

Índex de Taules

Taula 1.1. Distribució geogràfica dels genotips i subtipus de VHE de mamífer (adaptat de Lu et al., 2006 i Okamoto et al., 2007).	10
Taula 1.2. Principals diferències dels patrons epidemiològics humans del virus de l'hepatitis E.	12
Taula 1.3. Prevalences d'IgG anti-HEV en porcs de diferents països.	15
Taula 1.4. Detecció de l'ARN del VHE en sèrum i femta en les diferents fases del cicle productiu.	17
Taula 1.5. Principals infeccions experimentals realitzades en porcs.	25
Table 3.1. Prevalence of HEV antibodies in pigs in different years (1985-1997).	41
Table 4.1. Prevalence of HEV antibodies in 6 Spanish farrow-to-finish swine herds.	51
Table 4.2. Percentage of positive livers and biles at slaughter age in each farm.	53
Table 4.3. Variable sites in a 168 nt sequence located in the capsid gene of HEV. In bold, animals that were HEV positive at two sampling times.	55
Table 5.1. HEV ELISA results for muscle fluid and serum in each farm.	64
Table 6.1. Viraemia, faecal shedding and serological OD values in pigs inoculated intravenously from the preliminary infectivity study.	74
Table 6.2. HEV RNA detection in faeces and bile, and HEV IgG presence (OD values) in orally inoculated and contact sentinel pigs showing evidence of infection during the experimental period.	76

1. Introducció

1.1 Història del virus de l'hepatitis E

Les hepatitis virals humanes són un important problema de salut pública a nivell mundial. La infecció és causada per cinc virus humans taxonòmicament no relacionats, anomenats: virus de l'hepatitis A (VHA), virus de l'hepatitis B (VHB), virus de l'hepatitis C (VHC), virus de l'hepatitis D (VHD) i virus de l'hepatitis E (VHE). L'hepatitis o inflamació del fetge és l'única característica que els agrupa ja que difereixen força quant a l'organització genòmica, la família viral, la mida de partícula, les taxes de mortalitat i la manifestació aguda o crònica de la malaltia. Si bé l'hepatitis A i E es transmeten principalment per la ingestió d'aigua o aliments amb contaminació fecal, les hepatitis B, C i D normalment són resultat de contactes parenterals amb fluids d'individus infectats. Aquestes tres últimes normalment s'associen a un curs crònic de la malaltia mentre que la A i la E són de manifestació aguda (revisat per Aguilera Guirao et al., 2007).

Les hepatitis causades pels virus A i E són indiferenciables sense l'ajuda de tècniques laboratorials. Ambdues donen lloc a una infecció aguda, autolimitant que pot variar en gravetat des d'una hepatitis inaparent fins a una de fulminant. Tanmateix, els estudis seroepidemiològics mostren algunes diferències quant a l'edat i la mortalitat en certs sectors de la població. Mentre que el VHA s'adquireix majoritàriament durant l'infantesa, el VHE ho fa durant la joventut (revisat per Aguilera Guirao et al., 2007). A més a més, la infecció pel VHE és més greu especialment entre les dones embarassades, arribant a taxes de mortalitat del 20% (Khuroo and Kamili, 2003; Kumar et al., 2004).

Fins a finals dels anys 80, tots els casos d'hepatitis aguda d'origen víric que es donaven als països subdesenvolupats s'atribuïen al virus de l'hepatitis A. El fet d'atribuir-ho tot al VHA era perquè no es coneixia l'existència de cap altre agent causal que provoqués brots epidèmics associats a la ingestió d'aigua contaminada fecalment. La primera evidència de l'existència de l'HE va sorgir a partir de l'epidèmia que hi va haver a Nova Delhi (Índia) entre els anys 1955 i 1956 amb més de 30.000 casos registrats. Estudis posteriors van poder demostrar que les persones afectades, tant en aquesta epidèmia com en d'altres, no s'havien infectat recentment pel VHA (Khuroo, 1980; Wong et al., 1980) i s'anomenà al nou virus hepatitis no-A/no-B de transmissió entèrica (ET-NANBH: *enterically transmitted non-A non-B hepatitis*).

Degut a l'escassa quantitat de virus present a les femtes dels individus infectats, resultava impossible poder visualitzar el nou agent a través del microscopi electrònic. No fou fins l'any 1983 quan un viròleg soviètic, el Dr. Mikhail Balayan, va aconseguir reproduir en ell mateix la malaltia i visualitzar unes partícules víriques esfèriques de 27-30 nm de diàmetre mitjançant microscòpia electrònica. A més, el pacient no va produir anticossos enfront el VHA i el VHB al llarg de la infecció. La malaltia es va poder reproduir amb èxit a l'inocular les suspensions fecals del pacient a primats no-humans (*Macaca fascicularis*) (Balayan et al., 1983).

Anys més tard es va poder clonar, primer parcialment (Reyes et al., 1990) i després completament (Tam et al., 1991), l'agent responsable de la ET-NANBH, que va ser anomenat oficialment virus de l'hepatitis E pel "International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV). El desenvolupament de tècniques diagnòstiques va poder demostrar que el VHE era la causa principal d'hepatitis agudes entre els adults del sud-est i centre asiàtic així com la segona causa d'hepatitis, després del VHB al mitjà est i nord d'Àfrica. Primerament es va pensar que l'hepatitis E era una malaltia emergent pel fet que no es tenien evidències de la seva existència fins a mitjans del segle XX. No obstant, es creu que moltes de les epidèmies d'hepatitis entèriques de transmissió feco-hídrica produïdes a Europa i Estats Units a finals del segle XIX, associades a una alta mortalitat entre les embarassades, eren degudes a aquesta forma d'hepatitis (revisat per Purcell i Emerson, 2008). El moment exacte de l'aparició de l'hepatitis E, però, encara segueix sent desconegut.

D'ençà del seu descobriment es van documentar diverses epidèmies a països subdesenvolupats per la qual cosa es creia que el VHE era exclusiu d'aquestes regions (revisat per Irshad, 1999). Els casos esporàdics que es registraven a països industrialitzats eren tan sols en persones que havien viatjat a països endèmics. Kwo et al. (1997) identificaren per primer vegada una nova soca del VHE a un pacient d'Estats Units sense historial previ d'haver viatjat a algun país subdesenvolupat. La nova soca a més, era força diferent genèticament de les aïllades a Myanmar (Burma B1 i B2) i Mèxic (Mex-14). Tot semblava indicar que existia alguna diferència entre el VHE que circulava als països endèmics provocant grans epidèmies d'hepatitis aguda i els casos esporàdics dels països considerats fins al moment no endèmics. Era difícil d'imaginar la via de transmissió del VHE en països a on les bones condicions

sanitàries dificultaven una transmissió a través d'aigües contaminades. És per això que es començà a sospitar de l'existència d'un possible reservori animal.

L'any 1995, Clayson et al. (1995) detectaren i seqüenciaren parcialment soques del VHE en porcs infectats de forma natural. No fou fins dos anys després que s'aconseguí seqüenciar totalment la primera soca porcina del VHE a Estats Units, estretament relacionada amb el VHE d'origen humà aïllat anteriorment en el mateix país (Meng et al., 1997). Seguint els postulats de Koch, la reproducció experimental de la infecció i posterior aïllament del virus en porcs lliures de patògens específics (SPF) demostrà l'existència d'un nou virus en l'espècie porcina (Meng et al., 1998a). Posteriorment, nombrosos estudis han demostrat la presència del VHE porcí en molts països així com també la seva presència en altres espècies animals com els porcs senglars, cérvols i pollastres (Haqshenas et al., 2001; Tei et al., 2003; Sonoda et al., 2004). En tots els països les soques porcines i humanes del VHE estan més estretament relacionades entre elles que les soques del VHE humanes de diferents zones geogràfiques (Huang et al., 2002a). L'origen exacte del VHE en els animals és desconegut, tot i que s'ha demostrat l'existència de porcs infectats a l'Índia d'ençà dels anys 80 (Arankalle et al., 2003).

L'alta seroprevalença trobada en la població porcina, tant de països a on el VHE és endèmic a la població humana com si no ho és, ha fet augmentar les sospites que l'hepatitis E pugui ser una zoonosi. De fet, diferents evidències sustenten aquesta hipòtesi: a) soques porcines poden infectar primats no humans i els porcs poden infectar-se a partir de soques humanes (Meng et al., 1998b; Halbur et al., 2001); b) persones en contacte directe amb porcs tenen un risc més elevat de desenvolupar anticossos enfront el VHE (Meng et al., 2002; Galiana et al., 2008); i c) diversos casos han demostrat la transmissió del VHE pel consum de productes de cérvol o porc senglar cuinats a baixes temperatures (Tei et al., 2003; Li et al., 2005b).

