,2	98,8	98,2	99,4	91,8	98,2	97,6	96,5	98,2	99,4	90,6	96,5
77HU	97,0	96,5	95,9	95,9	95,9	95,9	96,5	95,9	97,0	92,4	94,7	94,1	95,3	95,9	97,0	89,5	95,9
NT4	90,6	91,2	89,5	90,6	89,5	90,6	90,1	90,6	90,6	89,5	88,3	87,7	90,6	91,2	90,6	88,9	90,1
NT2	85,4	86,0	85,4	86,0	84,8	86,0	85,4	86,0	85,4	88,9	85,4	86,0	87,7	86,0	85,4	88,3	85,4

5.- CONCLUSIONES

1. El VHE está presente en un gran número de los purines que llegan desde las granjas porcinas a las plantas de tratamiento estudiadas, situadas en la Comunidad Valenciana.
2. La detección del VHE en los purines indica que estos son un medio de diseminación del VHE cuando no se someten a un proceso de depuración y se vierten sin control sobre campos de cultivo.
3. El bajo porcentaje de detección del VHE en las muestras líquidas analizadas en fases posteriores a la balsa de aerobiosis 1, indica que el proceso anaeróbico-aeróbico que se aplica en las balsas hasta esta etapa del tratamiento, es efectivo para la eliminación de este patógeno.
4. La ausencia de detección del VHE en las muestras sólidas correspondientes a las fases finales del tratamiento y al producto final en forma de pellet, indica que el procedimiento seguido en las plantas estudiadas es una forma eficaz de gestionar los excedentes de purines generados por la ganadería porcina. Adicionalmente, este proceso concluye con la obtención de un fertilizante orgánico (compost) de alta calidad y con menos riesgos para la salud pública al reducirse considerablemente la presencia de patógenos, debido en gran medida a las temperaturas alcanzadas en los túneles de compostaje y en las naves de maduración, cercanas a los 65°C.
5. La detección del ARN-VHE mediante la RT-PCR a tiempo real ha resultado más sensible que la obtenida mediante RT-nested-PCR. La utilización de esta técnica cuantitativa ha sido determinante para detectar bajas concentraciones del virus que no fueron detectables por PCR cualitativa y así establecer la eficacia de cada uno de los procesos del tratamiento de purines con mayor exactitud.

6. La alta similitud nucleotídica entre algunas cepas de origen porcino aisladas en este trabajo, con cepas humanas del VHE aisladas en otros estudios, confirma que la hepatitis E puede considerarse como una zoonosis emergente que afecta a países industrializados como España.

6.- RESUMEN

El virus de la hepatitis E (VHE), es un virus desnudo con simetría icosaédrica, cuyo genoma se compone de una única hebra de ARN de polaridad positiva, con una longitud aproximada de 7.5 Kb.

El VHE es el agente causal de la hepatitis E, enfermedad que en la mayoría de los casos cursa con una hepatitis aguda autolimitada. Sin embargo, varios estudios revelan la posibilidad de progresar hacia la cronicidad en pacientes con patología hepática previa. En casos más graves, la enfermedad puede dar lugar a un cuadro de hepatitis fulminante.

La mortalidad de esta enfermedad oscila entre el 0,4 y el 4%, elevándose hasta un 25% en el caso de mujeres embarazadas, especialmente durante el tercer trimestre de embarazo.

La principal vía de transmisión del VHE es la oral-fecal, siendo la responsable de la mayoría de brotes epidémicos en países subdesarrollados y en vías de desarrollo descritos hasta la fecha, en concreto por bebida de agua contaminada. También resulta significativa la transmisión por transfusiones de sangre y por ingesta de carne cruda o semicruda de ciertos animales, en especial del cerdo.

Sin embargo, el patrón epidemiológico del virus de la hepatitis E está cambiando en los últimos años, apareciendo cada vez más casos de esta enfermedad en países desarrollados, como España. En este sentido, juega un papel importante el ganado porcino, ya que según las últimas investigaciones, se confirma que éste actúa como reservorio de la enfermedad y por lo tanto como potencial foco de infección para la población humana.

España es el segundo país productor de porcino en la Unión Europea, sólo superado por Alemania, con un total de 25 millones de cabezas de ganado censadas, de las cuales más de 1 millón pertenecen a la Comunidad Valenciana.

La zona geográfica donde se realizó el presente estudio, se encuentra en las comarcas de Els Ports, L'Alt i Baix Maestrat i La Plana Alta en la provincia de Castellón, en las que hay censadas alrededor de 170 granjas, constituyendo un núcleo importante de producción porcina. Estas explotaciones generan una alta cantidad de purines, que se estima en más de 1 millón de toneladas al año, convirtiéndose en una preocupación tanto para las autoridades sanitarias como para los propios ganaderos en cuanto a la problemática que conlleva su gestión.

Algunos de los problemas que ocasionan los purines generados son, entre otros: la generación de olores, la contaminación de suelos y aguas subterráneas y la diseminación de agentes patógenos, entre ellos el VHE. Por lo tanto, es necesario establecer protocolos de tratamiento que permitan minimizar los riesgos para la salud pública y el medio ambiente que estos pueden ocasionar. En este sentido, se decidió por parte de las autoridades, establecer en la provincia de Castellón un Plan Piloto de plantas de tratamiento de purines, que permitiera gestionar los excedentes que no podían ser aplicados directamente en el terreno agrícola como fertilizante orgánico. Adicionalmente, se pretendía que la obtención de un abono mineral en forma de compost (producto final), permitiera cubrir con su comercialización los gastos derivados del funcionamiento de las plantas.

El principal objetivo de este estudio fue detectar mediante retrotranscripción, seguida de una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR a tiempo real), la presencia del ARN del VHE en las diferentes fases de tratamiento de purines en estas plantas, y así constatar que este procedimiento era efectivo en la eliminación de este virus. Además, se procedió a la secuenciación de las cepas aisladas para realizar su caracterización y clasificación filogenética. Estas secuencias se compararon con otras de origen porcino y humano depositadas en el GenBank.

Se recogieron un total de 189 muestras en 5 plantas, 2 con tratamiento integral de purines, que incluían una separación previa de sólidos y líquidos, seguida de un tratamiento por separado de cada una de las fracciones y 3

plantas con un sistema que no comprendía separación inicial de los purines y que no realizaba por tanto, todos los procesos de depuración que se daban en las plantas con tratamiento integral.

Se detectó la presencia de VHE en todas las balsas receptoras de purines de las 5 plantas estudiadas, lo que significa que los purines de las granjas de la zona son un importante foco de diseminación del VHE, tal y como indicaban algunos estudios realizados anteriormente en la misma área geográfica y que detectaron un 50% de prevalencia del VHE en las fosas de purines de 21 granjas analizadas.

En relación a las plantas con tratamiento integral, se observó una disminución significativa en la detección del ARN del VHE después de someter a la fracción líquida de los purines a un tratamiento anaeróbico-aeróbico. Particularmente, en las balsas de aerobiosis fue donde se apreció una mayor disminución en la detección del ARN del virus, sugiriendo este dato que la mayoría de las partículas víricas son inactivadas en esta fase del proceso, no detectándose el ARN del VHE en ninguna de las muestras líquidas posteriores a este punto del proceso global de compostaje que se realiza en estas plantas.

Por otra parte, en las muestras sólidas analizadas en las plantas con tratamiento integral, sólo se detectó el VHE en productos procedentes de la centrífuga de purines, que es la primera fase del procesado global de los mismos, no detectándose en productos sometidos a compostaje. Adicionalmente, se observó una menor detección del ARN del VHE en productos sólidos, en comparación con la fracción líquida procedente del mismo purín, lo que parece indicar que hay una menor supervivencia del VHE en matrices sólidas.

En las plantas sin tratamiento integral, se detectó el ARN del VHE en las balsas receptoras, pero no se detectó el ARN del VHE en ninguna de las muestras correspondientes a producto sometido a procesos de compostaje, tal y como ocurrió en las plantas con tratamiento integral. Este dato,

sugiere que el VHE no resiste las altas temperaturas, cercanas a los 65°C, que se alcanzan en este proceso.

Tampoco se identificó al VHE en ninguna de las muestras de producto final (compost), destinado a ser comercializado como fertilizante agrícola.

En cuanto al estudio filogenético de las muestras que resultaron positivas en este trabajo, se realizó una secuenciación de 17 cepas de VHE aisladas a partir de diferentes puntos de muestreo situados en las 5 plantas de compostaje. La secuenciación de los aislados para proceder posteriormente a su caracterización y clasificación filogenética, se basó en la comparación de un fragmento de 172 nucleótidos perteneciente a la región ORF2 del genoma del virus, que es una zona muy conservada.

Se observó que el total de los aislados pertenecían al genotipo 3 y en concreto al subtipo 3f. Un grupo importante de cepas, presentó una estrecha relación filogenética y elevada similitud nucleotídica con cepas porcinas aisladas en diferentes estudios realizados con anterioridad en la misma zona geográfica. Este dato confirma que el ganado porcino constituye un reservorio del VHE y actúa como foco de diseminación del mismo.

En otro grupo de muestras menos numeroso, se detectó hasta un 98,8% de homología nucleotídica con cepas de origen humano identificadas en pacientes de España y Francia. Estos datos refuerzan junto con otros estudios similares, la teoría de que el VHE es un agente zoonótico que afecta al ser humano y que constituye en la actualidad, un problema de salud pública emergente en países desarrollados como España.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren, que el proceso global de tratamiento llevado a cabo en las plantas de compostaje estudiadas, es un método eficaz en la eliminación del VHE de los purines, reduciéndose así la emisión de este patógeno al medio ambiente y disminuyendo los consecuentes riesgos de transmisión desde el ganado porcino al ser humano.

7.- SUMMARY

Hepatitis E virus (HEV), is a non-enveloped virus with a positive-sense, single-stranded RNA genome of 7.500 nucleotides in length.

The HEV is the causative agent of the hepatitis E, and self limiting clinical in humans. However, several studies reveal the possibility to progress into chronicity in patients with previous hepatic pathology. In severe cases, the disease can lead to fulminant hepatitis.

The overall mortality of hepatitis E, ranges between 0.4 and 4%, rising to 25% in the case of pregnant women, especially during the third trimester of pregnancy.

The main transmission route of HEV is oral-fecal, being responsible for most outbreaks in underdeveloped and developing countries described to date, mainly by drinking contaminated water. It is also significant the transmission through blood transfusions and through ingestion of raw or undercooked meat of certain animals, especially pigs.

However, the epidemiological pattern of hepatitis E virus is changing in recent years, appearing more and more cases of this disease in developed countries such as Spain. In this sense, swine plays an important role, since according to the latest research confirms that it acts as a reservoir of the disease and therefore as a potential source of infection for the human population.

Spain is the second largest producer of pork in the EU, only behind Germany, with a total of 25 million head of livestock census, of which over 1 million are in the area studied in this work.

The geographical area where this study was conducted, is located in the region of Els Ports, L'Alt and Baix Maestrat i La Plana Alta in the province of Castellón, in which 170 farms were surveyed, constituting an important core swine production. These farms generate a high amount of slurry, which is estimated at more than 1 million tons per year, becoming a concern for

Summary

health authorities and farmers, about the issues involved in its management.

Some of the problems caused by generated slurry include: the generation of odors, soil and groundwater pollution and the spread of pathogens, including the HEV. Therefore, it is necessary to establish treatment protocols that minimize the risks they may cause to public health and the environment. In this regard, it was decided by the authorities, the establishment in the province of Castellón of slurry treatment plants that would manage the surpluses that could not be applied directly to agricultural land as fertilizer. Additionally, the profits obtained from the sale of composted mineral fertilizer (final product), should cover the costs of plant operations.

