

MANUSCRITO ACEPTADO

**DETECCIÓN DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE) EN
MUESTRAS DE HECES DE CERDOS EN PLANTAS DE BENEFICIO DE**

ANTIOQUIA, COLOMBIA

**DETECTION OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) GENOME FROM PIGS FECES
SAMPLES IN SLAUGHTERHOUSES IN ANTIOQUIA, COLOMBIA.**

J. E. Forero¹, J. E. Parra¹, A López^{1}*

Artículo recibido: 3 de abril de 2014. Aprobado: 1 de septiembre de 2014

RESUMEN

El Virus de la Hepatitis E es uno de los agentes causales de enfermedad hepática aguda en humanos, aunque también puede llevar a hepatitis crónica en pacientes inmunocomprometidos. Existen cuatro genotipos que generan enfermedad en humanos: los genotipos 1 y 2 asociados a brotes epidémicos por consumo de aguas contaminadas y los genotipos 3 y 4 de transmisión zoonótica, implicados en brotes esporádicos en países desarrollados donde el cerdo es el principal reservorio. En Colombia existe evidencia serológica de la infección en humanos y cerdos, y se ha detectado el genoma viral en hígados de cerdos en plantas de beneficio y expendios de carne, sin embargo no se conoce lo suficiente sobre la infección en el país. Con el fin de determinar si los cerdos en Antioquia están excretando virus en la edad de beneficio, 152 muestras de heces de cerdos de distintas regiones del departamento de Antioquia fueron obtenidas en cinco plantas de

¹Grupo Biodiversidad y Genética Molecular BIOGEM, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. AA1779, Autopista Norte Calle 59A nro.63-20, bloque 50, piso 3, oficina 310. Medellín (Colombia).

*Autor para correspondencia: alherrera@unal.edu.co.

MANUSCRITO ACEPTADO

beneficio del departamento y se se determinó la presencia del genoma viral por medio RT-PCR. El porcentaje de positividad encontrado fue del 26,9% (41/152) se encontro ademas que los cerdos que provenían de la subregión Norte y Oriente de Antioquia tuvieron el menor (11,6%) y mayor (58,3%) porcentaje de muestras positivas respectivamente. Estos resultados indican que los cerdos en el momento de sacrificio están excretando el virus a través de sus heces y que el HEV está circulando en las diferentes subregiones del departamento.

Palabras clave: Virus de Hepatitis E, Porcinos, Zoonosis, RT-PCR.

ABSTRACT

The Hepatitis E virus is one of the causative agents of acute liver disease in humans, although it can also lead to chronic hepatitis in immunocompromised patients. There are four genotypes that generate human disease: genotypes 1 and 2, associated with outbreaks due to consumption of contaminated waters, and genotypes 3 and 4 by zoonotic transmission, implicated in sporadic outbreaks in developed countries, where pigs are the main reservoir in these countries. In Colombia there is serological evidence of infection in humans and pigs, and the viral genome has been detected in livers of pigs at slaughterhouses and butcher shops, however is not enough known about the infection in the country. In order to find out whether pigs in Antioquia (Colombia) are excreting the virus, the presence of the viral genome by RT-PCR was determined in 152 samples of pig feces obtained at five slaughterhouses of Antioquia, which came from different regions of Antioquia. The percentage of positivity was 26.9% (41/152) and pigs that came from the North and East subregion of Antioquia had the lowest (11.6%) and higher (58.3%)

MANUSCRITO ACEPTADO

percentage of positive samples respectively. These results indicate that pigs at slaughter age, are excreting the virus in their feces and that HEV is circulating in different subregion of the department.

Keywords: Hepatitis E Virus, Swine, Zoonoses, RT-PCR.

INTRODUCCION

Las características clínicas y epidemiológicas del virus tanto en zonas endémicas como no endémicas y el creciente rango de hospederos donde se ha podido demostrar la presencia de diferentes variantes del HEV (Johne et al. 2014) han mostrado la importancia que este virus tiene para la salud pública mundial (Mirazo et al. 2014). Particularmente en América Latina, se ha reportado la circulación del virus en diferentes países, por ejemplo en Argentina se ha detectado el genoma del virus en cerdos de diferentes provincias, con un alto grado de homología de secuencia de nucleótidos a las cepas de HEV de humanos de ese país (Munné et al. 2006). Por otra parte, en una comunidad rural boliviana se detectó la presencia del genotipo 3 de HEV en cerdos y en humanos con una homología del 76% en nucleótidos y el 92% en aminoácidos (Dell'Amico et al. 2011). Así mismo Brasil (dos Santos et al. 2009), Venezuela (Gutiérrez C et al. 2012) Uruguay (Mirazo et al. 2013) Chile (Ibarra et al. 2007) y Perú (Vildosola et al. 2000) han reportado la presencia del virus en diferentes tipos de poblaciones humanas y animales (Echevarría et al. 2013). La elevada presencia de HEV en cerdos en diferentes países (Baechlein et al. 2011; Clayson et al. 1995; de Deus et al. 2008) las altas tasas de propagación del virus entre los cerdos (Bouwknegt et al. 2008), la transmisión del virus hacia los humanos (Tei et al. 2003) y la alta