Diversos estudis han demostrat la presència d'anticossos anti-HEV en altres espècies animals: monos (Hirano et al., 2003), rates (Kabrane-Lazizi et al., 1999), gats (Mochizuki et al., 2006), remugants (vaques, ovelles, cabres i cérvols) (Meng, 2000; Sonoda et al., 2004), cavalls (Saad et al., 2007), porc senglars (de Deus et al., 2008b), mangostes (Nakamura et al., 2006) i pollastres (Huang et al., 2002b). L'ARN viral però només s'ha pogut detectar en algunes espècies: cavalls, porcs senglars, cérvols, mangostes i pollastres (Payne et al., 1999; Sonoda et

al., 2004; Nakamura et al., 2006; Saad et al., 2007; Martelli et al., 2008). A la Xina, recentment s'ha detectat en conills de granja la presència tant d'anticossos com d'ARN víric. La soca aïllada té un percentatge força elevat de divergència nucleotídica respecte als 4 genotips de mamífer i al d'aviar, cosa que podria representar un nou genotip del VHE (Zhao et al., 2009).

A Espanya concretament, s'ha detectat la presència del virus o d'anticossos tant en humans, com en animals: porcs domèstics i senglars, pollastres, remugants i gats (Buti et al., 1995; de Deus et al., 2007 i 2008b; Peralta et al., 2009b). També s'ha detectat en fosses de purins i en aigües residuals urbanes de l'àrea metropolitana de Barcelona (Pina et al., 1998; Pina et al., 2000; Clemente-Casares et al., 2003; Fernández-Barredo et al., 2006). Un estudi recent ha demostrat que el VHE és present en el 35% de mostres d'aigües residuals urbanes de l'est d'Espanya (Barcelona i València), sent el virus entèric causant d'hepatitis més freqüent detectat en aquest tipus de mostres (Rodríguez-Manzano et al., 2008). Encara que els casos d'hepatitis E es donen de forma esporàdica (<2 casos anuals a la l'Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona)¹, la proporció d'individus sans amb anticossos enfront el VHE és relativament alta, podent arribar fins a un 7.3% (Buti et al., 2006). A més, s'ha demostrat que les seqüències aïllades de casos d'hepatitis E humanes tenen una alta similitud amb els aïllats porcins (Clemente-Casares et al., 2003).

1.2 L'agent etiològic

1.2.1 Classificació taxonòmica

La primera vegada que l'agent causant de les ET-NANBH es va observar per microscopi electrònic (Balayan et al., 1983) fou classificat dintre de la família *Caliciviridae*, basant-se amb la seva morfologia superficial i organització genòmica (Cubitt et al., 1995). Estudis posteriors basats en l'anàlisi de les regions helicasa i polimerasa de la regió no estructural del gen, exclogueren el VHE de la família *Caliciviridae* (Berke i Matson, 2000). Finalment, es reclassificà i passà a ser l'únic membre del gènere *Hepevirus* dintre de la família *Hepeviridae* (Emerson et

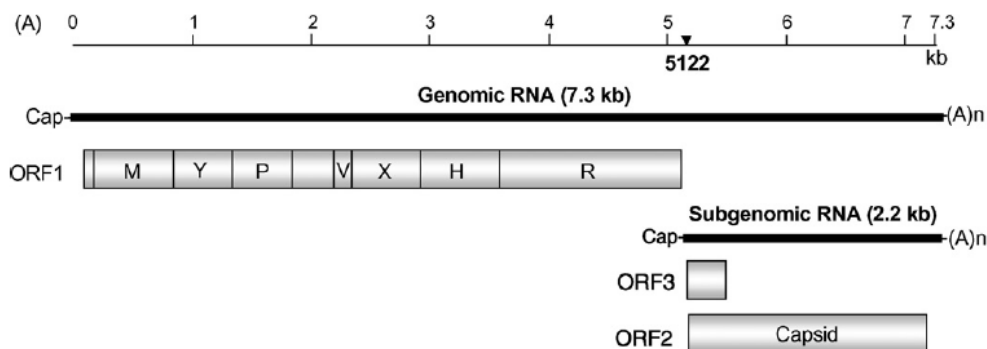
¹ Dra Maria Buti, comunicació personal

al., 2004; Meng, 2008). Recentment s'ha proposat atorgar rang d'espècie al virus de l'hepatitis E aviar (Emerson et al., 2004).

1.2.2 Organització genòmica i replicació

El VHE és un virus petit, sense embolcall d'uns 30 nm de diàmetre. La càpsula viral té simetria icosaèdrica i està formada per 60 còpies d'una única proteïna, l'ORF2 ("open reading frame": fragments de lectura oberta). Aquesta càpsula conté una sola molècula d'ARN de cadena simple de polaritat positiva d'aproximadament 7.2 kilobases (Kb). El genoma conté a l'extrem 5' una estructura de tipus *cap* seguit d'una regió no codificant de 25 nucleòtids (nt), tres fragments de lectura oberta (ORFs: ORF1, ORF2 i ORF3) i una regió curta no codificant de longitud variable a l'extrem 3', seguit d'una cua de poli-A (Tam et al., 1991). El VHE porcí presenta la mateixa estructura genòmica que el VHE humà (Mushahwar, 2008).

Figura 1.1. Organització genòmica del VHE. Extret de Okamoto, 2007 amb el permís de l'autor.



L'ORF1 situat a l'extrem 5' medeix uns 5 Kb i codifica una proteïna no estructural formada per diferents dominis implicats en la síntesi de l'ARN, entre ells: metiltransferasa, cisteïna-proteasa semblant a la papaïna, helicasa i ARN polimerasa dependent d'ARN. L'ORF2, d'aproximadament 2 Kb, està situat a l'extrem 3' i codifica la càpsula viral que conté epítops immunogènics, indueix anticossos neutralitzants i representa una regió diana pel desenvolupament de vacunes (Meng, 2009). Finalment, l'ORF3 medeix només 372 bases i es solapa parcialment amb l'ORF2. Codifica una fosfoproteïna que interacciona tant amb la proteïna de la càpsida com també amb diverses proteïnes cel·lulars i amb els microtúbuls,

creant un ambient favorable per la replicació viral (Tyagi et al., 2002; Chandra et al., 2008; Kannan et al., 2009). Recentment s'ha demostrat que el VHE està sotmès a una microevolució negativa en les regions ORF1 i ORF2 i positiva a l'ORF3. El domini de canvis sinònims/silenciosos (pressió negativa) en el genoma del VHE facilitaria el manteniment d'aquelles parts essencials per a la viabilitat del virus (Peralta et al., 2009c).

Encara no es coneix amb precisió el mecanisme exacte de replicació, transcripció i traducció del VHE a causa principalment de la manca d'un cultiu cel·lular eficient per al creixement d'aquest virus. Malgrat que la replicació del VHE s'hagi descrit en diferents línies cel·lulars: cèl·lules FRhK ("female rhesus kidney": ronyó de femella de mico) (Kazachkov Yu et al., 1992), cèl·lules diploides 2BS de pulmó embrionari (Huang et al., 1992b), cèl·lules A549 de carcinoma pulmonar humà (Huang et al., 1995) i hepatòcits de mico prèviament infectats pel VHE (Tam et al., 1996), tots els cultius han tingut una producció de virus molt escassa i per tant ineficient per considerar-los com a tècnica de rutina.

Recentment s'ha demostrat que el virus podria entrar a la cèl·lula mitjançant el pèptid p239 situat a la regió ORF2 del virus, ja que un cop aquest pèptid s'ha unit i penetrat a la cèl·lula és capaç d'inhibir futures infeccions pel VHE. Es creu, però, que hi ha més receptors implicats en l'entrada del virus a la cèl·lula (He et al., 2008). Un cop el virus hauria penetrat, es desencapsularia i l'ARN viral es traduiria al citoplasma de la cèl·lula infectada generant la proteïna no estructural codificada per l'ORF1. Tot seguit, l'helicasa viral situada a l'ORF1 replicaria la cadena positiva del virus en una de negativa intermediària que serviria de motlle tant per la síntesi de noves còpies de la cadena positiva com per la producció de cadenes positives subgenòmiques. Les proteïnes estructurals es traduirien a partir d'aquests cadenes d'ARN subgenòmic. Graff et al. (2006) demostraren que les proteïnes ORF3 i ORF2 es produïen a partir d'un únic ARN subgenòmic de 2.2 Kb bicistrònic, i que ambdues tenien la mateixa mida (ORF3: 112.114 aminoàcids (aa), ORF2: 658-660 aa) en tots els genotips. Finalment, les proteïnes de la càpsida empaquetarien el genoma viral produint nous virions que sortirien de la cèl·lula per mecanismes encara avui desconeguts. Encara que es creu que els hepatòcits són el primer lloc de replicació del VHE, també s'ha detectat la cadena negativa, signe de

replicació viral, en altres teixits com les tonsil·les, intestins i limfonodes de porcs infectats experimentalment (Williams et al., 2001).