The aim of this study was the detection by reverse transcription, followed by a real time polymerase chain reaction (RT-real time PCR), of HEV-RNA at different stages of slurry treatment in these plants, and thus confirm that this procedure was effective in eliminating the virus. Furthermore, we proceeded to the sequencing of isolates for characterization and phylogenetic classification. These sequences were compared with other porcine and human strains deposited in GenBank.

A total number of 189 samples were collected from 5 plants: 2 plants performing a total treatment of the slurry, including pre-separation of solid and liquid, followed by a separate treatment of each of the fractions and 3 plants without an initial solid-liquid separation of the slurry.

HEV was detected in all reception ponds of manure of the 5 plants studied, which means that slurry from farms in the area are an important source of spread of HEV, as some studies indicated above in the same geographical area and detected a 50% prevalence of HEV in the manure pits of 21 farms analyzed.

Regarding total treatment plants, a significant decrease was observed in the detection of HEV RNA after subjecting the liquid fraction of the slurry to an

anaerobic-aerobic phase. Particularly in aerobic ponds was revealed a greater reduction in the detection of HEV-RNA. This data suggests that the majority of the viral particles are inactivated in this stage, no HEV-RNA was detected in any of the liquid samples after this point in the overall process of composting performed in these plants.

Moreover, in solid samples analyzed in total treatment plants, HEV was detected only in the centrifuge products from slurry, which is the first phase of the overall processing, and was not detected in products subjected to composting. Additionally, the lower HEV-RNA detection in solid, compared to the liquid fraction from the same slurry, seems to indicate a lower survival of HEV in solid matrices.

In plants without a total treatment of slurries, HEV-RNA was detected in the reception ponds, but was not detected in any samples corresponding to composted product. This data suggests that the HEV cannot resist high temperatures close to 65°C, which are reached in this process.

HEV was not detected in any of the samples of the final product (compost), intended to be sold as agricultural fertilizer.

Regarding to the phylogenetic analysis, 17 HEV strains isolated from positive samples were sequenced. Their characterization and phylogenetic classification was based on comparison of a 172 nucleotide fragment belonging to the ORF2 region of the viral genome, which is a highly conserved zone.

All the isolates in our study belong to genotype 3 and subtype 3f. An important group of strains, showed a close phylogenetic relationship and high nucleotide similarity with porcine strains isolated in different studies previously performed in the same geographical area. This data confirms that swine is a reservoir of HEV and acts as a focus for dissemination of the same.

Summary

In another less numerous group of samples was detected up to 98.8% nucleotide homology with humans strains identified in patients from Spain and France. These data reinforce, along with other similar studies, the theory that HEV is a zoonotic agent that affects humans and is currently an emerging public health problem in developed countries such as Spain.

The results obtained in this work suggest that the overall treatment process conducted in composting plants studied, is an effective method to remove the HEV from slurries, thus reducing the emission of this pathogen into the environment and reducing the consequent risk of transmission from pigs to humans.

8.- BIBLIOGRAFÍA

Aangelidaki, I., Ahrin, B. K., Deng, H., and Schmidt, J. E. Anaerobic digestion of olive oil mill effluents together with swine manure in UASB reactors. *Water Sci.Technol.* 2002; 10(45): 213-218.

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* 2000a; 9235(356): 1081-1082.

Aggarwal, R. and Krawczynski, K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 2000b; 1(15): 9-20.

Aggarwal, R. Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res.* 2011; 1(161): 15-22.

Aggarwal, R. Diagnosis of hepatitis E. *Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 2012 2013 Jan;10(1):24-33. doi: 10.1038/nrgastro.2012.187. Epub 2012 Oct 2. Review.

Ahmad, I., Holla, R. P., and Jameel, S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2011; 1(161): 47-58.

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.

Akiyama, H. and Tsuruta, H. Nitrous oxide, nitric oxide, and nitrogen dioxide fluxes from soils after manure and urea application. *J.Environ.Qual.* 2003; 2(32): 423-431.

Alavian, S. M. A Look at the Past History of Hepatitis E in Haiti: Should it be a Warning Sign during the Current Crisis? *Hepat.Mon.* 2010; 1(10): 9-11.

Albinana-Giménez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F., and Girones, R. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ.Sci.Technol.* 2006; 23(40): 7416-7422.

Arankalle, V. A., Tsarev, S. A., Chadha, M. S., Alling, D. W., Emerson, S. U., Banerjee, K., and Purcell, R. H. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J.Infect.Dis.* 1995; 2(171): 447-450.

Arankalle, V. A., Chadha, M. S., Dama, B. M., Tsarev, S. A., Purcell, R. H., and Banerjee, K. Role of immune serum globulins in pregnant women during an epidemic of hepatitis E. *J.Viral Hepat.* 1998; 3(5): 199-204.

Arankalle, V. A. and Chobe, L. P. Hepatitis E virus: can it be transmitted parenterally? *Journal of Viral Hepatitis* 1999a; 2(6): 161-164.

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 (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.* 2000; 1(19): 24-28.

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.

Arankalle, V. A., Chobe, L. P., and Chadha, M. S. Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. *J.Viral Hepat.* 2006; 11(13): 742-745.

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., Djumalieva, 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., Girones, 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.

Barnaud, E., Rogee, S., Garry, P., Rose, N., and Pavio, N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl.Environ.Microbiol.* 2012; 15(78): 5153-5159.

Batts, W., Yun, S., Hedrick, R., and Winton, J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* 2011; 1-2(158): 116-123.

Begum, N., Polipalli, S. K., Husain, S. A., and Kar, P. Molecular analysis of swine hepatitis E virus from north India. *Indian J.Med.Res.* 2010; 132: 504-508.

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.

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

Berto, A., Mesquita, J. R., Hakze-van der Honing, R., Nascimento, M. S., and Van der Poel, W. H. Detection and characterization of hepatitis E virus

in domestic pigs of different ages in Portugal. *Zoonoses.Public Health* 2012b; 7(59): 477-481.

Bhatia, V., Singhal, A., Panda, S. K., and Acharya, S. K. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? *Hepatology* 2008; 5(48): 1577-1585.

Bi, S. L., Purdy, M. A., McCaustland, K. A., Margolis, H. S., and Bradley, D. W. The sequence of hepatitis E virus isolated directly from a single source during an outbreak in China. *Virus Res.* 1994; 1(33): 98.

Bihl, F. and Negro, F. Chronic hepatitis E in the immunosuppressed: a new source of trouble? *J.Hepatol.* 2009; 2(50): 435-437.

Bile, K., Isse, A., Mohamud, O., Allebeck, P., Nilsson, L., Norder, H., Mushahwar, I. K., and Magnius, L. O. Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1994; 4(51): 466-474.

Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Albinana-Gimenez, N., Motes Porta, C. M., Hundesa, Gonfa A., and Girones, Llop R. [Effects on health of water and food contamination by emergent human viruses]. *Rev.Esp.Salud Publica* 2005; 2(79): 253-269.

Boll, G. and Reimann, J. Oestrogen treatment depletes extrathymic T cells from intestinal lymphoid tissues. *Scand.J.Immunol.* 1996; 3(43): 345-350.

Boopathy, R. Anaerobic phenol degradation by microorganisms of swine manure. *Curr.Microbiol.* 1997; 1(35): 64-67.

Bouwknegt, M., Engel, B., Herremans, M. M., Widdowson, M. A., Worm, H. C., Koopmans, M. P., Frankena, K., de Roda Husman, A. M., de Jong, M. C., and Van der Poel, W. H. Bayesian estimation of hepatitis E virus

seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol.Infect.* 2008; 4(136): 567-576.

Bouwknegt, M., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W. H., Rutjes, S. A., and de Roda Husman, A. M. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J.Food Prot.* 2007; 12(70): 2889-2895.

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 (Pt 3): 731-738.

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.

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., Jardi, 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. [Acute hepatitis E in Spain]. *Med.Clin.(Barc.)* 1996; 9(107): 356-362.

Buti, M., Clemente-Casares, P., Jardi, 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.

Caprioli, A., Martelli, F., Ostanello, F., Di, Bartolo, I, Ruggeri, F. M., Del, Chiaro L., and Tolari, F. Detection of hepatitis E virus in Italian pig herds. *Vet.Rec.* 2007; 12(161): 422-423.

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.

Chandra, V., Kar-Roy, A., Kumari, S., Mayor, S., and Jameel, S. The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response. *J.Virol.* 2008a; 14(82): 7100-7110.

Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M., and Jameel, S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J.Biosci.* 2008b; 4(33): 451-464.

Chandra, V., Holla, P., Ghosh, D., Chakrabarti, D., Padigaru, M., and Jameel, S. The hepatitis E virus ORF3 protein regulates the expression of liver-specific genes by modulating localization of hepatocyte nuclear factor 4. *PLoS.One.* 2011; 7(6): e22412.

Chandra, N. S., Rai, R. R., and Malhotra, B. Phylogenetic analysis of hepatitis e virus in northwest India. *Hepat.Res.Treat.* 2012; 976434.

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.

Chatterjee, R., Tsarev, S., Pillot, J., Coursaget, P., Emerson, S. U., and Purcell, R. H. African strains of hepatitis E virus that are distinct from Asian strains. *J.Med.Virol.* 1997; 2(53): 139-144.

Chau, K. H., Dawson, G. J., Bile, K. M., Magnus, L. O., Sjogren, M. H., and Mushahwar, I. K. Detection of IgA class antibody to hepatitis E virus in serum samples from patients with hepatitis E virus infection. *J.Med.Virol.* 1993; 4(40): 334-338.

Chau, T. N., Lai, S. T., Tse, C., Ng, T. K., Ng, M. H., Lai, J. Y., and Yuen, H. Parenteral and sexual transmission are not risk factors for acute hepatitis E infection in Hong Kong. *Am.J.Gastroenterol.* 2001; 10(96): 3046-3047.

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, C. and Chae, C. Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J.Hepatol.* 2003; 6(38): 827-832.

Christensen, P. B., Engle, R. E., Jacobsen, S. E., Krarup, H. B., Georgsen, J., and Purcell, R. H. High prevalence of hepatitis E antibodies among Danish prisoners and drug users. *J.Med.Virol.* 2002; 1(66): 49-55.

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., Martín, M., Bofill-Mas, S., and Girones, R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg.Infect.Dis.* 2003; 4(9): 448-454.

Cole, D., Todd, L., and Wing, S. Concentrated swine feeding operations and public health: A review of occupational and community health effects. *Environmental Health Perspectives* 2000; 8(108): 685-699.

Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D., and Gerolami, R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J.Infect.Dis.* 2010; 6(202): 825-834.

Colson, P., Coze, C., Gallian, P., Henry, M., De Micco, P., and Tamalet, C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg.Infect.Dis.* 2007a; 4(13): 648-649.

Colson, P., Kaba, M., Bernit, E., Motte, A., and Tamalet, C. Hepatitis E associated with surgical training on pigs. *Lancet* 2007b; 9591(370): 935.

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.

Costantini, V. P., Azevedo, A. C., Li, X., Williams, M. C., Michel, F. C., Jr., and Saif, L. J. Effects of different animal waste treatment technologies on

detection and viability of porcine enteric viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 16(73): 5284-5291.

Crossan, C., Baker, P. J., Craft, J., Takeuchi, Y., Dalton, H. R., and Scobie, L. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 12(18): 2085-2087.

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.

Dalton, H. R., Thuraiajah, P. H., Fellows, H. J., Hussaini, H. S., Mitchell, J., Bendall, R., Banks, M., Ijaz, S., Teo, C. G., and Levine, D. F. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J. Viral Hepat.* 2007; 5(14): 304-309.