MANUSCRITO ACEPTADO

homología entre genotipos que infectan humanos y cerdos (Lu et al.2006, Tei et al.2003) demuestran que los cerdos son uno de los reservorios más importantes de HEV para la infección de humanos. A pesar de que hay estudios en Colombia que muestran que existe evidencia serológica de la infección en humanos (Betancurt et al. 2013; Pealez et al. 2014) y en cerdos (Ospina D 2014) y que además el genoma viral se puede detectar en hígados de esta especie en plantas de beneficio y expendios de carne (Gutiérrez et al. 2014), se desconoce si los cerdos que llegan a beneficio están en capacidad de excretar virus al ambiente, poniendo en riesgo a la carne para consumo humano, a los trabajadores de la cadena porccicola y a la población general en esta zona del país. El objetivo de este trabajo era detectar el genoma viral en heces de cerdos al momento del beneficio en Antioquia, el principal productor de carne de cerdo del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Las muestras de materia fecal de 152 cerdos (8% de error. 95% de confianza y una prevalencia estimada del 50%) aparentemente sanos y con edad aproximada de 22 semanas, fueron tomadas al azar en 5 plantas de faenado porcino de Antioquia (Nombradas de la A-E. para mantener su confidencialidad), durante el periodo comprendido entre septiembre de 2011 y mayo de 2012, teniendo en cuenta el volumen de sacrificio diario de cada planta y proporcionalmente al lugar de procedencia de los animales. Estas muestras se colectaron directamente del esfínter anal de cada animal, se rotularon debidamente y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

MANUSCRITO ACEPTADO

Extracción RNA y preparación de cDNA

Las muestras luego se resuspendieron en un tampón de sales de fosfato (PBS) estéril tratado con DEPC a una concentración de 10% p/v, la cual se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm y 140 µl del sobrenadante se sometió a extracción de RNA mediante el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue guardado en -80°C hasta su utilización. El cDNA fue preparado a partir de 5 µl RNA utilizando el estuche comercial RevertAid Enzyme Mix (Fermentas, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante y usando como iniciador de la retrotranscripción hexanucleótidos al azar “random hexamer” (Fermentas, USA). La retrotranscripción se incubó por 10 min a 25°C , luego 60 min a $43,5^{\circ}\text{C}$ y un periodo final de incubación de 5 minutos a 72°C .

PCR Anidada del ORF1 del HEV

Un fragmento de 170 pares de bases del ORF 1 se amplificó mediante una PCR anidada según lo descrito por otros investigadores (Fogeda et al. 2009) con ligeras modificaciones. Brevemente, 3 µl de cDNA se sometieron a una primera ronda de amplificación usando una mezcla maestra que contenía: 2,5 µl de Buffer (10X), 2 µl de MgCl_2 (50 mM), 1 µl de dNTPs a (20µM de cada dNTP), 2 µl (10µM) de cada uno de los cebadores (ORF-1F 5' CCAYCAGTTYATHAAGGCTCC'3; ORF-1R 5' TACCAVCGCTGRACRTC 3'), 0,2 µl de Taq DNA polimerasa (Bioline 5 U/µl), a un volumen final de 25 µl. El perfil de amplificación se desnaturalizó inicialmente a 94°C por 4 min, y luego se amplificó por 39 ciclos a 94°C por 38 seg, 51°C por 45 seg y 72°C por 60 seg; con una extensión final a 72°C por 4 min. Para la segunda ronda se utilizó 3 µl del producto de amplificación de la

MANUSCRITO ACEPTADO

primera ronda, con una solución y volumen final idéntico pero variando los cebadores por ORF-1 FN 5' CTCCTGGCRTYACWACTGC 3'; ORF-1RN GGRTGRTTCCAIARVACYTC. El perfil de temperaturas de la PCR fue: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos con 35 ciclos a 94°C por 35 segundos, 48 °C por 30 seg y 60 seg a 72°C, con una extensión final a 72°C por 3 min. Los fragmentos amplificados fueron verificados en gel de agarosa al 2,5% usando EZ-Vision (Amresco, USA) como agente intercalante. Se uso como control positivo un cDNA obtenido de una muestra de heces positiva, gentilmente donado por la doctora Munné del Laboratorio Nacional de Referencia Hepatitis Virales at INEI - Anlis "Dr. Carlos G. Malbrán Buenos Aires Argentina.