1.2.3 Propietats víriques

S'ha demostrat que el VHE és sensible a processos de congelació/descongelació, a l'acció de diversos desinfectants i a altes concentracions salines (Krawczynski, 1993; Emerson et al., 2005). En canvi, és resistent a canvis de pH, a la radiació solar i a la dessecació (Balayan, 1997). Quan se sotmet a una temperatura de 56°C, el virus perd el 50% d'activitat i el 100% si se sotmet a 60°C, sent un virus més sensible que el VHA (Emerson et al., 2005). Per la importància que pot arribar a tenir el VHE com a possible zoonosi alimentària, cal tenir en compte que 60°C és una temperatura superior als 57°C que té un bistec poc fet (“volta i volta”) com a temperatura interna. De la mateixa manera, Feagins et al., (2008) demostraren que coent correctament fetges de porc durant 5 minuts, ja fos fregits a una temperatura de 191°C (temperatura interna de 71°C) o bé bullits, el VHE perdia totalment la seva infectivitat. Ara bé, si s'incubaven els homogenats de fetge a 56°C durant 1 hora era possible reproduir la infecció en porcs inoculats intravenosament.

1.2.4 Variabilitat genètica i distribució geogràfica

Encara que la seqüència genòmica del VHE és relativament estable (Yin et al., 1993), s'ha demostrat que els aïllats de diferents regions geogràfiques presenten seqüències genòmiques diferents (Yin et al., 1994). Degut a aquesta heterogeneïtat, el VHE s'ha classificat en 4 genotips diferents, presentant unes diferències genètiques de l'ordre del 20% entre ells (Lu et al., 2006). El genotip 1 és la causa principal de les hepatitis E que es presenten tant de forma epidèmica com de forma esporàdica a l'Àfrica, Àsia i sud Amèrica (Arankalle et al., 1999). El genotipus 2 inclou els aïllats de Mèxic i Àfrica (Txad i Nigèria) i causa principalment brots epidèmics (Huang et al., 1992a; Buisson et al., 2000). El genotip 3 està àmpliament distribuït i s'ha aïllat en casos esporàdics d'hepatitis E a països desenvolupats i/o en porcs domèstics de molts països (Kwo et al., 1997; Buti et al., 2004; Okamoto, 2007). Finalment, el genotip 4 s'ha trobat a regions industrialitzades del Japó, Xina i Taiwan, així com també en la població porcina d'aquests països i de l'Índia (Wang et al., 1999) (taula 1.1). Així doncs, tots els aïllats de VHE porcins s'engloben dintre els genotips 3 i 4, encara que recentment s'hagi aïllat una

Taula 1.1. Distribució geogràfica dels genotips i subtipus de VHE (adaptat de Lu et al., 2006 i Okamoto, 2007).

Regió/País	Humà				Porcí				Altres espècies			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Àfrica												
Algèria	d, e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Djibouti	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Egipte	e	x	x	-	-	-	-	-	x ⁴	-	-	-
Marroc	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Namíbia	e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nigèria	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
República Centreafricana	e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
República Democràtica del Congo	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sud-àfrica	-	-	-	-	-	-	-	-	x ⁵	-	-	-
Sudan	-	-	-	-	-	-	-	-	e ⁷	-	-	-
Tunísia	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Txad	-	-	-	-	-	-	-	-	e ⁷	e ⁷	-	-
Amèrica												
Argentina	-	-	i	-	-	-	i	-	-	-	-	-
Canadà	-	-	-	-	-	-	j	-	-	-	-	-
Costa Rica	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-
Estats Units	-	-	a	-	-	-	a, x	-	-	-	a ¹	-
Mèxic	-	a	-	-	-	-	j	-	-	-	-	-
Àsia												
Bangladesh	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cambodja	x	-	x	-	x	-	x	-	-	-	x ⁵	-
Corea	-	-	a	-	-	-	a	-	-	-	-	-
Índia	a, c	-	-	-	-	-	-	e	-	-	-	-
Indonèsia	-	-	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-
Japó	a, c	-	a, b, e, f	b, c, f	-	-	a, b, e	c	-	-	x ⁶	-
Kirguizistan	c	-	-	-	-	-	g	-	-	-	-	-
Myanmar	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Birmània)												
Nepal	a, c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pakistan	a	-	-	-	-	-	-	-	b ²	-	-	-
Tailàndia	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-
Taiwan	-	-	-	a, b	-	-	d	a, b	-	-	-	-
Uzbekistan	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vietnam	a	-	-	b, f	-	-	-	-	-	-	-	-
Xina	b, c	-	-	a, b, c, d, g	-	-	-	a, b, c, d	-	-	-	-
Europa												
Alemanya	-	-	f	-	-	-	i, h, f, e	-	-	-	-	-
Àustria	-	-	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espanya	a, e	-	f	x	-	-	e, f	-	a ¹	-	a ¹ , f ¹	-
Finlàndia	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-
França	-	-	f	-	-	-	e, f	-	-	-	e ¹	-
Grècia	-	-	e, f	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hongria	x	-	x	-	-	-	x	-	-	-	x ³	-
Itàlia	-	-	h	-	-	-	x	-	-	-	-	-
Països Baixos	-	-	x	-	-	-	a, c, f	-	-	-	-	-
Regne Unit	-	-	e, x	-	-	-	e, x	-	-	-	x ¹	-
Rússia	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oceania												
Austràlia	-	-	-	-	-	-	j	-	-	-	-	-
Nova Zelanda	-	-	x	-	-	-	h	-	-	-	-	-

Genotips: 1, 2, 3 i 4; Subtipus: 1 (1a, 1b, 1c, 1d i 1e), 2 (2a i 2b), 3 (3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i i 3j) i 4 (4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f i 4g). L' "x" indica que el subtipus encara no s'ha identificat.

¹Aigües residuals o purins; ²Macaco; ³Cérvol; ⁴Cavall; ⁵Riu; ⁶Mangosta; ⁷No conegut

soca de genotip 1 a un porc de Cambotja (Àsia) (Caron et al., 2006). Tot i la gran diversitat genotípica, sembla que existeixi un únic serotip per a totes les soques de mamífer. Per al virus aviar, encara que alguns autors hagin demostrat l'existència d'epítops antigènics comuns entre els dos virus (Haqshenas et al., 2002; Guo et al., 2006), un estudi recent a on es comparà un antigen de VHE d'origen porcí amb un d'origen aviar demostrava que aquesta reactivitat creuada era limitada (Peralta et al., 2009a).

Dintre de cada genotip existeix una variabilitat nucleotídica força elevada: 11.8% pel genotip 1; de 0 a 19.3% pel genotip 3 i de 0.1 a 17.0% pel genotip 4. Pel genotip 2 s'han comparat seqüències parcials de l'aïllat de Mèxic i Àfrica mostrant una diversitat nucleotídica d'entre el 10.3 i 16.8%. Aquesta variabilitat intra-genotip descrita per Okamoto (2007) corrobora la classificació en subtipus que Lu et al. (2006) ha fet recentment, ja que el genotips 3 i 4 són els que presenten major diversitat. Pel genotip 1 s'han descrit 5 subtipus (1a, 1b, 1c, 1d i 1e); pel genotipus 2, 2 subtipus (2a i 2b); 10 pel genotip 3 (3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i i 3j) i 7 pel genotip 4 (4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f i 4g). Cal tenir present que aquesta classificació pot variar segons el mètode de filogènia utilitzat (Lu et al., 2006) (taula 1.1).

1.3 Epidemiologia

1.3.1 Epidemiologia humana

L'hepatitis E és endèmica en la majoria de països de l'Àfrica, Àsia i també a Mèxic. Es presenta en forma de casos esporàdics, sent responsable de fins el 50-70% de les hepatitis agudes esporàdiques a l'Índia (Aggarwal and Krawczynski, 2000), i en forma de grans epidèmies freqüentment associades a la contaminació d'aigua potable. Aquestes epidèmies poden arribar a tenir una gran magnitud, com el darrer cas a Uganda que s'inicià l'any 2007 amb un total de 8921 casos i 132 morts². En els països d'Europa i Amèrica del nord, l'hepatitis E és presenta tan sols en forma de casos esporàdics. Tan en països endèmics com no endèmics, les infeccions asimptomàtics d'hepatitis E són força freqüents (Ippagunta et al., 2007).

² Organització Mundial de la Salut.

http://www.who.int/hac/crises/uga/sitreps/uganda_hepatitis_e_10nov2008.pdf (consultat 9 setembre 2009)

El percentatge de població seropositiva enfront el VHE en una àrea determinada aporta informació sobre la freqüència i moment de la infecció en aquestes zones (taula 1.2). En països endèmics, la proporció de persones seropositives pot arribar a ser d'entre el 15 i 60% (Dalton et al., 2008), sent més elevat en joves adults que en nens. El pic d'incidència de casos d'HE és força semblant, afectant principalment a persones d'entre 15 i 35 anys (Panda et al., 2007). Aquest patró es presenta tan en brots esporàdics com durant les epidèmies. Als països industrialitzats les prevalences es mouen entre el 2 i el 14% i incrementen notablement amb l'edat (Ijaz et al., 2009), afectant normalment persones d'entre 40 i 50 anys (Mansuy et al., 2004; Mateos et al., 2006; Norder et al., 2009). Aquesta seroprevalença però és molt més alta del que es podria esperar en zones a on els casos d'hepatitis E són relativament poc freqüents (Buti et al., 2006). Un alt percentatge d'infeccions subclíniques, un mal diagnòstic de les hepatitis víriques o bé un test d'ELISA de baixa especificitat podrien explicar aquest fenomen (Emerson and Purcell, 2003; Dalton et al., 2008). Les dues primeres hipòtesis semblen les més probables ja que fa uns anys no es coneixia l'existència d'aquest virus com a possible causant d'hepatitis aguda i d'altra banda, s'ha demostrat que els tests d'ELISA per a la detecció d'anticossos en humans tenen una especificitat relativament bona (Mast et al., 1998).