Dawson, G. J., Mushahwar, I. K., Chau, K. H., and Gitnick, G. L. Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveller to Pakistan. *Lancet* 1992; 8816(340): 426-427.

de la Caridad Montalvo Villalba, Owot, J. C., Correia, B., Corredor, M. B., Flaquet, P. P., Frometa, S. S., Wong, M. S., and Rodríguez Lay, Lde L.

Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Cuba. *Infect.Genet.Evol.* 2013(14): 335-339.

Dell'Amico, M. C., Cavallo, A., Gonzales, J. L., Bonelli, S. I., Valda, Y., Pieri, A., Segund, H., Ibanez, R., Mantella, A., Bartalesi, F., Tolari, F., and Bartoloni, A. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and Swine, Bolivia. *Emerg.Infect.Dis.* 2011; 8(17): 1488-1490.

Di, Bartolo, I, Diez-Valcarce, M., Vasickova, P., Kralik, P., Hernandez, M., Angeloni, G., Ostanello, F., Bouwknecht, M., Rodríguez-Lazaro, D., Pavlik, I., and Ruggeri, F. M. Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg.Infect.Dis.* 2012; 8(18): 1282-1289.

Dienstag, J. L. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology* 1983; 2(85): 439-462.

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.

Drexler, J. F., Seelen, A., Corman, V. M., Fumie, Tateno A., Cottontail, V., Melim, Zerbinati R., Gloza-Rausch, F., Klose, S. M., Adu-Sarkodie, Y., Oppong, S. K., Kalko, E. K., Osterman, A., Rasche, A., Adam, A., Muller, M. A., Ulrich, R. G., Leroy, E. M., Lukashev, A. N., and Drosten, C. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J.Virol.* 2012; 17(86): 9134-9147.

Easterbrook, J. D., Kaplan, J. B., Vanasco, N. B., Reeves, W. K., Purcell, R. H., Kosoy, M. Y., Glass, G. E., Watson, J., and Klein, S. L. A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiol.Infect.* 2007; 7(135): 1192-1199.

Elving, J., Emmoth, E., Albihn, A., Vinneras, B., and Ottoson, J. Composting for avian influenza virus elimination. *Appl.Environ.Microbiol.* 2012; 9(78): 3280-3285.

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., Arankalle, V. A., and Purcell, R. H. Thermal stability of hepatitis E virus. *J.Infect.Dis.* 2005; 5(192): 930-933.

Enouf, V., Dos, Reis G., Guthmann, J. P., Guerin, P. J., Caron, M., Marechal, V., and Nicand, E. Validation of single real-time TaqMan PCR assay for the detection and quantitation of four major genotypes of hepatitis E virus in clinical specimens. *J.Med.Virol.* 2006; 8(78): 1076-1082.

Epelboin, L., Nicand, E., Roussin, C., Lernout, T., Pettinelli, M. E., Tesse, S., Ali, R., and Aubry, P. A sporadic case of genotype 3f acute hepatitis E in Mayotte. *Med.Mal Infect.* 2011; 7(41): 392-394.

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.

Feachem, R.G., Bradley, D.J., Garelick, H., and Mara, D.D. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. John Wiley & Sons. Chichester. 1983.

Feagins, A. R., Opriessnig, T., Guenette, D. K., Halbur, P. G., and Meng, X. J. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J.Gen.Virol.* 2007; Pt 3(88): 912-917.

Fernández-Barredo, S., Galiana, C., García, A., Gómez-Munoz, M. T., Vega, S., Rodríguez-Iglesias, M. A., and Pérez-Gracia, M. T. Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Can.J.Vet.Res.* 2007; 3(71): 236-240.

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.

Fletcher, J. A traveller returning from Nepal with hepatitis E. *Med.J.Aust.* 1993; 8(159): 563.

Fongaro, G., Nascimento, M. A., Viancelli, A., Tonetta, D., Petrucio, M. M., and Barardi, C. R. Surveillance of human viral contamination and

physicochemical profiles in a surface water lagoon. *Water Sci.Technol.* 2012; 12(66): 2682-2687.

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.

Galiana, C., Fernández-Barredo, S., and Pérez-Gracia, M. T. [Prevalence of hepatitis E virus (HEV) and risk factors in pig workers and blood donors]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2010; 9(28): 602-607.

Garbuglia, A. R., Scognamiglio, P., Petrosillo, N., Mastroianni, C. M., Sordillo, P., Gentile, D., La, Scala P., Girardi, E., and Capobianchi, M. R. Hepatitis E virus genotype 4 outbreak, Italy, 2011. *Emerg.Infect.Dis.* 2013; 1(19): 110-114.

Gardinali, N. R., Barry, A. F., da Silva, P. F., de, Souza C., Alfieri, A. F., and Alfieri, A. A. Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds. *Res.Vet.Sci.* 2012a; 3(93): 1515-1519.

Gardinali, N. R., Barry, A. F., Otonel, R. A., Alfieri, A. F., and Alfieri, A. A. Hepatitis E virus in liver and bile samples from slaughtered pigs of Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 2012b; 7(107): 935-939.

Garkavenko, O., Obriadina, A., Meng, J., Anderson, D. A., Benard, H. J., Schroeder, B. A., Khudyakov, Y. E., Fields, H. A., and Croxson, M. C. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J.Med.Virol.* 2001; 3(65): 525-529.

Gonzalez Tallon, A. I., Moreira, Vicente, V, and Mateos Lindemann, M. L. [Chronic hepatitis E]. *Med.Clin.(Barc.)* 2012; 2(138): 69-72.

Gouvea, V., Snellings, N., Cohen, S. J., Warren, R. L., Myint, K. S., Shrestha, M. P., Vaughn, D. W., Hoke, C. H., Jr., and Innis, B. L. Hepatitis E virus in Nepal: similarities with the Burmese and Indian variants. *Virus Res.* 1997; 1(52): 87-96.

Gouvea, V., Snellings, N., Popek, M. J., Longer, C. F., and Innis, B. L. Hepatitis E virus: complete genome sequence and phylogenetic analysis of a Nepali isolate. *Virus Res.* 1998; 1(57): 21-26.

Grandadam, M., Tebbal, S., Caron, M., Siriwardana, M., Larouze, B., Koeck, J. L., Buisson, Y., Enouf, V., and Nicand, E. Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J.Gen.Virol.* 2004; Pt 11(85): 3189-3194.

Grimm, A. C. and Fout, G. S. Development of a molecular method to identify hepatitis E virus in water. *Journal of Virological Methods* 2002; 1-2(101): 175-188.

Guardabassi, L, Dalsgaard, A and Sobsey, M. Occurrence and survival of viruses in composted human faeces. Miljøministeriet, København. Sustainable urban renewal and wastewater treatment, 2003. No. 32

Haagsma, E. B., Van den Berg, A. P., Porte, R. J., Benne, C. A., Vennema, H., Reimerink, J. H., and Koopmans, M. P. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2008; 4(14): 547-553.

Haim-Boukobza, S., Ferey, M. P., Vetillard, A. L., Jebblaoui, A., Pelissier, E., Pelletier, G., Teillet, L., and Roque-Afonso, A. M. Transfusion-transmitted hepatitis E in a misleading context of autoimmunity and drug-induced toxicity. *J.Hepatol.* 2012; 6(57): 1374-1378.

Hakze-van der Honing RW, van, Coillie E., Antonis, A. F., and Van der Poel, W. H. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS.One.* 2011; 8(6): e22673-

Halac, U., Beland, K., Lapierre, P., Patey, N., Ward, P., Brassard, J., Houde, A., and Alvarez, F. Chronic hepatitis E infection in children with liver transplantation. *Gut* 2012; 4(61): 597-603.

Han, T. Human chorionic gonadotropin. Its inhibitory effect on cell-mediated immunity in vivo and in vitro. *Immunology* 1975; 3(29): 509-515.

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.

Hau, C. H., Hien, T. T., Tien, N. T., Khiem, H. B., Sac, P. K., Nhung, V. T., Larasati, R. P., Laras, K., Putri, M. P., Doss, R., Hyams, K. C., and Corwin, A. L. Prevalence of enteric hepatitis A and E viruses in the Mekong River delta region of Vietnam. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1999; 2(60): 277-280.

Hazam, R. K., Singla, R., Kishore, J., Singh, S., Gupta, R. K., and Kar, P. Surveillance of hepatitis E virus in sewage and drinking water in a resettlement colony of Delhi: what has been the experience? *Arch.Virol.* 2010; 8(155): 1227-1233.

He, J., Binn, L. N., Tsarev, S. A., Hayes, C. G., Freaan, J. A., Isaacson, M., and Innis, B. L. Molecular characterization of a hepatitis E virus isolate from Namibia. *J.Biomed.Sci.* 2000; 4(7): 334-338.

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.

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.* 2006; 3(44): 1208-

Herremans, M., Bakker, J., Duizer, E., Vennema, H., and Koopmans, M. P. Use of serological assays for diagnosis of hepatitis E virus genotype 1 and 3 infections in a setting of low endemicity. *Clin.Vaccine Immunol.* 2007; 5(14): 562-568.

Hijikata, M., Hayashi, S., Trinh, N. T., Ha, le D., Ohara, H., Shimizu, Y. K., Keicho, N., and Yoshikura, H. Genotyping of hepatitis E virus from Vietnam. *Intervirology* 2002; 2(45): 101-104.

Hill, D. D., Owens, W. E., and Tchounwou, P. B. Prevalence of selected bacterial infections associated with the use of animal waste in Louisiana. *Int.J.Enviroin.Res.Public Health* 2005; 1(2): 84-93.

Hirotan, H., Suzuki, M., and Takahashi, e. Destruction of fecal coliphages during the composting process of porcine feces. *Soil Sci. Plant Nutr.* 1988; 34: 467-469.

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* 1992a; 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.

Huang, R. T., Li, D. R., Wei, J., Huang, X. R., Yuan, X. T., and Tian, X. Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China. *J.Gen.Virol.* 1992: 73 (Pt 5): 1143-1148.

Hunt, J. S. Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J.Reprod.Immunol.* 1989; 1(16): 1-17.

Hurst, C. J., Gerba, C. P., and Cech, I. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Appl.Environ.Microbiol.* 1980; 6(40): 1067-1079.

Hussaini, S. H., Skidmore, S. J., Richardson, P., Sherratt, L. M., Cooper, B. T., and O'Grady, J. G. Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J.Viral Hepat.* 1997; 1(4): 51-54.

Hutchison, M. L., Walters, L. D., Avery, S. M., Munro, F., and Moore, A. Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. *Appl.Environ.Microbiol.* 2005; 3(71): 1231-1236.

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.

Jameel, S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert.Rev.Mol.Med.* 1999: 1-16.

Jameel, S., Zafrullah, M., Chawla, Y. K., and Dilawari, J. B. Reevaluation of a North India isolate of hepatitis E virus based on the full-length genomic sequence obtained following long RT-PCR. *Virus Res.* 2002; 1-2(86): 53-58.

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.

Jindal, A., Kocherginskaya, S., Mehboob, A., Robert, M., Mackie, R. I., Raskin, L., and Zilles, J. L. Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems. *Appl.Environ.Microbiol.* 2006; 12(72): 7813-7820.

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.

Juris, P., Plachy, P., Dubinsky, P., Venglovsky, J., and Toth, F. [The effect of experimental aerobic stabilization of swine slurry on survival of *Salmonella typhimurium* and *Ascaris suum*]. *Vet.Med.(Praha)* 1993; 9(38): 553-558.

Kaba, M., Davoust, B., Cabre, O., and Colson, P. Hepatitis E virus genotype 3f in pigs in New Caledonia. *Aust.Vet.J.* 2011; 12(89): 496-499.