Análisis estadístico.

Para el análisis de positividad de HEV en heces de cerdos en las plantas de beneficio y según la subregión de procedencia, se calculó la frecuencias de los datos, los intervalos de confianza (con un nivel de confianza del 95%) y las diferencias entre proporciones (con base en la prueba exacta de Fisher), con un nivel de confianza del 95%; se consideran significativos valores de $p < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados usando las herramientas del programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA).

RESULTADOS Y DISCUSION

La detección molecular del HEV de las muestras de heces obtenidas en las cinco plantas de beneficio mostró que el 26,9 % de las muestras fueron positivas para el ORF1 (Figura 1). En porcentaje realtivamente alto si lo comparamos con un estudio similar realizado en

MANUSCRITO ACEPTADO

Italia (en una sola planta de beneficio) donde se encontró que de 150 muestras de heces analizadas 11(7,3%) fueron positivas por RT-PCR (Di Martino et al.2010). Sin embargo otros trabajos realizados en cerdos entre las 13 y 22 semanas de edad (en general a las 22 semanas de vida es el tiempo donde los cerdos se envían a beneficio) recolectadas en diversas granjas del Reino Unido, Portugal Italia y Holanda se encontró porcentajes de detección del virus en heces del 10%, 30%, 23% y 73% respectivamente (Berto et ál.2012); lo que indica que los resultados en las plantas de faenado de Antioquia son similares y aun menores que países catalogados como industrializados.

La proporción de cerdos positivos en cada planta de beneficio, fue de: (43/9)20.9%, (22/7)31.8%, (29/9)31.0%, (36/7)19.4% y (22/9)40.9% para las plantas A, B, C,D y E respectivamente (Figura 1). Aunque los porcentajes son variables no se encontró diferencia estadísticamente significativa en las proporciones de positividad entre cada una de las plantas (prueba exacta de fisher con un $\alpha < 0.05$). Indicando que no hay un efecto en la positividad al HEV atribuible a las plantas de beneficio analizadas las cuales tienen un nivel de tecnificación y buenas prácticas de manufactura similares y son las que reúnen la mayor proporción de sacrificio legal en Antioquia.

Los cerdos analizados pasaron la inspección sanitaria de cada una de las plantas y provenían de cinco de las nueve subregiones en las que se divide el departamento. Las subregiones Norte y Valle de Aburrá agruparon la mayor cantidad de muestras captadas (69 y 43 muestras respectivamente), lo que es consistente con el volumen de producción de cerdos aportados para el consumo humano en la region (FNP 2012). La positividad por subregión a HEV varió de 11,6% para la región Norte, a 58,3% para la región Oriente

MANUSCRITO ACEPTADO

(figura 2). No se presentó diferencia estadística para la positividad al virus en los cerdos que provenían de las subregiones Suroeste, Occidente, Valle de Aburra y Oriente; sin embargo en la subregión Norte, la de mayor volumen de producción de cerdos para consumo humano en Antioquia (FNP 2012), presentó la menor positividad a HEV al compararse con las demás subregiones (prueba de exacta de Fisher con valores de $p=0,0162$, $p=0,0019$ y $p= 0,0009$ para las Norte vs Suroeste, Norte vs Valle de Aburra y Norte Vs Oriente respectivamente.). Se desconoce la razón de esta diferencia aunque por un lado podría estar relacionado con el manejo de los protocolos de sanidad en cada granja o también por la menor capacidad de infección de las variantes del virus que circulan en esa región por lo que se hace necesario realizar estudios sobre la dinámica de transmisión en las producciones porcinas y su asociación con las prácticas sanitarias en granjas del departamento e incluso del país.