Taula 1.2. Principals diferències dels patrons epidemiològics humans del virus de l'hepatitis E.

	Zones Endèmiques	Zones No-Endèmiques
Presentació	-Epidèmies -Casos esporàdics -Infeccions subclíniques	-Casos esporàdics -Infeccions subclíniques
Genotips predominats	1, 2 i 4 (Xina) ¹	3 i 4
Incidència (casos/any)	-Epidèmia: 1-15% població -Casos esporàdics: 30-60% casos d'hepatitis	-Casos esporàdics: 1-3%
Condicions sanitàries	Deficients	Adequades
Vies de transmissió	Fecal-oral	Per determinar (alimentàries, aigües, etc.)
Reservori	Humans ²	Animals

¹A Xina el genotip 4 és el dominant i sembla que el porc n'és el principal reservori (Zheng et al., 2006)

²Aigües residuals contaminades per femtes humanes (a partir d'infeccions esporàdiques o asimptomàtiques)

Tot sembla indicar que els dos patrons epidemiològics descrits siguin conseqüència del genotip d'HEV predominant a cada zona. A les zones endèmiques, els genotips 1 i 2 són els que més freqüentment s'aïllen dels casos en humans, encara que els genotips 3 i 4 també

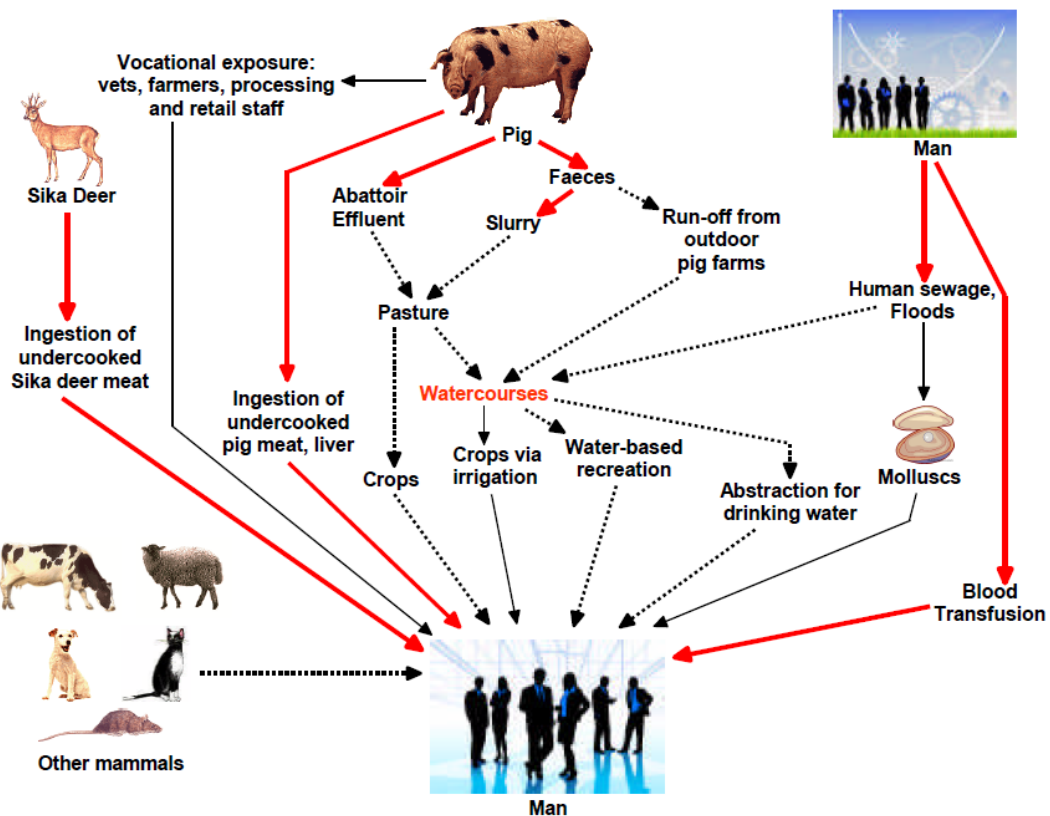
estiguin presents a la població porcina (Arankalle et al., 2002). En aquestes zones la via de transmissió més freqüent és la fecal-oral a través d'aigües contaminades. És per això que les grans epidèmies sovint estan relacionades amb fortes pluges monsoniques o amb aglomeracions de persones com els camps de refugiats, a on les condicions sanitàries deficientes faciliten una ràpida propagació de la infecció. En canvi, a les zones no endèmiques, a on els genotips 1 i 2 no són presents o és difícil el seu manteniment a l'ambient, els genotips 3 i 4 són els responsables dels casos esporàdics d'HEV. Tot això suggereix que la relativa alta seroprevalença és resultat d'infeccions inaparents amb soques de virus aparentment menys virulentes derivades del porc o d'altres animals domèstics o salvatges i que, només de forma ocasional, poden arribar a donar simptomatologia clínica (Meng et al., 1998b; Chandra et al., 2008; Purcell and Emerson, 2008).

Així com en els països en vies de desenvolupament la via de transmissió del VHE és la fecal-oral, actualment encara no es coneix amb exactitud l'origen i la via de transmissió en els països industrialitzats. Al Japó per exemple, les millores higiènico-sanitàries dels últims anys han disminuït el nombre de casos d'hepatitis A, però en canvi no ho han fet els d'hepatitis E, suggerint que, a part de la fecal-oral, hi ha altres rutes de transmissió per aquest virus (Inoue et al., 2009). La figura 1.2 mostra les rutes de transmissió confirmades, sospitoses i potencials del VHE a les zones considerades no endèmiques.

La confirmació i sospita d'alguns casos de transmissió del VHE a través de carn o despulles infectades provinents de porc domèstic, porc senglar o cérvol ha augmentat recentment l'alerta als països industrialitzats com a possible risc per la cadena alimentària. De fet, la prova més evident d'aquest tipus de transmissió l'aporten dos casos d'infecció pel VHE al Japó associats al consum de carn crua o poc cuinada de porc senglar i cérvol. En ambdós casos, l'anàlisi de les seqüències del VHE obtingudes dels pacients i de la carn mostraren, en la majoria dels casos, un 100% d'homologia genòmica (Tei et al., 2003; Li et al., 2005b). Altres casos d'hepatitis E s'han associat al consum de carn infectada, encara que no s'ha pogut demostrar exactament en no disposar d'una mostra de la carn consumida (Matsuda et al., 2003; Mizuo et al., 2005; Deest et al., 2007). D'altra banda, en molts països s'ha observat la presència del virus en fetges de porc a l'escorxador (Banks et al., 2007; Bouwknegt et al., 2007; Feagins et al., 2007; Wang et al., 2007). El consum de marisc o vegetals mal rentats es

creu que també pot portar a l'aparició d'alguns brots de VHE (Ishikawa et al., 1995; Cacopardo et al., 1997). S'ha suggerit que els conreus propers a granges porcines podrien contaminar-se a partir dels purins mal filtrats i d'aquesta manera contaminar-se els vegetals destinats al consum (Smith, 2001; Kasorndorkbua et al., 2005; McCreary et al., 2008; Kase et al., 2009).

Figura 1.2. Rutes de transmissió confirmades (línies vermelles), sospitoses (línies negres) i potencials (línies discontinües) del VHE a les zones considerades no endèmiques. Extret de Dalton et al., 2008 amb el permís de Malcolm Banks, coautor de l'article.



Diferents estudis han demostrat que les persones que per motius laborals estan més en contacte amb porcs poden arribar a tenir fins a 5 vegades més probabilitat de ser seropositius enfront el VHE que la resta de població (Withers et al., 2002; Galiana et al., 2008). Alhora, també s'han descrit casos de persones infectades probablement degut a la manipulació de vísceres o carn de porcs infectats (Jary, 2005; Pérez-Gracia et al., 2007). Finalment, cal estudiar amb més profunditat el possible risc que suposaria el trasplantament a humans d'òrgans de porcs infectats pel VHE (Meng, 2009).