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.

Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J. M., Ouezzani, L., Peron, J. M., Guitard, J., Cointault, O., Esposito, L., Abravanel, F., Danjoux, M., Durand, D., Vinel, J. P., Izopet, J., and Rostaing, L. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N.Engl.J.Med.* 2008; 8(358): 811-817.

Kamar, N., Abravanel, F., Garrouste, C., Cardeau-Desangles, I., Mansuy, J. M., Weclawiak, H., Izopet, J., and Rostaing, L. Three-month pegylated interferon-alpha-2a therapy for chronic hepatitis E virus infection in a haemodialysis patient. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2010a; 8(25): 2792-2795.

Kamar, N., Abravanel, F., Selves, J., Garrouste, C., Esposito, L., Lavayssiere, L., Cointault, O., Ribes, D., Cardeau, I., Nogier, M. B., Mansuy, J. M., Muscari, F., Peron, J. M., Izopet, J., and Rostaing, L. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation* 2010b; 3(89): 353-360.

Kamar, N., Izopet, J., Cintas, P., Garrouste, C., Uro-Coste, E., Cointault, O., and Rostaing, L. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am.J.Transplant.* 2010c; 5(10): 1321-1324.

Kamar, N., Rostaing, L., Abravanel, F., Garrouste, C., Lhomme, S., Esposito, L., Basse, G., Cointault, O., Ribes, D., Nogier, M. B., Alric, L., Peron, J. M., and Izopet, J. Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* 2010d; 5(139): 1612-1618.

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

Karetnyi, IuV, Dzhumaliev, D. I., Usmanov, R. K., Titova, I. P., Litvak, IaI, 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., 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., 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., 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.

Keawcharoen, J., Thongmee, T., Panyathong, R., Joiphaeng, P., Tuanthap, S., Oraveerakul, K., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. Hepatitis E virus genotype 3f sequences from pigs in Thailand, 2011-2012. *Virus Genes* 2013; 2(46): 369-370.

Kheradpezhoh, M., Taremi, M., Gachkar, L., Aghabozorgi, S., and Khoshbaten, M. Presence and significance of transfusion-transmitted virus infection in Iranian patients on maintenance hemodialysis. *J.Microbiol.Immunol.Infect.* 2007; 2(40): 106-111.

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.

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., Kamili, S., and Jameel, S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet* 1995; 8956(345): 1025-1026.

Khuroo, M. S. Viral hepatitis in international travellers: risks and prevention. *Int.J.Antimicrob.Agents* 2003a; 2(21): 143-152.

Khuroo, M. S. and Kamili, S. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J.Viral Hepat.* 2003b; 1(10): 61-69.

Khuroo, M. S., Kamili, S., and Khuroo, M. S. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J.Viral Hepat.* 2009; 7(16): 519-523.

Kikuchi, K., Yoshida, T., Kimata, N., Sato, C., and Akiba, T. Prevalence of hepatitis E virus infection in regular hemodialysis patients. *Ther.Apher.Dial.* 2006; 2(10): 193-197.

Kmush, B., Wierzba, T., Krain, L., Nelson, K., and Labrique, A. B. Epidemiology of hepatitis e in low- and middle-income countries of Asia and Africa. *Semin.Liver Dis.* 2013; 1(33): 15-29.

Koizumi, Y., Isoda, N., Sato, Y., Iwaki, T., Ono, K., Ido, K., Sugano, K., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis e virus while traveling in Vietnam. *J.Clin.Microbiol.* 2004; 8(42): 3883-3885.

Kotzerke, A., Sharma, S., Schauss, K., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B. M., and Schloter, M. Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. *Environ.Pollut.* 2007; 253: 315-322.

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.

Kulkarni, M. A. and Arankalle, V. A. The detection and characterization of hepatitis E virus in pig livers from retail markets of India. *J.Med.Virol.* 2008; 8(80): 1387-1390.

Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J. B., and Murthy, N. S. Hepatitis E in pregnancy. *Int.J.Gynaecol.Obstet.* 2004; 3(85): 240-244.

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.

La, Rosa G., Muscillo, M., Vennarucci, V. S., Garbuglia, A. R., La, Scala P., and Capobianchi, M. R. Hepatitis E virus in Italy: molecular analysis of

travel-related and autochthonous cases. *J.Gen.Virol.* 2011; Pt 7(92): 1617-1626.

Laridi, R., Auclair, J. C., and Benmoussa, H. Laboratory and pilot-scale phosphate and ammonium removal by controlled struvite precipitation following coagulation and flocculation of swine wastewater. *Environ.Technol.* 2005; 5(26): 525-536.

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

Lee, C. C., Shih, Y. L., Laio, C. S., Lin, S. M., Huang, M. M., Chen, C. J., Chen, C. P., Chang, C. L., Chen, L. R., Tschen, S. Y., and Wang, C. H. Prevalence of Antibody to Hepatitis E Virus among Haemodialysis Patients in Taiwan: Possible Infection by Blood Transfusion. *Nephron Clin.Pract.* 2005; 4(99): c122-c127.

Li-Xian, Y., Guo-Liang, L., Shi-Hua, T., Gavin, S., and Zhao-Huan, H. Salinity of animal manure and potential risk of secondary soil salinization through successive manure application. *Sci.Total Environ.* 2007; 1-3(383): 106-114.

Lim, T. T., Heber, A. J., Ni, J. Q., Sutton, A. L., and Shao, P. Odor and gas release from anaerobic treatment lagoons for swine manure. *J.Environ.Qual.* 2003; 2(32): 406-416.

Lindemann, M. L., Gabilondo, G., Romero, B., de la Maza, O. M., and Pérez-Gracia, M. T. Low prevalence of hepatitis E infection among pregnant women in Madrid, Spain. *J.Med.Virol.* 2010; 10(82): 1666-1668.

Liu, Z., Chi, B., Takahashi, K., and Mishiro, S. A genotype IV hepatitis E virus strain that may be indigenous to Changchun, China. *Intervirology* 2003; 4(46): 252-256.

Lockwood, G. L., Fernández-Barredo, S., Bendall, R., Banks, M., Ijaz, S., and Dalton, H. R. Hepatitis E autochthonous infection in chronic liver disease. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 2008; 8(20): 800-803.

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 Hagedom, C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev.Med.Virol.* 2005; 16: 5-36.

Lu, Y. H., Qian, H. Z., Qin, X., Jiang, Q. W., and Zheng, Y. J. Subtypes of genotype 3 hepatitis E virus in pigs. *Vet.J.* 2013 197(2):509-11.

Luciano, L., Martel, C., De Pina, J. J., Tesse, S., Merens, A., Roque, A. M., Guisset, M., Brardjanian, S., and Coton, T. Genotype 3f predominance in symptomatic acute autochthonous hepatitis E: a short case series in south-eastern France. *Clin.Res.Hepatol.Gastroenterol.* 2012; 3(36): e54-e55.

Lund, Ebba and Nissen, Birte. The survival of enteroviruses in aerated and unaerated cattle and pig slurry. *Agricultural Wastes* 1983; 4(7): 221-233.

Ma, H., Geng, Y., Li, Z., Harrison, T. J., Huang, W., Zhao, C., and Wang, Y. Analysis of the complete genome sequences of one swine and two human hepatitis E virus genotype 4 strains isolated in Beijing, China. *Infect.Genet.Evol.* 2013; 18:42-7.

Maila, H. T., Bowyer, S. M., and Swanepoel, R. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *J.Gen.Virol.* 2004; Pt 1(85): 89-95.

Malcolm, P., Dalton, H., Hussaini, S. H., and Mathew, J. The histology of autochthonous hepatitis E virus infection. *Journal of Pathology* 2005; 207: 39-9.

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.

Martelli, F., Caprioli, A., Zengarini, M., Marata, A., Fiegna, C., Di, Bartolo, I, Ruggeri, F. M., Delogu, M., and Ostanello, F. Detection of Hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol.* 2008 Jan 1;126(1-3):74-81.

Marx, R., Kohl, M., and Klein, J. [The refining of liquid swine manure as a substrate for biotechnologic transformation processes]. *Zentralbl.Mikrobiol.* 1990; 4(145): 269-275.

Masse, D. I., Masse, L., Xia, Y., and Gilbert, Y. Potential of low-temperature anaerobic digestion to address current environmental concerns on swine production. *J.Anim Sci.* 2010; 13 Suppl(88): E112-E120.

Mast, E. E. and Krawczynski, K. Hepatitis E: an overview. *Annu.Rev.Med.* 1996(47): 257-266.

Masuda, J., Yano, K., Tamada, Y., Takii, Y., Ito, M., Omagari, K., and Kohno, S. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *HepatoRes.* 2005a; 3(31): 178-183.

Mateos Lindemann, M. L., Molina, A., Patier, J. L., and Moreira, V. [Sporadic hepatitis E in Spain: study of 9 autochthonous and 3 imported cases]. *Med.Clin.(Barc.)* 2005; 3(125): 118-119.

Mateos Lindemann, M. L., Morales, J. G., Fernández-Barredo, S., Dominguez, M. R., García, de la Hoz, Halfon, P., and Pérez Gracia, M. T. Fulminant hepatitis E in a woman taking oral contraceptive medication. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2010; 1(82): 12-15.

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.

McQuiston, J. H., Garber, L. P., Porter-Spalding, B. A., Hahn, J. W., Pierson, F. W., Wainwright, S. H., Senne, D. A., Brignole, T. J., Akey, B. L., and Holt, T. J. Evaluation of risk factors for the spread of low pathogenicity H7N2 avian influenza virus among commercial poultry farms. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 2005; 5(226): 767-772.

Meeusen, E. N., Bischof, R. J., and Lee, C. S. Comparative T-cell responses during pregnancy in large animals and humans. *Am.J.Reprod.Immunol.* 2001; 2(46): 169-179.

Melenhorst, W. B., Gu, Y. L., Jaspers, W. J., and Verhage, A. H. Locally acquired hepatitis E in the Netherlands: associated with the consumption of raw pig meat? *Scand.J.Infect.Dis.* 2007; 5(39): 454-456.

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, X. 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.

Meng, X. J. Recent advances in Hepatitis E virus. *J.Viral Hepat.* 2010; 3(17): 153-161.

Meng, X. J. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* 2011; 1(161): 23-30.

Meng, X.J., Cao, D. Molecular Biology and replication of hepatitis E virus. *Emerging Microbes & Infections* (2012) **1**, e17; doi:10.1038/emi.2012.7 Published online 22 August 2012a.

Meng, X.J., Anderson, d.a., Arankalle, V.A., Emerson, S.U., Harrison, T.J., Jameel, S., Okamoto, H. Hepeviridae. In: King AMQ, Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. eds *Virus Taxonomy 9th Report of the ICTV*. London: Elsevier Academic Press; 2012b: 1021-1028.

Meng, X. J. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin.Liver Dis.* 2013; 1(33): 41-49.

Meschke, J. S. and Sobsey, M. D. Comparative reduction of Norwalk virus, poliovirus type 1, F+ RNA coliphage MS2 and *Escherichia coli* in miniature soil columns. *Water Sci.Technol.* 2003; 3(47): 85-90.

Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C., and Arbiza, J. Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res.* 2013; 2(173): 364-370.

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.

Mochizuki, M., Ouchi, A., Kawakami, K., Ishida, T., Li, T. C., Takeda, N., Ikeda, H., and Tsunemitsu, H. Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet.Rec.* 2006; 25(159): 853-854.

Moin, S. M., Panteva, M., and Jameel, S. The hepatitis E virus Orf3 protein protects cells from mitochondrial depolarization and death. *J.Biol.Chem.* 2007; 29(282): 21124-21133.