Los resultados de esta investigación están en concordancia con lo reportado por otros investigadores, los cuales encontraron que el genoma viral de HEV es detectable en heces de cerdos naturalmente infectados hasta la semana 22 (de Deus *et al.*2008; Leblanc *et al.*2007) que es la edad promedio en la que los cerdos son generalmente beneficiados en Antioquia para el consumo humano (Diaz *et al.*2011). Los porcentajes de positividad encontrados en las muestras analizadas, sugieren que independientemente de la plantas de beneficio, los cerdos en edad de sacrificio en el departamento de Antioquia están excretando virus al ambiente y aunque las técnicas de detección del genoma viral empleadas no permiten establecer si el virus es infeccioso o no, es claro que por una parte el HEV está circulando en las producciones porcinas de Antioquia, lo que pone en riesgo

MANUSCRITO ACEPTADO

de infección a los trabajadores de la cadena porcícola y por otra que la presencia del genoma del HEV en las heces de cerdos en el momento del beneficio, aumenta el riesgo de contaminación de la carne de cerdo para consumo humano. Las investigaciones sobre la dinámica del transmisión del virus son escasa en nuestro país, por lo cual se hace necesario hacer trabajos conjuntos con las autoridades de salud con el fin de generar la información necesaria para tomar las medidas pertinentes que permitan evitar la diseminación del virus hacia las fuentes de agua y disminuir el riesgo de infección en trabajadores de la cadena porcícola.

BIBLIOGRAFÍA

- Baechlein C, Schielke A, Johne R, Ulrich, RG, Baumgaertner W, Grummer B. 2010. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet Microbiol.* 144: 187–191.
- Berto A, Backer JA, Mesquita JR, Nascimento MS, Banks M, Martelli F, Ostanello F, Angeloni G, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Vasickova P, Diez-Valcarce M, Hernández M, Rodríguez -Lazaro D, van der Poel WH. 2012. Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res Notes.* 25:190.
- Betancur CA, Mejía MV, Portillo G. 2013. Seroprevalencia de Hepatitis E en trabajadores de fincas porcícolas del Valle de Aburrá 2011-2012. *Acta Med Colomb.* 38 (2): 68-70.

MANUSCRITO ACEPTADO

- Bouwknegt M, Frankena K, Rutjes SA, Wellenberg GJ, de Roda Husman AM, van der Poel WH, de Jong MC. 2008. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res.* 39(5):40
- Clayson ET, Innis BL, Myint KS, Narupiti S, Vaughn DW, Giri S, Ranabhat P, Shrestha MP. 1995. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg.* 53:228-232.
- Cruells MR, Mescia G, Gaibisso R, Ramírez M, Gutiérrez M, Kohen S, González M, Russi J, Chiparelli H, Ucar L, Pérez MT. 1997. Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay. *Gastroenterol Hepatol* 20:295–298.
- de Deus N, Casas M, Peralta B, Nofrarías M, Pina S, Martín M, Segalés J. 2008. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol.* 132: 19-28.
- Dell'Amico, MC, Cavallo A, Gonzales JL, Bonelli SI, Valda Y, Pieri A, Segund H, Ibañez R, Mantella A, Bartalesi F, Tolari F, Bartolini A. 2011. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Humans and Swine, Bolivia. *Emerg Infect Dis.* 17, 1488-1490.
- Díaz CA, Rodríguez MN, Vera VJ, Ramírez G, Casas GA, Mogollón JD. 2011. Caracterización de los sistemas de producción porcina en las principales regiones porcinas colombianas. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 24:131-144.
- Di Martino B, Di Profio F, Martella V, Di Felice E, Di Francesco CE, Ceci C, Marsilio F. 2010. Detection of hepatitis E virus in slaughtered pigs in Italy. *Arch Virol.* 155:103-106

MANUSCRITO ACEPTADO

- dos Santos DR, Vitral CL, de Paula VS, Marchevsky RS, Lopes JF, Gaspar AM, Saddi TM, Júnior NC, Guimarães Fde R, Júnior JG, Ximenes LL, Souto FJ, Pinto MA. 2009. Serological and molecular evidence of hepatitis E virus in swine in Brazil. *Vet J. Dec.* 182(3):474-80.
- Echevarría JM, González JE, Lewis-Ximenez LL, Dos Santos DR, Munné MS, Pinto MA, Pujol FH, Rodríguez-Lay LA. 2013. Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. *J Med Virol.* 85:1037-1045
- Fogeda M, Avellón A, Cilla CG, Echevarría JM, 2009. Imported and Autochthonous Hepatitis E Virus Strains in Spain. *J Med Virol.* 81: 1743–1749.
- Ibarra H, Riedemann S, Reinhardt S, Calvo M. 2007. Presencia de anti-VHE en un estudio de cohorte de porcinos ¿reservorio animal de hepatitis E en Chile? *Rev Méd Chile;* 135: 997-1001.
- Inventario porcino de Antioquia 2012. Programa de Erradicación de Peste Porcina Clásica PPC, Asoporcicultores FNP, 2012.
- Johne R, Dremsek P, Reetz J, Heckel G, Hess M, Ulrich RG Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. 2014. *Infect Genet Evol.* Jul 19;27:212-229.
- García CG, Sánchez D, Villalba MC M, Pujol FH, de los Ángeles Rodríguez Lay L, Pinto B, Chacón E P and Guzmán MG. 2012. Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. *J Med Virol* 84: 1025–1029.
- Gutiérrez C, Quintero, Forero JE, Parra JE, López-Herrera A. 2014. Detection of Hepatitis E Virus genome in pig livers in Antioquia (Colombia) *Genetics and Molecular Research.* En prensa.