1.3.2 Epidemiologia porcina

Després de la primera descripció del VHE porcí l'any 1997 a Estats Units (Meng et al., 1997), s'han dut a terme nombrosos estudis per tal de detectar el VHE en mostres porcines de diferents països. Actualment se sap que la infecció està present a Amèrica (Meng et al., 1999; Pei and Yoo, 2002; Cooper et al., 2005; Munne et al., 2006), Europa (van der Poel et al., 2001; Clemente-Casares et al., 2003; Banks et al., 2004a; Di Bartolo et al., 2008; Vasickova et al., 2009), Àsia (Hsieh et al., 1999; Okamoto et al., 2001; Zheng et al., 2006) i Oceania (Chandler et al., 1999; Garkavenko et al., 2001) (taula 1.1). Sembla doncs que es tracti d'una infecció ubiqua a la població porcina de tot el món, tant en països subdesenvolupats com desenvolupats, independentment de si el VHE és endèmic o no a la població humana del país (Meng i Halbur, 2006). A més a més, els estudis epidemiològics han demostrat que, quan la infecció està present a una zona, les prevalences poden arribar fins al 97% de granges infectades (Seminati et al., 2008) (taula 1.3).

Taula 1.3. Prevalences d'IgG anti-HEV en porcs de diferents països.

Regió/País	Nº positius/testats	% positius	Referència
Alemanya	37/50	74	Hartmann et al., 1998
Argentina	22/97	22.7	Munné et al., 2006
Brasil	227/357	63.6	Vitral et al., 2005
Canadà	594/998	59.5	Yoo et al., 2001
Xina	22/82	25.0	Meng et al., 1999
Espanya	184/439	41.9	Seminati et al., 2008
Estats Units	202/293	68.9	Meng et al., 1997
Nova Zelanda	54/72	75	Garkavenko et al., 2001
Països Baixos	8/34	23.5	Banks et al., 2004b
Regne Unit	219/256	85.5	Banks et al., 2004b
Suècia	118/204	58	Banks et al., 2004b

La dinàmica d'infecció del VHE a una granja és molt similar a la d'altres infeccions víriques del porc (de Deus et al., 2008a). La infecció, que és de presentació subclínica en aquesta espècie, generalment es dona entre les 8-12 setmanes de vida, coincidint amb la pèrdua de la immunitat materna, que dura aproximadament 8 setmanes (Meng i Halbur, 2006). Aquesta pèrdua d'anticossos coincideix amb el pas dels animals a les sales de transició i, més tard, a les d'engreix, a on la barreja i l'augment de densitat d'animals permet una ràpida disseminació del virus arribant a infectar tots els animals d'un mateix lot (Leblanc et al., 2007). D'aquesta

manera, en el moment del sacrifici, gairebé tots els animals han seroconvertit. És doncs a finals de transició/principis d'engreix a on els animals comencen a excretar virus en femtes i són virèmics. La taula 1.4 i la figura 1.3 mostren els resultats de diferents estudis en referència als percentatges d'animals infectats en cada una de les fases de producció. Cal tenir en compte que les variacions entre estudis poden dependre de nombrosos factors: edat exacta dels animals en el moment del mostreig, dinàmica d'infecció a la granja, tècniques de diagnòstic utilitzades, etc.

Probablement, la ruta de transmissió en el porc també sigui la fecal-oral. Diferents evidències corroboren aquesta hipòtesi: 1) durant el període d'excreció els títols virals en femtes poden arribar als 10^6 equivalents de genoma (GEs)/ml (Meng et al., 1998b) i 2) s'ha estimat que la R_0 o taxa bàsica de reproducció és de 8.8, molt elevada comparada amb altres virus com el de la influença humana ($R_0= 2-3$) (Mills et al., 2004; Bouwknecht et al., 2008a). Les dificultats per poder reproduir de manera experimental el VHE en porcs inoculats oralment (Kasorndorkbua et al., 2004) ha suggerit que hi poden haver altres rutes de transmissió com el contacte directe amb l'orina d'animals infectats (Bouwknegt et al., 2009).

Alguns estudis han descrit un percentatge força elevat de truges excretores fins i tot durant la lactació (taula 1.4 i figura 1.3). El fet que un animal, que teòricament ja ha passat la infecció i sigui positiu a IgG anti-VHE, pugui tornar a infectar-se podria ser conseqüència d'una reactivació de la replicació del virus per l'estrès del part (Fernandez-Barredo et al., 2007); d'una major susceptibilitat de les mares a infeccions a partir de les femtes dels garrins (McCreary et al., 2008); o contínues reinfeccions afavorides per una curta durada de la immunitat i l'entrada de noves variants del virus (Di Bartolo et al., 2008). La transmissió de la mare als garrins, ja sigui de manera horitzontal o bé vertical, podria ser un dels mecanismes que el VHE utilitzaria per mantenir-se en una granja al llarg dels anys. Leblanc et al., (2007) descriviren que alguns animals podrien actuar com a reservori del virus a l'explotació, ja que trobaren fins a un 17% d'animals que excretaven el virus però no desenvolupaven una resposta serològica. Finalment, diferents treballs expliquen que una aplicació correcta de les mesures de bioseguretat, com un maneig tot dins tot fora estricte o una neteja exhaustiva de les naus, redueix substancialment la pressió d'infecció del VHE (Wu et al., 2002; Nakai et al.,

Taula 1.4. Detecció de l'ARN del VHE en sèrum i femta en les diferents fases del cicle productiu.

País (nº granges)	Porcs positius/testats (%)										Referència	
	Lactació (0-3 setmanes)		Transició (4-8 setmanes)		Engreix I (9-18 setmanes)		Engreix II (19-24 setmanes)		Truges			
	Sèrum	Femtes	Sèrum	Femtes	Sèrum	Femtes	Sèrum	Femtes	Sèrum	Femtes		
Espanya												
València (21)	-	2/18 (11.1)	-	10/24 (41.7)	-	12/40 (60.0)	-	2/28 (7.1)	-	7/32 (21.9) ¹	Fernández-Barredo et al., 2006	
Catalunya (1)	0/19 (0)	0/8 (0)	4/6 (66.7)	5/5 (100)	13/15 (86.7)	2/10 (40.0)	0/10 (0)	0/5 (0)	1/16 (6.3)	0/13 (0)	Seminati et al., 2008	
València (21)	4/20 (20.0)	2/20 (10.0)	7/22 (32.0)	9/22 (41.0)	1/20 (5.0)	2/20 (10)	2/27 (7.0)	3/27 (11.0)	2/38 (5.0) ¹	7/38 (18.0) ¹	Fernández-Barredo et al., 2007	
Catalunya (1)	1/42 (2.4)	-	0/41 (0)	-	11/26 (42.3)	-	2/16 (12.5)	-	2/13 (15.4)	-	de Deus et al., 2009	
Itàlia (6)	-	-	-	-	-	27/64 (42.2)	-	10/37 (27.0)	-	78/173 (45.1)	di Bartolo et al., 2007	
Regne Unit (10)	-	-	-	13/50 (26)	-	22/50 (44)	-	4/50 (8)	-	3/50 (6)	McCreary et al., 2008	
Canadà (1)	0/51 (0)	6/51 (11.8)	1/51 (2.0)	27/51 (52.9)	24/51 (47.1)	43/51 (84.0)	6/51 (11.8)	21/51 (41.2)	-	-	Leblanc et al., 2007	
Japó (25)	-	-	0/180 (0)	-	113/750 (15) ²	-	0/250 (0)	-	-	-	Takahashi et al., 2003	
Japó (3)	-	0/71 (0)	-	58/126 (47.9)	-	23/116 (19.8)	-	5/73 (6.9)	-	-	Nakai et al., 2006	
Korea (12)	-	9/142 (6.3)	-	23/141 (16.3)	-	54/142 (38.0)	-	-	-	13/140 (9.3)	Kim et al., 2008	
Total	5.6	6.5	20.1	46.5	34.9	42.3	6.3	14.5	8.9	16.7		

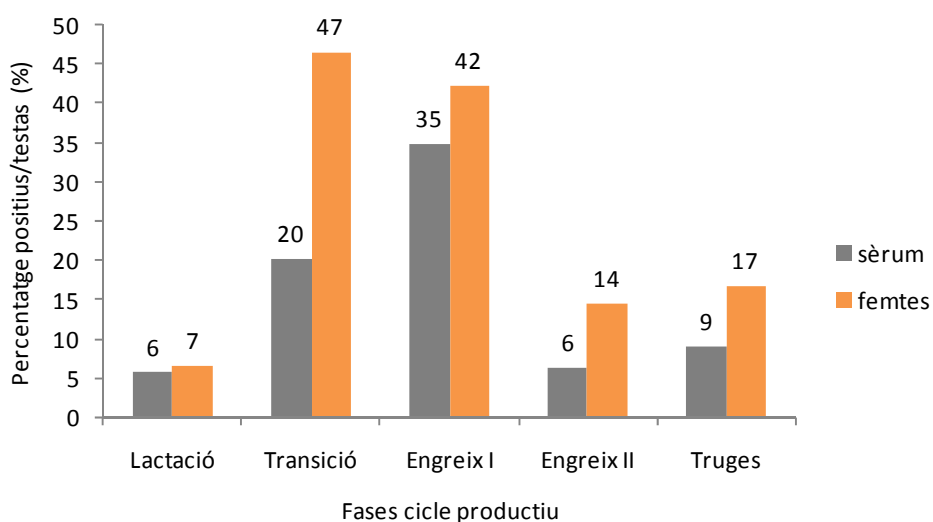
¹Lactants; ²Mostreig a les 12 i a les 16 setmanes de vida, respectivament

2006). Molt sovint aquestes mesures s'associen a explotacions més dimensionades (Di Bartolo et al., 2008; Li et al., 2009b).