Mori, Y. and Matsuura, Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.* 2011; 1(161): 59-64.

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. *HepatoI.Res.* 2006 Mar;34(3):137-40.

Nakano, T., Okano, H., Kobayashi, M., Ito, K., Ohmori, S., Nomura, T., Kato, H., Ayada, M., Nakano, Y., Akachi, S., Sugimoto, K., Fujita, N., Shiraki, K., Takei, Y., Takahashi, M., and Okamoto, H. Molecular epidemiology and genetic history of European-type genotype 3 hepatitis E virus indigenized in the central region of Japan. *Infect.Genet.Evol.* 2012a; 7(12): 1524-1534.

Nakano, T., Takahashi, K., Pybus, O. G., Hashimoto, N., Kato, H., Okano, H., Kobayashi, M., Fujita, N., Shiraki, K., Takei, Y., Ayada, M., Arai, M., Okamoto, H., and Mishiro, S. New findings regarding the epidemic history and population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 hepatitis E virus inferred by molecular evolution. *Liver Int.* 2012b; 4(32): 675-688.

Nanda, S. K., Ansari, I. H., Acharya, S. K., Jameel, S., and Panda, S. K. Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 1995; 1(108): 225-230.

Nidaira, M., Takahashi, K., Ogura, G., Taira, K., Okano, S., Kudaka, J., Itokazu, K., Mishiro, S., and Nakamura, M. Detection and phylogenetic analysis of hepatitis E viruses from mongooses in Okinawa, Japan. *J.Vet.Med.Sci.* 2012; 12(74): 1665-1668.

Ohnishi, S., Kang, J. H., Maekubo, H., Arakawa, T., Karino, Y., Toyota, J., Takahashi, K., and Mishiro, S. Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *HepatoI.Res.* 2006; 36(4):301-7.

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.Comm.* 2001; 5(289): 929-936.

Okano, H., Nakano, T., Sugimoto, K., Takahashi, K., Nagashima, S., Takahashi, M., Arai, M., and Okamoto, H. A high genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan. *HepatoI.Res.* 2013 May 2. doi: 10.1111/hepr.12155. [Epub ahead of print].

Orru, G., Masia, G., Orru, G., Romano, L., Piras, V., and Coppola, R. C. Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J.Virol.Methods* 2004; 2(118): 77-82.

Pal, R., Aggarwal, R., Naik, S. R., Das, V., Das, S., and Naik, S. Immunological alterations in pregnant women with acute hepatitis E. *J.Gastroenterol.HepatoI.* 2005; 7(20): 1094-1101.

Paluszak, Z., Lipowski, A., and Ligocka, A. Survival rate of Suid herpesvirus (SuHV-1, Aujeszky's disease virus, ADV) in composted sewage sludge. *Pol.J.Vet.Sci.* 2012; 1(15): 51-54.

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. *Journal of Virology* 2000; 5(74): 2430-2437.

Panda, S. K., Nanda, S. K., Zafrullah, M., Ansari, I. H., Ozdener, M. H., and Jameel, S. An Indian strain of hepatitis E virus (HEV): cloning, sequence, and expression of structural region and antibody responses in sera from individuals from an area of high-level HEV endemicity. *J.Clin.Microbiol.* 1995; 10(33): 2653-2659.

Parashar, D., Khalkar, P., and Arankalle, V. A. Survival of hepatitis A and E viruses in soil samples. *Clin.Microbiol.Infect.* 2011; 11(17): E1-E4.

Park, S. B. Hepatitis E vaccine debuts. *Nature* 2012; 7422(491): 21-22.

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

Pei, Y. and Yoo, D. Genetic characterization and sequence heterogeneity of a canadian isolate of Swine hepatitis E virus. *J.Clin.Microbiol.* 2002; 11(40): 4021-4029.

Pérez-Gracia, M. T. and Rodríguez-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.

Pérez-Gracia, M. T., Mateos, M. L., Galiana, C., Fernández-Barredo, S., García, A., Gómez, M. T., and Moreira, V. Autochthonous hepatitis E

infection in a slaughterhouse worker. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2007; 5(77): 893-896.

Pérez-Gracia, M. T. and Mateos-Lindemann, M. L. [Hepatitis E. Current perspectives]. *Med.Clin.(Barc.)* 2012; 9(139): 404-411.

Perón, J. M., Bureau, C., Poirson, H., Mansuy, J. M., Alric, L., Selves, J., Dupuis, E., Izopet, J., and Vinel, J. P. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J.Viral Hepat.* 2007a; 5(14): 298-303.

Pesaro, F., Sorg, I., and Metzler, A. In situ inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl.Environ.Microbiol.* 1995; 1(61): 92-97.

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. *Journal of Hepatology* 2000; 5(33): 826-833.

Pischke, S., Heim, A., Bremer, B., Raupach, R., Horn-Wichmann, R., Ganzenmueller, T., Klose, B., Goudeva, L., Wagner, F., Oehme, A., Manns, M. P., and Wedemeyer, H. Hepatitis E: an emerging infectious disease in Germany? *Z.Gastroenterol.* 2011; 9(49): 1255-1257.

Plachy, P. and Juris, P. [Survival of *Ascaris suum* eggs in sewage treatment plant sludge]. *Vet.Med.(Praha)* 1995; 1(40): 23-27.

Prusty, B. K., Hedau, S., Singh, A., Kar, P., and Das, B. C. Selective suppression of NF-kBp65 in hepatitis virus-infected pregnant women manifesting severe liver damage and high mortality. *Mol.Med.* 2007; 9-10(13): 518-526.

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.

Purcell, R. H. and Emerson, S. U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J.Hepatol.* 2008; 3(48): 494-503.

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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1997; 2(57): 151-157.

Reinhardt, G., Ibarra, H., Riedemann, S., and Vega, I. Swine hepatitis E preliminary serological study in Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 2003; 2(35): 233-236.

Renou, C., Pariente, A., Cadranel, J. F., Nicand, E., and Pavio, N. Clinically silent forms may partly explain the rarity of acute cases of autochthonous genotype 3c hepatitis E infection in France. *J.Clin.Virol.* 2011; 2(51): 139-141.

Reuter, G., Fodor, D., Katai, A., and Szucs, G. Identification of a novel variant of human hepatitis E virus in Hungary. *J.Clin.Virol.* 2006; 2(36): 100-102.

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.

Rijhsinghani, A. G., Thompson, K., Bhatia, S. K., and Waldschmidt, T. J. Estrogen blocks early T cell development in the thymus. *Am.J.Reprod.Immunol.* 1996; 5(36): 269-277.

Rodríguez-Frias, F., Jardi, R., and Buti, M. [Hepatitis E: molecular virology, epidemiology and pathogenesis]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2012; 10(30): 624-634.

Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., Madec, F., and Pavio, N. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 2011; 5(34): 419-427.

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.* 2007; 7(3):368-73.

Sadler, G. J., Mells, G. F., Shah, N. H., Chesner, I. M., and Walt, R. P. UK acquired hepatitis E--An emerging problem? *J.Med.Virol.* 2006; 4(78): 473-475.

Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H. L., Walsh, A., Ramsay, M., and Morgan, D. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg.Infect.Dis.* 2009; 11(15): 1738-1744.

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.

Sakar, S., Yetilmezsoy, K., and Kocak, E. Anaerobic digestion technology in poultry and livestock waste treatment--a literature review. *Waste Manag.Res.* 2009; 1(27): 3-18.

Sanchez, M. A., Moreno, M. E., García, Avello A., and Mateos, M. L. [Two new cases of autochthonous hepatitis E]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2002; 3(20): 138-

Sato, Y., Sato, H., Naka, K., Furuya, S., Tsukiji, H., Kitagawa, K., Sonoda, Y., Usui, T., Sakamoto, H., Yoshino, S., Shimizu, Y., Takahashi, M., Nagashima, S., Jirintai, Nishizawa, T., and Okamoto, H. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch.Virol.* 2011; 8(156): 1345-1358.

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.* 199879 (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.

Senne, D. A., Panigrahy, B., and Morgan, R. L. Effect of composting poultry carcasses on survival of exotic avian viruses: highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus and adenovirus of egg drop syndrome-76. *Avian Dis.* 1994; 4(38): 733-737.

Shrestha, M. P., Scott, R. M., Joshi, D. M., Mammen, M. P., Jr., Thapa, G. B., Thapa, N., Myint, K. S., Fourneau, M., Kuschner, R. A., Shrestha, S. K., David, M. P., Seriwatana, J., Vaughn, D. W., Safary, A., Endy, T. P., and Innis, B. L. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N.Engl.J.Med.* 2007; 9(356): 895-903.

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.

Shrestha, S. M., Shrestha, S., Tsuda, F., Nishizawa, T., Takahashi, M., Gotanda, Y., and Okamoto, H. Genetic changes in hepatitis E virus of subtype 1a in patients with sporadic acute hepatitis E in Kathmandu, Nepal, from 1997 to 2002. *J.Gen.Virol.* 2004; Pt 1(85): 97-104.

Shuman, S. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991; 22(88): 10104-10108.

Siebenlist, U., Franzoso, G., and Brown, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu.Rev.Cell Biol.* 1994; 10: 405-455.

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.

Smith, J. L. A review of hepatitis E virus. *Journal of Food Protection* 2001; 4(64): 572-586.

Sobsey, M. D., Dean, C. H., Knuckles, M. E., and Wagner, R. A. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Appl.Environ.Microbiol.* 1980; 1(40): 92-101.

Sobsey, Mark D., Hall, Richard M., and Hazard, Ruth L. Comparative reductions of hepatitis A virus, enteroviruses and coliphage MS2 in miniature soil columns. *Water Science and Technology* 1995; 56 (31): 203-209.

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.

Strauch, D. German experiences with low and high technology methods for disinfection of municipal sewage sludges. *Water Sci. Technol.* 1983; 15: 25-35.

Strauch, D., Hammel, HE., and Philipp W. Investigations on the hygienic effect of single stage and two stage aerobic thermophilic stabilisation of liquid raw manure. Elsevier Applied Science Publ., pp.48-63. 1985

Styrt, B. and Sugarman, B. Estrogens and infection. Rev.Infect.Dis. 1991; 6(13): 1139-1150.

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.

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.* 2005; 1(43): 49-56.

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.

Tamada, Y., Yano, K., Yatsushashi, H., Inoue, O., Mawatari, F., and Ishibashi, H. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J.Hepatol.* 2004a; 5(40): 869-870.

Tapchaisri, P., Wangroongsarb, P., Panbangred, W., Kalambaheti, T., Chongsa-nguan, M., Srimanote, P., Kurazono, H., Hayashi, H., and Chaicumpa, W. Detection of Salmonella contamination in food samples by dot-ELISA, DNA amplification and bacterial culture. *Asian Pac.J.Allergy Immunol.* 1999; 1(17): 41-51.

Tarrago, D., Lopez-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., Ohara, S., Inoue, Y., Miki, M., Yamatani, T., Yamabe, H., Mishiro, S., and Kinoshita, Y. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J.Med.Virol.* 2004; 1(74): 67-70.

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.

Ticehurst, J., Popkin, T. J., Bryan, J. P., Innis, B. L., Duncan, J. F., Ahmed, A., Iqbal, M., Malik, I., Kapikian, A. Z., Legters, L. J., and . Association of hepatitis E virus with an outbreak of hepatitis in Pakistan: serologic responses and pattern of virus excretion. *J.Med.Virol.* 1992; 2(36): 84-92.

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.