MANUSCRITO ACEPTADO

- Leblanc D, Ward P, Gagné MJ, Poitras E, Müller P, Trottier YL, Simard C, Houde A. 2007. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int J Food Microbiol.* 117: 160–166.
- Lu L, Li C, Hagedorn CH. 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol*; 16:5–36.
- Mirazo S, Ramos N, Russi JC, Arbiza J. 2013. Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay. *Virus Res*; 173(2):364-70
- Mirazo S, Ramos N, Mainardi V, Gerona S, Arbiza J. 2014. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat Med.* Jun 3;6:45-59.
- Munné MS, Vladimirovsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, Guarnera E, Molina V, Monfellano M, Schlauder G, González JE. 2006. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol.* 78: 1579–1583.
- Ospina D. 2014. Determinación serológica y molecular del virus de la Hepatitis E (VHE) en cerdos de plantas de beneficio de Antioquia y clasificación de los municipios de procedencia según el nivel de seropositividad. [Tesis de maestría]. [Medellin, Colombia] Universidad Nacional de Colombia.
- Peláez, D., Hoyos, M., Rendón, J., Mantilla, C., Ospina, M., Cortés-Mancera, F., Pérez, O., Contreras, L., Estepa, Y., Arbeláez, M., & Navas, M. 2014. Infección por el virus de la hepatitis E en pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis viral en Colombia. *Biomédica*, 34(3).

MANUSCRITO ACEPTADO

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, Okamoto H. 2011. 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.* 156:1345-1358.

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

Vildosola H, Colichón A, Barreda M, Piscocoya J, Palacios O. 2000. Hepatitis E IgG antibodies seroprevalence in a peruvian risk group. *Rev Gastroenterol Peru* 20(2):111-116.

En prensa

FIGURAS

En prensa

MANUSCRITO ACEPTADO

Figura 2. Proporción de cerdos positivos para el ORF1 del genoma del HEV según la región de procedencia de los cerdos. La región Norte es significativamente diferente a las regiones Suroeste, Valle de Aburrá y Oriente.

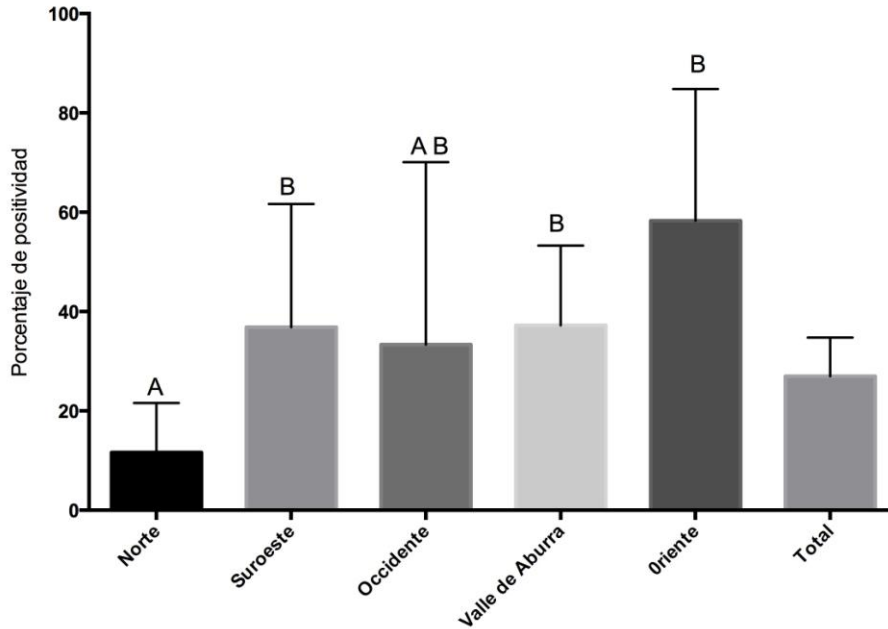


Figura 1. Proporción de cerdos positivos para el ORF1 del genoma del HEV en 5 plantas de beneficio porcino de Antioquia. No se encontró diferencia estadística de la positividad entre las plantas estudiadas.