La majoria de seqüències del VHE porcí pertanyen als genotips 3 i 4 (taula 1.1). S'ha demostrat que els aïllats porcins d'una zona geogràfica estan més relacionats genèticament amb els aïllats humans de la mateixa zona que no pas amb els aïllats porcins d'altres zones (Huang et al., 2002a; Okamoto, 2007). En un primer moment es pensava que en una granja només podia circular una única soca de VHE (Takahashi et al., 2003; Caprioli et al., 2007), però alguns estudis han demostrat que en una mateixa granja poden coexistir diferents variants del virus i alhora diferents explotacions compartir les mateixes soques (Munne et al., 2006; de Deus et al., 2008a; Vasickova et al., 2009).

Per poder determinar si el VHE porcí és realment un problema de salut pública, és important quantificar-ne el risc per poder aplicar en un futur les estratègies necessàries per tal de reduir-lo. Prèviament però a aquesta quantificació, cal tenir la suficient informació. Conèixer el nombre d'animals que poden arribar infectats a l'edat de sacrifici d'escorxador és una dada important que cal determinar a nivell general però també per a cada país. Tot i que en molts estudis no s'han detectat animals infectats a finals d'engreix (Takahashi et al., 2003; Seminati et al., 2008), altres detectaren fins un 14% d'animals excretors per femtes (Leblanc et al., 2007; Bouwknecht et al., 2008b).

Figura 1.3. Percentatge d'animals virèmics i excretors del VHE en cada una de les fases de producció (percentatges calculats a partir dels valors dels diferents estudis de la taula 3).



1.4 La infecció

1.4.1 Característiques clíniques

Les manifestacions de l'hepatitis E en humans comprenen diversos quadres clínics, des d'infeccions totalment asimptomàtiques a un fallada hepàtica fulminant. En els països en vies de desenvolupament el curs més freqüent de la malaltia és el d'una hepatitis aguda, caracteritzada per una fase inicial pre-ictèrica, semblant a una grip i que dura pocs dies, seguida d'una fase ictèrica. La fase pre-ictèrica es caracteritza per l'aparició de dolor abdominal, febre, nàusees i vòmits, mentre que durant la segona fase apareix icterícia, orina fosca, diarrea, femtes més clares, pruíja, hepatomegàlia i esplenomegàlia. Durant aquesta fase els nivells d'enzims hepàtics i de bilirubina en sang apareixen augmentats. La malaltia acostuma a ser autolimitant i dura entre 1 i 4 setmanes. Els canvis histopatològics solen ser els estàndards de qualsevol hepatitis: focus de necrosi amb cúmul de macròfags mononuclears, cèl·lules de Kupffer activades i infiltració limfocitària; o bé de tipus colestats: estasis biliar en els canalicles, transformació glandular dels hepatòcits, cossos acidòfils i focus de necrosi. Tot i que no s'ha demostrat que aquesta hepatitis aguda pugui evolucionar de manera crònica, alguns estudis han descrit prevalences força elevades d'anticossos anti-HEV en pacients amb malaltia hepàtica crònica (Khuroo, 1980; Kondili et al., 2006; Atiq et al., 2009). A França es va descriure, un cas d'un pacient immunodeprimit amb una infecció d'hepatitis E de fins a 4 mesos de durada (Péron et al., 2006). En alguns casos l'hepatitis E pot cursar com una hepatitis anictèrica i només desenvolupar febre (Aggarwal and Krawczynski, 2000).

En els països desenvolupats els casos d'hepatitis aguda causats pel VHE són molt poc freqüents, i es creu que moltes de les infeccions són de caràcter subclínic. En ser una malaltia dosi-dependent (Tsarev et al., 1994b), individus que estan exposats a dosis elevades del virus desenvoluparan un quadre clínic, mentre que els exposats a baixes dosis probablement només desenvoluparan una resposta immune. Una proporció molt baixa de pacients, especialment de zones pobres, manifesten la forma més greu de l'HE que pot desencadenar-se cap a una fallada hepàtica fulminant (FHF). Aquest tipus de quadre s'ha vist en pacients amb malalties concomitants (diabetis mellitus, artritis reumatoide, infart cerebral) i sobretot en dones embarassades (Kumar et al., 2004; Mizuo et al., 2005). Recentment també s'ha demostrat que

el factor genotip del VHE pot tenir un paper important en la gravetat del quadre (Okamoto, 2007).

Les dones embarassades, particularment aquelles en el segon i tercer trimestre d'embaràs, són més susceptibles a la infecció pel VHE (17% vs 2% no-embarassades) i al desenvolupament d'una FHF (22% vs 2% no-embarassades) (Khuroo et al., 1981). Alhora, tenen més risc de patir parts prematurs, pèrdues i mortalitat perinatal. La transmissió vertical pot arribar fins al 78% (Khuroo et al., 2009). Sembla ser però, que entre els afectats per una FHF, la mortalitat no és superior en dones embarassades, respecte dones no-embarassades i homes (Bhatia et al., 2008). És important destacar que aquestes altes incidències en dones embarassades només s'han documentat en els països a on es produeixen epidèmies d'HE. En els països industrialitzats només s'han reportat 2 casos en el Regne Unit de dones embarassades que patiren una FHF però que havien viatjat feia poc a l'Índia i per tant segurament s'havien infectat pel genotip 1 (Hussaini et al., 1997). A Egipte per exemple de 2428 dones embarassades, un 84.3% eren seropositives a VHE però cap d'elles desenvolupà una FHF (Stoszek et al., 2006). Tot això fa pensar que les diferències observades es puguin deure a la virulència dels diferents genotips presents a cada zona, i fins i tot s'ha suggerit que hi puguin intervenir altres factors que agreugin la malaltia en alguns col·lectius.

Les taxes de mortalitat a la població general dels països endèmics és d'un 1% i s'associa al genotip 1. Pel genotip 2 no s'ha pogut calcular ja que no s'ha donat cap cas de FHF. Dos estudis realitzats a Japó indiquen que els pacients infectats pel genotip 4 tendeixen a tenir nivells d'enzims hepàtics i bilirubina en sang més elevats, recuperar-se més lentament i ser més propensos a patir la forma severa de l'HE (Mizuo et al., 2005; Ohnishi et al., 2006). En un d'aquests estudis, un 36% dels pacients infectats pel genotip 4 desenvoluparen la forma greu de l'HE. Tots els pacients infectats pel genotip 3 tingueren una simple hepatitis aguda autolimitant (Mizuo et al., 2005).

1.4.2 Patogènia

Tot i els nombrosos estudis que s'han dut a terme en animals d'experimentació, especialment primats però també voluntaris humans, encara no es coneixen exactament els mecanismes de patogenicitat del VHE (Balayan et al., 1983; Chauhan et al., 1993). Es creu que un cop el virus

entra a l'organisme per via oral, es dirigeix cap al fetge a través de la vena porta. Existeix, però, certa controvèrsia sobre quin és el primer lloc de replicació del virus. Quan s'inoculen animals per via endovenosa, el fetge sembla ser el primer lloc de replicació (Lee et al., 2008), encara que Williams et al. (2001) descriviren que en porcs infectats amb soca humana, la cadena negativa del VHE es detectava relativament abans a l'intestí prim que al fetge. Després de la seva replicació al fetge, el virus s'acumula a la vesícula biliar i s'allibera a l'intestí i al torrent sanguini per mecanismes encara avui desconeguts. El fet que el virus s'hagi arribat a detectar en sang i femtes en períodes de fins a 16 setmanes fa plantejar la possibilitat que certs individus puguin emmagatzemar el virus durant un cert temps i ser portadors asimptomàtics del VHE (Nanda et al., 1995).

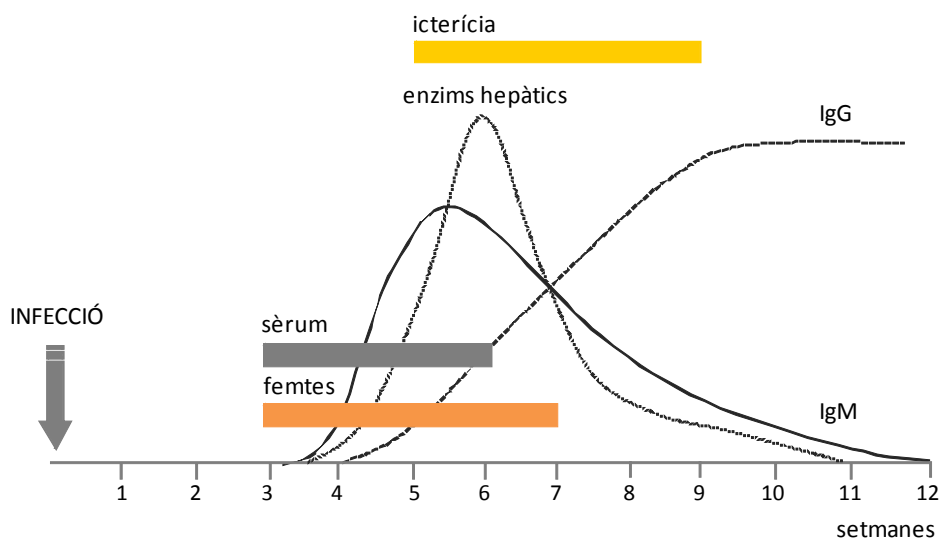
Per altra banda, recentment s'ha demostrat que la major susceptibilitat de les dones embarassades infectades a patir una FHF pot ser per culpa d'una disminució de la resposta cel·lular Th1 i/o d'un augment de les hormones esteroides que afavoreixen la replicació viral (Navaneethan et al., 2008). De fet, Kar et al. (2008) van explicar que els títols virals de VHE entre les dones embarassades amb FHF (10^4 - 10^5 unitats internacionals (IU)/ml) eren significativament superiors respecte a les no embarassades amb FHF (10^2 IU/ml).