Tolari, F., Chiaro, L. D., Card, R., Mazzei, M., Bandecchi, P., and Banks, M. Phylogenetic study of viral isolates of Swine and human hepatitis e virus. *Vet.Res.Commun.* 2006; 30 (1): 273-276.

Tomar, B. S. Hepatitis E in India. *Zhonghua Min Guo.Xiao.Er.Ke.Yi.Xue.Hui.Za Zhi.* 1998; 3(39): 150-156.

Toole, M. J., Claridge, F., Anderson, D. A., Zhuang, H., Morgan, C., Otto, B., and Stewart, T. Hepatitis E virus infection as a marker for contaminated community drinking water sources in Tibetan villages. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2006; 2(74): 250-254.

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., 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* 1994; 21(91): 10198-10202.

Tyagi, S., Surjit, M., Roy, A. K., Jameel, S., and Lal, S. K. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-microglobulin/bikunin precursor (AMBp) and expedites their export from the hepatocyte. *J.Biol.Chem.* 2004; 28(279): 29308-29319.

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.

Usmanov, R. K., Balaian, M. S., Dzhumaliev, D. I., Alymbaeva, D. B., Korolev, M. B., Karas', F. R., Zamiatina, N. A., Berdikozhoeva, 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.

Vaidya, S. R., Chitambar, S. D., and Arankalle, V. A. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *Journal of Hepatology* 2002; 1(37): 131-136.

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.

Vanotti, M. B., Szogi, A. A., Hunt, P. G., Millner, P. D., and Humenik, F. J. Development of environmentally superior treatment system to replace anaerobic swine lagoons in the USA. *Bioresour.Technol.* 2007; 17(98): 3184-3194.

Viancelli, A., García, L. A., Kunz, A., Steinmetz, R., Esteves, P. A., and Barardi, C. R. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. *Res.Vet.Sci.* 2012a; 1(93): 538-543.

Viancelli, A., García, L. A., Schiochet, M., Kunz, A., Steinmetz, R., Ciacci-Zanella, J. R., Esteves, P. A., and Barardi, C. R. Culturing and molecular methods to assess the infectivity of porcine circovirus from treated effluent of swine manure. *Res.Vet.Sci.* 2012b; 3(93): 1520-1524.

Viancelli, A., Kunz, A., Steinmetz, R. L., Kich, J. D., Souza, C. K., Canal, C. W., Coldebella, A., Esteves, P. A., and Barardi, C. R. Performance of two swine manure treatment systems on chemical composition and on the reduction of pathogens. *Chemosphere* 2013; 4(90): 1539-1544.

Viau, E. and Peccia, J. Survey of wastewater indicators and human pathogen genomes in biosolids produced by class a and class B stabilization treatments. *Appl.Environ.Microbiol.* 2009; 1(75): 164-174.

Villalba, M. D., Avalos, A. T., Lay, L. D., Hernandez, A. D., Corredor, M. B., Moreno, A. G., and Frometa, S. S. Acute hepatitis E virus infection in a Cuban patient. *International Journal of Infectious Diseases* 2005; 5(9): 286-287.

Villalba, Mde L., Lay, Lde L., Chandra, V., Corredor, M. B., Frometa, S. S., Moreno, A. G., and Jameel, S. Hepatitis E virus genotype 1, Cuba. *Emerg.Infect.Dis.* 2008; 8(14): 1320-1322.

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.

Wang, Y., Ling, R., Erker, J. C., Zhang, H., Li, H., Desai, S., Mushahwar, I. K., and Harrison, T. J. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J.Gen.Virol.* 1999; 80 (Pt 1): 169-177.

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

Wang, Y., Zhang, H., Li, Z., Gu, W., Lan, H., Hao, W., Ling, R., Li, H., and Harrison, T. J. Detection of sporadic cases of hepatitis E virus (HEV) infection in China using immunoassays based on recombinant open reading

frame 2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4. *J.Clin.Microbiol.* 2001b; 12(39): 4370-4379.

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.

Ward, P., Muller, P., Letellier, A., Quessy, S., Simard, C., Trottier, Y. L., Houde, A., and Brassard, J. Molecular characterization of hepatitis E virus detected in swine farms in the province of Quebec. *Can.J.Vet.Res.* 2008; 1(72): 27-31.

Ward, P., Poitras, E., Leblanc, D., Letellier, A., Brassard, J., Plante, D., and Houde, A. Comparative analysis of different TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control. *J.Appl.Microbiol.* 2009; 4(106): 1360-1369.

Wenzel, J. J., Preiss, J., Schemmerer, M., Huber, B., Plentz, A., and Jilg, W. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J.Clin.Virol.* 2011; 1(52): 50-54.

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.

Wibawa, I. D., Suryadarma, I. G., Mulyanto, Tsuda, F., Matsumoto, Y., Ninomiya, M., Takahashi, M., and Okamoto, H. Identification of genotype 4 hepatitis E virus strains from a patient with acute hepatitis E and farm pigs in Bali, Indonesia. *J.Med.Virol.* 2007; 8(79): 1138-1146.

Wichmann, O., Schimanski, S., Koch, J., Kohler, M., Rothe, C., Plentz, A., Jilg, W., and Stark, K. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J.Infect.Dis.* 2008; 12(198): 1732-1741.

Wiley, B. B. and Westerberg, S. C. Survival of human pathogens in composted sewage. *Appl.Microbiol.* 1969; 6(18): 994-1001.

Wing, S. and Wolf, S. Intensive livestock operations, health, and quality of life among eastern North Carolina residents. *Environ.Health Perspect.* 2000; 3(108): 233-238.

Wiratsudakul, A., Sariya, L., Prompiram, P., Tantawet, S., Suraruangchai, D., Sedwisai, P., Sangkachai, N., Suksai, P., and Ratanakorn, P. Detection and phylogenetic characterization of hepatitis E virus genotype 3 in a captive wild boar in Thailand. *J.Zoo.Wildl.Med.* 2012; 3(43): 640-644.

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.

Wong, K. and Xagorarakis, I. A perspective on the prevalence of DNA enteric virus genomes in anaerobic-digested biological wastes. *Environ.Monit.Assess.* 2012; 8(184): 5009-5016.

Wong, K., Xagorarakis, I., Wallace, J., Bickert, W., Srinivasan, S., and Rose, J. B. Removal of viruses and indicators by anaerobic membrane bioreactor treating animal waste. *J.Environ.Qual.* 2009; 4(38): 1694-1699.

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.

Worm, H. C., van der Poel, W. H., and Brandstatter, G. Hepatitis E: an overview. *Microbes.Infect.* 2002; 6(4): 657-666.

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.

Xing, L., Li, T. C., Mayazaki, N., Simon, M. N., Wall, J. S., Moore, M., Wang, C. Y., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T., and Cheng, R. H. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J.Biol.Chem.* 2010; 43(285): 33175-33183.

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 Shokakibyo 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.

Yang, H., Xiao, J., El-Din, M. G., Buchanan, I. D., Bromley, D., and Ikehata, K. Soil-based treatment of partially treated liquid swine manure. *Environ.Technol.* 2007; 1(28): 59-70.

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.

Yin, S., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. A new Chinese isolate of hepatitis E virus: comparison with strains recovered from different geographical regions. *Virus Genes* 1994; 1(9): 23-32.

Zaaijer, H. L., Yin, M. F., and Lelie, P. N. Seroprevalence of hepatitis E in The Netherlands. *Lancet* 1992; 8820(340): 681.

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.

Zhu, F. C., Zhang, J., Zhang, X. F., Zhou, C., Wang, Z. Z., Huang, S. J., Wang, H., Yang, C. L., Jiang, H. M., Cai, J. P., Wang, Y. J., Ai, X., Hu, Y. M., Tang, Q., Yao, X., Yan, Q., Xian, Y. L., Wu, T., Li, Y. M., Miao, J., Ng, M. H., Shih, J. W., and Xia, N. S. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 9744(376): 895-902.

Zhu, J., Ndegwa, P. M., and Luo, A. Effect of solid-liquid separation on BOD and VFA in swine manure. *Environ.Technol.* 2001; 10(22): 1237-1243.

Zhuang, H., Cao, X. Y., Liu, C. B., and Wang, G. M. Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol.Jpn.* 1991; 26 (3): 135-138.

Ziemer, C. J., Bonner, J. M., Cole, D., Vinje, J., Constantini, V., Goyal, S., Gramer, M., Mackie, R., Meng, X. J., Myers, G., and Saif, L. J. Fate and transport of zoonotic, bacterial, viral, and parasitic pathogens during swine manure treatment, storage, and land application. *J.Anim Sci.* 2010; 13 Suppl(88): E84-E94.

**9.- PUBLICACIONES RELACIONADAS
CON LA TESIS**

De: MBT2@wiley.com [mailto:MBT2@wiley.com]

Enviado el: martes, 16 de abril de 2013 18:52

Para: María Teresa Pérez Gracia

Asunto: [!! SPAM] Your article to be published in Microbial Biotechnology - MBT2-12064

Dear Author,

Article title: "Detection of Hepatitis E Virus (Hev) Through the Different Stages of Pig Manure
Composting Plants"

Congratulations on the acceptance of your article for publication in Microbial Biotechnology.

Your article has been received by our production department. You can track its progress at
Wiley-Blackwell Author Services.

To login to Wiley-Blackwell Author Services and add your article to your account, go to:

Detection of hepatitis E virus (HEV) through the different stages of pig manure composting plants

M. García,¹ S. Fernández-Barredo² and M. T. Pérez-Gracia^{1,2*}

¹Área Microbiología, Instituto Ciencias Biomédicas, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Moncada (Valencia), Spain.

²Centro Diagnóstico Veterinario (CEDIVET), Valencia, Spain.

Summary

Hepatitis E virus (HEV) is an increasing cause of acute hepatitis in industrialized countries. The aim of this study was to evaluate the presence of HEV in pig manure composting plants located in Spain. For this purpose, a total of 594 samples were taken in 54 sampling sessions from the different stages of composting treatment in these plants as follows: slurry reception ponds, anaerobic ponds, aerobic ponds, fermentation zone and composting final products. HEV was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-nested PCR) in four (80%) of five plants studied, mainly in the first stages of the process. HEV was not detected in any final product (compost) sample, destined to be commercialized as a soil fertilizer, suggesting that composting is a suitable method to eliminate HEV and thus, to reduce the transmission of HEV from pigs to humans.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is the main causative agent of enterically transmitted non-A non-B hepatitis (Purcell and Emerson, 2000; Perez-Gracia and Rodriguez-Iglesias, 2003). Hepatitis E is considered an infectious disease endemic in developing areas such as India, Africa and South-east Asia, because of poor sanitary conditions in drinking water. When it was first reported in developed countries, HEV was related to travel to endemic areas. However, the epidemiology of HEV in industrialized countries like Spain have changed in the last years, with an

increasing number of non-travel associated sporadic cases (Perez-Gracia *et al.*, 2004). In industrialized countries, hepatitis E actually represents less than 3% of acute viral hepatitis cases (Purdy and Khudyakov, 2011). However, the overall relevance of HEV infection has been underestimated and the disease may to be considered like a global health problem at the present time. The WHO estimates that more than 3 million individuals suffer symptomatic acute hepatitis E and the disease causes around of 70 000 deaths at year (Pischke and Wedemeyer, 2012). The overall mortality of hepatitis E in the general population is less than 1%; but it can reach up to 28% in infected pregnant women (Khuroo and Kamili, 2003).

The high phylogenetic homology observed between pig and humans strains of genotype 3 in the same geographical area suggests that hepatitis E is a zoonotic disease. This statement has been reinforced by the results of several studies in Japan (Takahashi *et al.*, 2003), Korea (Ahn *et al.*, 2005), the UK (Banks *et al.*, 2004; Ijaz *et al.*, 2005; Tolari *et al.*, 2006) and also in Spain (Pina *et al.*, 2000; Perez-Gracia *et al.*, 2007), where they reported a nucleotide similarity of 94% between human and pig strains.

Besides the high nucleotide homology observed, HEV has been demonstrated to be able of crossing the species barrier, raising concern for the potential ways of zoonotic transmission from swine to humans (Meng, 2011).

The direct application of the slurries in agricultural areas is the more economic and ecological method in the management and recycling of the same ones (Ziemer *et al.*, 2010; Pardo *et al.*, 2011), following the parameters established by the law. Nevertheless, the appearance in the last years of zones with high density of cattle intensive developments generates a large amount of wastes. In this sense, Spain is the second country in the business of pig livestock in European Union (EU), with 25 million of units. The area studied has 170 farms distributed in an approximated surface of 1000 square miles, generating a total amount of 1 million of tones of slurries at year (source: EUROSTAT, MAPA, CATV) of 41 million of tones at year generated in EU. The management of these products turns out to be complicated and inefficient, constituting an environmental and sanitary problem because of zoonotic pathogens like HEV, may be transported to drinking water resources (Bolado-Rodriguez *et al.*, 2010; Hazam *et al.*, 2010; Meng, 2011) and other problems like excessive nitrification of soil and presence of excessive concentra-

Received 5 February, 2013; accepted 10 April, 2013. *For correspondence. E-mail teresa@uch.ceu.es.es; Tel. (+96) 136 90 00; Fax (+96) 139 52 72.

doi:10.1111/1751-7915.12064

Funding Information This work was funded in part by grants from the Universidad CEU Cardenal Herrera (PRUCH 25/10, PRUCH 39/11 and PRUCH 19/12).

© 2013 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1
2
3
4
5
6
7

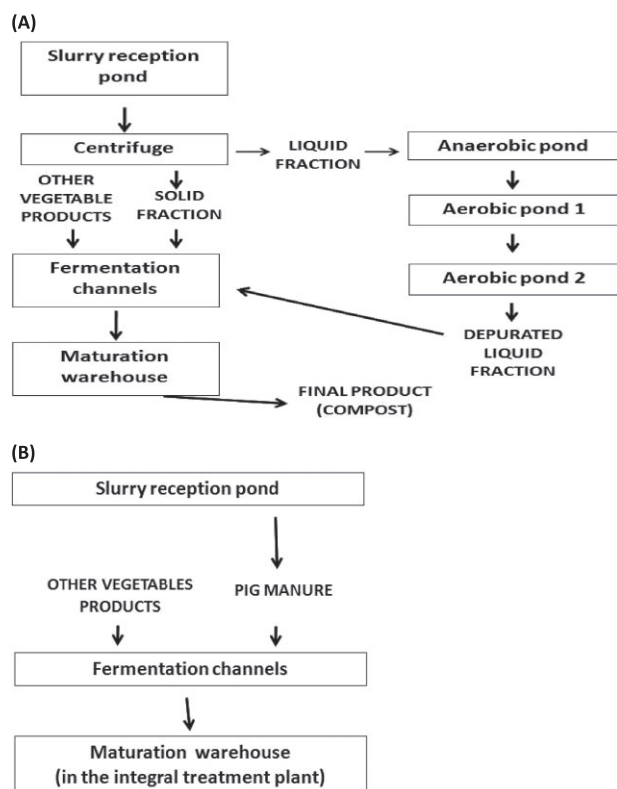


Fig. 1. A. Plants type A flow-chart.
B. Plants type B flow-chart.

tion of heavy metals. These problems worry both the livestock sector and Public Health authorities.

In this sense, the pig manure composting plants constitutes an innovative purification system in Spain, and these are the only plants that are currently being used. These procedures performed in these plants are safe alternative methods in the management of the slurries.

The aim of this study was to evaluate the presence of HEV in the different stages of pig manure composting plants.

Results

Two different types of composting plants (type A and type B), based on the type of manure treatment, were studied.

Plants performing a total treatment of the slurry (type A plants), include an initial separation of liquid and solid phases of the slurry by centrifugation and posterior purification by fermentation procedures.

The purification process in type A plants (Fig. 1A) starts with an initial centrifuge. Liquid fraction of the slurries is carried to the anaerobic lagoon, where the slurries will remain 100 days. In this time; methanogenics, acetogenics and hydrolysis processes lead to a reduction of the smell, decrease of pathogens and stabilization of organic matter and hence reduction of BOD (biological oxygen demand).

Liquid from the anaerobic pond goes on later to the aerobic ponds 1 and 2, where the slurries will remain 10 days in each one. In this stage, offensive odours decrease and reduction of pathogen continues, conversion of available nitrogen to ammoniacal nitrogen and a decrease of C : N ratio is performed also.

The final product of this step is a depurated liquid fraction that will be mixed with the solid fraction and other vegetables, and carried to the fermentation channels where the composting process is performed. Composting is an aerobic process that requires a continuous supply of air with mechanical mixing during 21 days approximately. The temperature in the pile can rise in the 10 first days to as high as 65°C.

As opposed to type A plants, the type B plants does not make a fractionated treatment of the slurry (Fig. 1B) and directly use it in the composting process.

The final product is the compost, an inoffensive, depurated and a better soil fertilizer than raw slurries.

We have studied two type A plants (A1 and A2) and three type B plants (B1, B2 and B3). A total number of four (80%) of five plants studied were positive to the presence of RNA-HEV. According to the type of plant, HEV was detected in two (100%) of the two type A plants and in two (66.66%) of the three type B plants (Table 1).

According to the different stage of treatment, in plant A1, HEV was detected in 24 (88.89%) of 27 sampling sessions in the reception pond. In 18 (66.67%) of 27 sampling sessions, HEV was detected in the anaerobic pond; which is the first step of purification process. Only in

Table 1. Nested-PCR results according to the number of sampling sessions in the different stages of treatment in type A and B plants.

Plant	Reception pond	Anaerobic pond	Solid product from centrifuge	Aerobic pond 1	Aerobic pond 2	Fermentation channel (Start)	Fermentation channel (End)	Maturation warehouse	Final pellet
A1	24/27 ^a (88.89%) ^b	18/27 (66.66%)	3/27 (11.11%)	3/27 (11.11%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)
A2	9/9 (100%)	6/9 (66.66%)	6/9 (66.66%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/3 (0%)
B1	0/3 (0%)	–	–	–	–	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
B2	3/6 (50%)	–	–	–	–	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
B3	3/9 (33.33%)	–	–	–	–	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)

a. Sampling sessions HEV positive/total number of sampling sessions.

b. Percentage of positive sampling sessions.

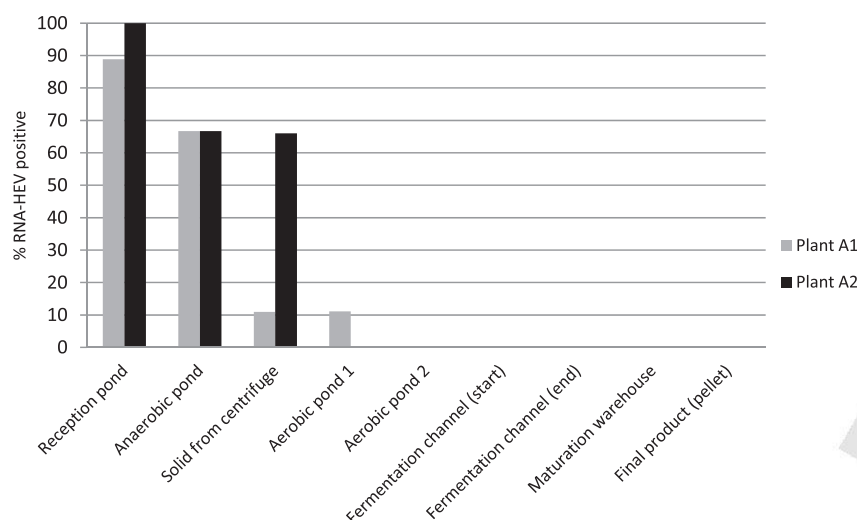


Fig. 2. RNA-HEV detection through the different stage of pig manure treatment in type A plants.

35
36
37

38

1 three (11.11%) of the 27 sampling sessions, HEV was
2 detected in the aerobic pond number 1; from this stage
3 forward to the end of the composting process, HEV was
4 not detected (Fig. 2).

5 In plant A2, HEV was detected in nine (100%) of nine
6 sampling sessions in the reception pond. In six (66.66%)
7 of nine sampling sessions, HEV was detected in the
8 anaerobic pond; after this stage of treatment, HEV was
9 not detected in either solid or liquid samples (Fig. 2).

10 In type B plants, HEV was not detected in plant B1 and
11 it was detected in three (50%) of six sampling sessions in
12 plant B2, and in three (33.33%) of nine sampling sessions
13 in plant B3 in the respective reception ponds. HEV was
14 not detected in any solid samples in these plants.

15 Discussion

16 In recent years, the increase of animal farming has gen-
17 erated an intensive and megascale livestock operations
18 that produce a large amount of animal wastes worldwide
19 (Cole *et al.*, 2000; Spencer and Guan, 2004). A lot of
20 causative agents of many infectious diseases have been
21 identified in slurries, including HEV. The storage and
22 treatment before land application are commonly per-
23 formed in farms; however, it does not result in a total
24 removal of pathogens from the manure (Ziemer *et al.*,
25 2010).

26 Pig manure slurry is an emergent health and environ-
27 mental problem and a potential source of infectious patho-
28 gens like HEV (Kasorndorkbua *et al.*, 2005). If the slurries
29 do not undergo a process of purification, and are spread
30 without control over crop fields, population can be infected
31 by the virus by consuming contaminated water from aquif-
32 ers or vegetables irrigated with HEV contaminated water.
33 Moreover, veterinarians, farmers and swine workers have
34

35 been observed to be at a higher risk (Perez-Gracia *et al.*,
36 2007; Galiana *et al.*, 2008), as well as the contact with pig
37 manure constitutes a factor of higher risk. To reduce the
38 impact of animal waste production several technologies
39 have been developed around the world. One of them has
40 been performed in a high swine production zone in Cas-
41 tellon (Spain), with the installation of five pig manure
42 composting plants (A1, A2, B1, B2, B3) with a pioneer
43 treatment system.

44 Previous works evaluated the survival of pathogens
45 after the treatment of the sludge (Sobsey *et al.*, 2003;
46 Costantini *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2008), but this
47 is the first study that evaluates the effectiveness of
48 swine manure composting plants in the elimination of
49 HEV.

50 The HEV is widely widespread in the zone of action of
51 the plants studied (Fernández-Barredo *et al.*, 2007). In
52 fact, in this study HEV was detected in 80% of the
53 plants. These data coincide with other works in the
54 same geographical zone (Seminati *et al.*, 2008) that
55 reported in some cases 76.19% of HEV prevalence in
56 farms closer to these plants (Fernández-Barredo *et al.*,
57 2006).

58 In plants with total treatment of the slurries (type A
59 plants), HEV was not detected in any sample from the
60 liquid fraction after the stage of treatment corresponding
61 to the aerobiosis 1 pond (Fig. 1A), suggesting that a high
62 percentage of HEV had been inactivated to this point in
63 anaerobic and aerobic ponds, and reduced its presence
64 at levels not detectable by PCR.

65 There are no data reporting the resistance of HEV to
66 anaerobic purification processes; however, a work about
67 the resistance of porcine enteric virus of the *Caliciviridae*
68 family at different purification treatments of slurry
69 (Costantini *et al.*, 2007) confirmed the reduction of the
70
71
72
73

number of viral particles after subjecting slurry to anaerobic digestion. Additionally, this study confirmed that the aerobic treatment was able to reduce the concentration of more resistant virus, such as rotavirus type A, B and C, which themselves were capable to resist anaerobic processes, to undetectable levels by PCR.