El període d'incubació en humans sol ser de 4 setmanes, podent arribar fins a les 9 setmanes (figura 1.4). Aproximadament 1 setmana abans de l'aparició dels símptomes es pot començar a detectar el virus en femtes persistent fins a 4 setmanes després. La virèmia, tot i començar al mateix moment que l'excreció en femtes, sol durar entre 2-3 setmanes. La concentració d'enzims hepàtics augmenta fins a arribar al seu pic cap a les 5-6 setmanes postexposició. Tant la resposta humoral de tipus IgM com IgA apareix al final del període d'incubació i es pot arribar a detectar fins a 1-5 mesos després. Les IgG, en canvi, apareixen una mica més tard i poden durar molts anys (Aggarwal and Krawczynski, 2000; Dalton et al., 2008). Shata et al. (2007) senyalen que aquesta durada tan llarga, comparat amb la vida mitjana de les IgG (28 dies), podria explicar-se per repetides exposicions al virus de baixa intensitat, donant lloc a infeccions subclíniques i permetent, així, la persistència dels anticossos. Aquestes infeccions subclíniques explicarien les relatives altes seroprevalències observades en els països industrialitzats.

1.4.3 Models animals

Des de la identificació de l'agent causant de les ET-NANBH, s'han realitzat nombrosos estudis en animals per tal de conèixer i entendre millor els mecanismes d'infecció del VHE en els humans. Al principi, l'evidència d'infecció només es podia basar en el reconeixement de partícules víriques en mostres de femtes per microscòpia immunoelectrònica i en els símptomes que manifestaven. Tot i que durant els anys noranta es realitzaren algunes infeccions en porcs, rates i xais (Balayan, 1990; Usmanov et al., 1991; Karetnyi lu et al., 1993; Usmanov et., 1994), els primats no humans, especialment els *Macaca mulatta* i els *Macaca fascicularis*, han estat les espècies més utilitzades pel fet de desenvolupar un quadre clínic molt semblant al dels humans (Bradley et al., 1987). Actualment, però, encara no s'ha pogut desenvolupar un model animal que pugui reproduir la forma més severa de l'HE (FHF) ni la transmissió vertical (Tsarev et al., 1995; Kasorndorkbua et al., 2003).

Figura 1.4. Evolució esquemàtica de la infecció del VHE, mostrant la detecció de l'ARN viral en sèrum i femtes, la resposta immune i el quadre clínic.



En l'espècie porcina, el primer estudi es realitzà l'any 1990, en el qual es varen inocular 2 animals oralment amb una soca provinent d'un pacient d'una epidèmia de Rússia (Balayan,

1990) (taula 1.5). Anys més tard, es va confirmar que la soca aïllada de les femtes dels animals inoculats corresponia al genotip 3, mentre que la d'un altre pacient del mateix brot que el de l'inòcul original corresponia al genotip 1 (Lu et al., 2004). No va ser fins l'any 1998 que el grup de Meng va aconseguir infectar animals inoculats intravenosament mitjançant una soca porcina de genotip 3. Un animal en contacte amb aquests també es va poder infectar (Meng et al., 1998a). En aquest estudi però no es va poder reproduir la infecció en animals inoculats amb soques humanes del VHE. En un estudi posterior, realitzat pel mateix grup d'investigació, s'infectaren porcs amb diferents dilucions de l'inòcul per tal de poder titular el virus. L'estàndard infectiu de VHE porcí preparat a partir de femtes tenia un títol de 10^6 GEs/ml corresponent a $10^{4.5}$ PID₅₀ per ml ("Pig Infectious Dose": dosi infectiva del porc). Finalment, en aquest mateix estudi es van poder infectar porcs amb una soca humana del VHE alhora que primats no humans amb una soca porcina (Meng et al., 1998b). Tot i que els primats manifestaren un augment dels enzims hepàtics, aquest augment era inferior comparat amb els primats infectats amb aïllats humans. Aquests estudis confirmaren la capacitat del VHE per creuar la barrera d'espècie. A més, la ràpida seroconversió dels porcs inoculats amb la soca US-2 humana, rebel·lava la capacitat que podia tenir l'espècie porcina per ser-ne reservori.

A partir d'aquests estudis es realitzaren un seguit d'infeccions amb la finalitat de demostrar que la via fecal-oral era la via natural d'infecció entre els porcs. Malauradament, cap d'ells aconseguí demostrar-ho amb èxit; només Kasorndorkbua et al., l'any 2004, va poder infectar amb èxit un de tres animals inoculats amb 15 grams de femtes durant 3 dies seguits. Les femtes provenien d'un animal infectat endovenosament utilitzant l'estàndard infectiu descrit anteriorment com a inòcul (10^6 GEs/ml). Les femtes d'aquest animal es van testar i contenien la mateixa quantitat de virus que l'inòcul.

Tots aquests estudis demostren que una de les principals limitacions de les infeccions experimentals de l'HE, tant en els primats com en els porcs, ha estat la via d'inoculació. A causa de la dificultat de reproduir la infecció per via oral, la via endovenosa ha estat la més utilitzada. Així és el cas dels estudis per comprovar la infectivitat del virus present en fetges d'escorxador (Feagins et al., 2007, 2008). Per altra banda, Tsarev comprovà que la dosi necessària per infectar primats via oral havia de ser molt superior a la necessària per fer-ho intravenosa (IV) (Tsarev et al., 1994b). En els porcs, una dosi inferior a 10^6 GEs/ml és capaç

d'infectar els animals IV però no oralment (Kasorndorkbua et al., 2002; Kasorndorkbua et al., 2005). En les aus, en canvi, una dosi de 10^6 GEs/ml del VHE aviar inoculada per via oro-nasal és capaç d'infectar els animals mostrant seroconversió, virèmia i excreció fecal (Billam et al., 2005).

Tot i així, els estudis en porcs infectats per via endovenosa han permès explicar diferents aspectes de la infecció. En un estudi desenvolupat per Halbur et al., al 2001, a dia 3 post-infecció (dpi) ja es detectava l'ARN a bilis i fetge. La virèmia apareixia el dia 7 dpi i durava entre 1-2 setmanes, mentre que l'excreció en femtes apareixia el mateix temps que la virèmia però durava de 2 a 3 setmanes. Els anticossos anti-IgG es començaven a detectar a partir del 14 dpi. En infeccions naturals s'ha descrit que els valors de densitats òptiques (DO) de les IgM, estan estadísticament relacionats amb la presència de virèmia (de Deus et al., 2008a). D'altra banda, mitjançant la detecció de la cadena negativa del genoma, s'han identificat llocs de replicació extrahepàtica com serien l'intestí prim, colon, limfonodes i melsa. Això fa sospitar que hi podria haver una primera replicació a l'intestí abans d'anar al fetge, l'òrgan diana (Williams et al., 2001).

La infecció pel VHE en el porc cursa de forma subclínica. Els animals poden presentar lesions hepàtiques de caràcter lleu (inflamació limfohistiocitària multifocal del tracte portal i/o distribuïts irregularment pel parènquima hepàtic), moderat (inflamació limfohistiocitària d'intermediària a moderada del tracte portal sovint acompanyada per agrupaments de cèl·lules inflamatòries mononuclears en el parènquima hepàtic) (Martín et al., 2007) o fins i tot greu (inflamació limfohistiocitària de moderada a severa del tracte portal acompanyada per agrupaments de cèl·lules inflamatòries mononuclears en el parènquima hepàtic) (Halbur et al., 2001)

Taula 1.5. Principals infeccions experimentals realitzades en porcs.