Additionally, the fact of HEV in type A plants was detected in a higher percentage in the reception pond compared with the detection of HEV in solid products from centrifuge, could be due to the lesser resistance of the virus in solid matrices (Pesaro *et al.*, 1995).

HEV was not detected in any solid samples of processed product by fermentation. The high temperatures achieved in the fermentation channels (approximately 65°C), could explain the lack of HEV amplification. In this sense, a study performed by Emerson and colleagues in 2005, conducted with human and swine strains, showed that HEV genotypes 1 and 2, were 50% inactivated at temperatures between 45°C and 50°C, and totally inactivated at 60°C. Only Mex 14 (genotype 2) strain was observed to be 100% resistant to 56°C and 20% to temperatures of 60°C (Emerson *et al.*, 2005). In addition, a recent study (Barnaud *et al.*, 2012), shows an efficient inactivation of the virus when food products from infected by HEV pork livers, were heated at least 20 min to an internal temperature of 71°C.

In this way, the low percentage of HEV positive samples after anaerobic digestion, suggests that large amounts of virus do not exceed this stage of treatment. The lack of detection of HEV in solid samples at the end phases of the composting treatment and in the final product, suggests that composting process is effective to eliminate this virus from the slurries, and thus to reduce the transmission of HEV from pigs to humans.

Experimental procedures

Collection of samples of composting plants

A total number of 594 liquid and solid samples were collected in 54 different sampling sessions from March 2006 to December 2011 in five plants distributed as follows (Table 1): two type A plants (A1 and A2) and three type B plants (B1, B2 and B3). The higher number of samples collected from type A plants, 504 (87.5%) is due to the fact that these plants assemble the majority of purification processes and therefore receive more manure than type B plants. In the same way, the higher number of liquid samples, 360 (60.6%) corresponds to the higher number of purification processes carried out in the liquid phase of the slurry.

The plants are located in Eastern Spain, in a zone endemic for porcine HEV (Fernández-Barredo *et al.*, 2006). The plants were sampled in 54 different sampling sessions, in which a variable number of samples were taken in each stage taking into account the volume of each pond. Thus, in the anaerobic pond a total number of 180 samples were collected in five different points at each sampling. The pond was considered

positive to HEV when at least one of the five sampling points was positive. The rest of the ponds were equipped with a homogenization system which was activated 10 min before the sampling, therefore only one sample of a larger volume was taken. Solid samples were homogenized by mechanical processes included in the periodic aeration system performed in the integrated treatment.

It was impossible to take the same number of samples in type B as in type A plants, due to a premature closing of the same ones because of technical and economical problems.

Liquid samples (50 ml), were collected directly from the ponds and kept in sterile falcon tubes until processing. All the samples were transported refrigerated immediately to the laboratory. Solid samples were diluted at 10% (w/v) in sterile phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2.

Virus particle concentration, RNA extraction and reverse transcription-nested PCR (RT-nested PCR) with internal control

All the samples collected were initially centrifuged 1 min at 1000 *g* and 15 ml of the supernatant were centrifuged at 4°C, 1 h at 3000 *g* to concentrate the virus particles. Remaining supernatant (1.5 ml) was transferred to a sterile eppendorf tube and it was centrifuged at 12 100 *g* for 10 min, and 1 ml of the supernatant was stored at -80°C.

RNA was extracted from 140 µl of each concentrated sample according to the method described by Fernández-Barredo and colleagues (2006). Two pairs of degenerated oligonucleotide primers based on human and swine HEV sequences, were used to amplify a 348-bp-long fragment from the HEV open reading frame 2 (ORF-2) using a reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) (Huang *et al.*, 2002). A negative and a positive control from a naturally infected pig (GenBank Accession No. AY323506) were included in each assay. The different stages of the procedure were performed in different places to avoid the possibility of cross-contamination. The faecal samples may contain RT-PCR inhibition substances like phenolic and methabolic compounds, the concentration and presence of these inhibitors is different and heterogeneous from sample to sample (Rutjes *et al.*, 2007). To detect the presence of these substances an internal control was included within RT-PCR reaction. The internal control used is a modified 77 bp PCR product cloned into a plasmid containing a sequence that can be amplified simultaneously with the target using the same primers set in the first PCR performed according to the protocol described by Huang and colleagues in 2002. The 77 bp amplified fragment was detected in the electrophoresis gel. PCR inhibition was not detected. The sensitivity of the PCR was estimated in 31.6 PID₅₀ of infectious swine HEV (Huang *et al.*, 2002).

The PCR products were separated by electrophoresis in a 2% agarose gel and detected by staining with ethidium bromide (0.5 µg ml⁻¹). The samples were considered positive to HEV when a band of 348 bp was seen in the agarose gel. Amplicons from all positive samples were purified and confirmed by sequence analysis. Sequences obtained in this study have been submitted to the GenBank database under Accession No. KC145131–KC145147.

Acknowledgements

We are grateful to Ms Beatriz Suay for the assistance in translating the manuscript.

Conflict of interest

None declared.

References

- Ahn, J.M., Kang, S.G., Lee, D.Y., Shin, S.J., and Yoo, H.S. (2005) Identification of novel human hepatitis E virus (HEV) isolates and determination of the seroprevalence of HEV in Korea. *J Clin Microbiol* **43**: 3042–3048.
- Banks, M., Heath, G.S., Grierson, S.S., King, D.P., Gresham, A., Girones, R., *et al.* (2004) Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet Rec* **154**: 223–227.
- Barnaud, E., Rogee, S., Garry, P., Rose, N., and Pavio, N. (2012) Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5153–5159.
- Bolado-Rodriguez, S., Garcia-Sinovas, D., and Alvarez-Benedi, J. (2010) Application of pig slurry to soils. Effect of air stripping treatment on nitrogen and TOC leaching. *J Environ Manage* **91**: 2594–2598.
- Cole, D., Todd, L., and Wing, S. (2000) Concentrated swine feeding operations and public health: a review of occupational and community health effects. *Environ Health Perspect* **108**: 685–699.
- Costantini, V.P., Azevedo, A.C., Li, X., Williams, M.C., Michel, F.C., Jr, and Saif, L.J. (2007) Effects of different animal waste treatment technologies on detection and viability of porcine enteric viruses. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5284–5291.
- Emerson, S.U., Arankalle, V.A., and Purcell, R.H. (2005) Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* **192**: 930–933.
- EUROSTAT DATA BASE (**) **. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/agriculture/data/database>.
- Fernández-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Vega, S., Gomez, M.T., and Perez-Gracia, M.T. (2006) 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* **18**: 462–465.
- Fernández-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Gomez-Munoz, M.T., Vega, S., Rodriguez-Iglesias, M.A., and Perez-Gracia, M.T. (2007) Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Can J Vet Res* **71**: 236–240.
- Galiana, C., Fernández-Barredo, S., Garcia, A., Gomez, M.T., and Perez-Gracia, M.T. (2008) Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg* **78**: 1012–1015.
- Hazam, R.K., Singla, R., Kishore, J., Singh, S., Gupta, R.K., and Kar, P. (2010) Surveillance of hepatitis E virus in

- sewage and drinking water in a resettlement colony of Delhi: what has been the experience? *Arch Virol* **155**: 1227–1233.
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Schommer, S.K., Pierson, F.W., *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.
- Ijaz, S., Arnold, E., Banks, M., Bendall, R.P., Cramp, M.E., Cunningham, R., *et al.* (2005) Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis* **192**: 1166–1172.
- Kasornrorkbua, C., Opriessnig, T., Huang, F.F., Guenette, D.K., Thomas, P.J., Meng, X.J., and Halbur, P.G. (2005) Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7831–7837.
- Khuroo, M.S., and Kamili, S. (2003) Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat* **10**: 61–69.
- Meng, X.J. (2011) From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* **161**: 23–30.
- Pardo, T., Clemente, R., and Bernal, M.P. (2011) Effects of compost, pig slurry and lime on trace element solubility and toxicity in two soils differently affected by mining activities. *Chemosphere* **●●**: ●●–●●.
- Perez-Gracia, M.T., and Rodriguez-Iglesias, M. (2003) [Hepatitis E virus: current status]. *Med Clin (Barc)* **121**: 787–792.
- Perez-Gracia, M.T., Garcia-Valdivia, M.S., Galan, F., and Rodriguez-Iglesias, M.A. (2004) Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol* **48**: 197–200.
- Perez-Gracia, M.T., Mateos, M.L., Galiana, C., Fernández-Barredo, S., Garcia, A., Gomez, M.T., and Moreira, V. (2007) Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am J Trop Med Hyg* **77**: 893–896.
- Pesaro, F., Sorg, I., and Metzler, A. (1995) *In situ* inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl Environ Microbiol* **61**: 92–97.
- Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J., and Girones, R. (2000) HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* **33**: 826–833.
- Pischke, S., and Wedemeyer, H. (2012) Hepatitis E virus infection: multiple faces of an underestimated problem. *J Hepatol* **●●**: ●●–●●. doi:pii: S0168-8278(12)00961-0.10.1016/j.jhep.2012.12.013.
- Purcell, R.H., and Emerson, S.U. (2000) Hepatitis E virus infection. *Lancet* **355**: 578.
- Purdy, M.A., and Khudyakov, Y.E. (2011) The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Res* **161**: 31–39.
- Rutjes, S.A., Lodder, W.J., Bouwknegt, M., and Husman, A.M. (2007) Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate

- 1 internal quality controls for RT-PCR. *J Virol Methods* **143**:
2 112–116.
- 3 Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N., and MartIn,
4 M. (2008) Distribution of hepatitis E virus infection and its
5 prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J*
6 **175**: 130–132.
- 7 Sobsey, M., Gwangpyo, K., Simmons, O., Likirdopulos, C.,
8 and Worley-Davis, L. (2003) Evaluation of alternative swine
9 waste treatment and management technologies for control
10 of pathogens. In *Proceedings North Carolina Animal Waste*
11 *Management Workshop. Oct. 16–17, 2003, Research Tri-*
12 *angle Park, NC.* Havenstein, G.B. (ed.). Raleigh, NC, USA:
13 College of Agriculture and Life Sciences, NCSU, pp. 112–
14 125.
- 15 Spencer, J.L., and Guan, J. (2004) Public health implications
16 related to spread of pathogens in manure from livestock
17 and poultry operations. *Methods Mol Biol* **268**: 503–
18 515.
- Takahashi, K., Kang, J.H., Ohnishi, S., Hino, K., Miyakawa,
H., Miyakawa, Y., *et al.* (2003) Full-length sequences of six
hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from
patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan.
Intervirology **46**: 308–318.
- Tolari, F., Chiaro, L.D., Card, R., Mazzei, M., Bandecchi, P.,
and Banks, M. (2006) Phylogenetic study of viral isolates of
Swine and human hepatitis E virus. *Vet Res Commun* **30**
(Suppl. 1): 273–276.
- Wagner, A.O., Gstraunthaler, G., and Illmer, P. (2008) Sur-
vival of bacterial pathogens during the thermophilic
anaerobic digestion of biowaste: laboratory experiments
and in situ validation. *Anaerobe* **14**: 181–183.
- Ziemer, C.J., Bonner, J.M., Cole, D., Vinje, J., Constantini, V.,
Goyal, S., *et al.* (2010) Fate and transport of zoonotic,
bacterial, viral, and parasitic pathogens during swine
manure treatment, storage, and land application. *J Anim*
Sci **88**: E84–E94.