Via	Inòcul	Títol inòcul	Dosi	Aïllat	Origen	Genotip	Infectats/ inoculats	Evidència infecció	Referència
IV ^a , oral	femtes	-	2ml (oral) 1.5ml (IV)	Rússia	humà	1	2/2 2/2	augment ALT, icterícia, excreció fecal	Balayan et al., 1990
IV, oral, nasal	femtes	1800 CID 50s	½ IV i ½ nasal i oral	Mex-14	humà	2	0/5	-	Platt et al., 1998
IV	femtes	10 ² -10 ³ GE/ml	0.8ml	swine US	porcí	3	4/4	virèmia, excreció fecal, seroconversió	Meng et al., 1998a
		10 ⁷ GE/ml	0.5ml (10 ⁵ MID ^b)	Mex-14	humà	2	0/3		
		10 ⁶ GE/ml	0.5ml (10 ⁵ MID)	Sar-55	humà	1	0/3		
IV	sèrum	-	0.2ml (10%)	US-2	humà	3	2/2	excreció fecal, seroconversió	Meng et al., 1998b
IV	femtes	10 ⁶ GE/ml ^c		swine US	porcí	3	3/3	virèmia, seroconversió	Kasorndorkbua et al., 2002
oral	femtes						0/3		
tub estomacal	femtes						0/3		
IV	fetge	10 ⁴ GE/ml					2/3	virèmia, seroconversió	
		10 ² GE/ml					3/3	virèmia, seroconversió	
oral	femtes	10 ⁶ GE/g	15g (3 vegades)	swine US	porcí	3	1/3	excreció fecal, seroconversió	Kasorndorkbua et al., 2004
IV	purins	25ml	10 GE	L19	porcí	3	1/3	seroconversió	Kasorndorkbua et al., 2005
			10 ³ GE	P12			2/3	excreció fecal, seroconversió	
oral	purins	25ml	10 GE	L19			0/3		
			10 ³ GE	P12			0/3		
IV	fetge	-	2ml	fetge comercial	porcí	(3)	10/15	virèmia, excreció fecal, seroconversió	Feagins et al., 2007
IV	fetge	10 ⁸ PDU ^d /ml	2ml	swine Dutch	porcí	3	1/1	excreció fecal	Feagins et al., 2008
		10 ⁴ PDU/ml	3-4.5ml	fetge comercial			0/4		

^aIV: intravenosa; ^bMID: Monkey infectious dose → 0.5ml MID= 10⁵ monkey infectious dose; ^c10⁶ GE/ml sèrum o gram femtes = 10^{4.5} PID₅₀/ml (pool infectiu estàndard); ^dPDU: PCR-Detectable Units

1.5 Diagnòstic

Les proves laboratorials són una eina imprescindible per aconseguir un diagnòstic acurat de l'hepatitis E, ja que, per una banda, els símptomes clínics en l'home són indiferenciables d'altres hepatitis agudes, i en el cas del porc té un curs totalment subclínic. El fet que encara no s'hagi pogut desenvolupar un sistema de cultiu cel·lular eficient fa que actualment el diagnòstic de la infecció del VHE es basi en tècniques immunològiques com l'ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assays": assaig per immunoabsorció lligada a enzims) i moleculars com la PCR ("Polymerase Chain Reaction": reacció en cadena de la polimerasa).

1.5.1 Immunològic

Els mètodes immunoenzimàtics com l'ELISA permeten la detecció dels anticossos anti-VHE (IgG, IgM i IgA) i gràcies al seu baix cost són molt útils per realitzar estudis epidemiològics. La determinació de les IgM és indicador d'infeccions recents, mentre que les IgG només determinen que hi ha hagut infecció però no que aquesta s'hagi produït fa poc. Alguns autors assenyalen que la detecció conjunta d'IgA i IgM pot assegurar el diagnòstic de la infecció aguda (Takahashi et al., 2005); d'altres, però, han vist que la determinació d'IgA en infeccions per genotip 3 té un ús més limitat que en infeccions per genotip 1, pel fet de ser soques que no generen una resposta suficientment gran d'IgA com per ser detectada (Herremans et al., 2007).

La majoria d'ELISA pel diagnòstic del VHE són de tipus indirecte i s'han basat en proteïnes recombinants o pèptids sintètics expressats a partir de l'ORF2. L'ORF3 també ha estat utilitzat tot i que la sensibilitat del test respecte a l'ORF2 sembla que sigui menor (Ghabrah et al., 1998). L'ELISA desenvolupat a partir de la proteïna expressada de la soca Sar-55 de genotip 1, ha estat un dels més usats tant en el diagnòstic de l'HE humana com porcina (Tsarev et al., 1993; Robinson et al., 1998). En comparar aquest proteïna amb la derivada de la primera soca porcina caracteritzada als Estats Units (genotip 3), la concordança entre les proves pels sèrums humans i porcins és d'un 98% ($kappa= 0.952$) i d'un 99% ($kappa= 0.938$), respectivament (Engle et al., 2002). Recentment Peralta et al. (2009b), han descrit una proteïna expressada a partir d'una soca porcina de genotip 3, amb resultats equiparables ($kappa: 0.82$) a la proteïna Sar55. Actualment, només hi ha disponibles tres sistemes comercials d'ELISA, que inclouen fragments proteics dels genotips 1 i/o 2

(laboratoris Genelabs, Abbott i Biokit). Vist el seu alt cost i el fet de no incorporar proteïnes del genotip 3, molts laboratoris d'investigació han optat per desenvolupar el seu propi ELISA basat en soques humanes o porcines de la mateixa àrea geogràfica. Per bé que, individualment, aquests tests puguin tenir una bona sensibilitat i especificitat, és necessari comparar-los entre els diferents laboratoris. La validació d'aquestes tècniques és una peça clau per demostrar la fiabilitat dels resultats i d'aquesta manera poder comparar estudis.

1.5.1 Molecular

Les tècniques moleculars com la RT-PCR permeten la detecció del genoma viral i, per tant, són indicadors de la presència d'infecció. Erker et al. (1999) i Huang et al. (2002a) desenvoluparen RT-PCRs que, teòricament, permetrien la detecció de tots 4 genotips ja que es basaven en la utilització d'encebadors universals. Tot i així, la majoria de laboratoris han desenvolupat els seus propis encebadors a partir de regions conservades de seqüències dels diferents genotips i, especialment, de les soques humanes i porcines detectades al seu propi país. Això ha permès l'amplificació del virus en molts tipus de mostres com el sèrum, femtes, bilis, fetge, ronyó, orina i també en aigües residuals (Pina et al., 1998; de Deus et al., 2007; Bouwknecht et al., 2009). Malgrat tot, no es coneix exactament la sensibilitat i especificitat de les RT-PCRs usades a les diferents àrees geogràfiques, de manera que també es fa complicada la seva comparació (Meng, 2009).

Més recentment, s'han posat a punt diferents tècniques de PCR a temps real que permeten quantificar el virus present a la mostra. A part, tenen clars avantatges respecte a la RT-PCR qualitativa ja que redueixen el temps de diagnòstic alhora que les contaminacions en haver-hi menys manipulacions. La desenvolupada per Orru et al. (2004), tot i que té una sensibilitat força bona, està basada en el mètode de SYBR Green que presenta menys especificitat que els mètodes basats en sondes. Aquests darrers mètodes, com la TaqMan[®], poden incrementar l'especificitat perquè a part dels dos encebadors directe i revers cal que també s'uneixi una sonda marcada. Mansuy et al. (2004) i Ahn et al. (2006) posaren a punt tècniques basades en aquest mètode però amb la limitació que no tenien capacitat de detectar tots els genotips. La tècnica desenvolupada per Enouf et al. (2006), en canvi, sí que permetia la detecció dels quatre genotips, però la posada a punt en una plataforma Lyght Cyler[®] limitava el seu ús a altres laboratoris. Finalment, Jothikumar et al. (2006) van descriure una tècnica basada en l'amplificació

d'una regió molt conservada de 70 nt situada a l'ORF3. La tècnica detectava tots els genotips i tenia una sensibilitat de 4 equivalents de genoma, però no es quantificaren les mostres analitzades.

1.6 Control i prevenció

No existeix un tractament específic per l'hepatitis viral aguda, tot i així la majoria de vegades no és necessària l'hospitalització i, simplement, fer repòs absolut, menjar aliments baixos en greix i evitar el consum d'alcohol i drogues són mesures suficients per a la completa recuperació. No és el cas però de les FHF, a on en molts casos el trasplantament de fetge, amb totes les seves complicacions, és l'únic tractament que se li pot aplicar. Encara que en models animals s'ha aconseguit una immunització passiva mitjançant l'administració de sèrums de la fase convalescent (Tsarev et al., 1994a), en els humans l'administració d'immunoglobulines obtingudes no va tenir èxit, potser a causa d'una baixa quantitat d'anticossos presents en el sèrums (Khuroo and Dar, 1992).

En els països subdesenvolupats, on l'hepatitis E pot arribar a causar més del 90% d'hepatitis agudes (Stevenson, 2000), la primera mesura per controlar la malaltia seria l'aplicació d'unes mesures higiènicosanitàries correctes, assegurant el subministrament d'aigua potable a tota la població. Aquestes mesures s'haurien d'aplicar sobretot en situacions de grans aglomeracions de gent com són els camps de refugiats (Guthmann et al., 2006), fent especial atenció a les dones embarassades. Secundàriament, el desenvolupament d'una vacuna eficaç assequible a tota la població ajudaria a disminuir substancialment els casos d'hepatitis aguda. En els països desenvolupats aquesta vacuna seria d'interès per aquelles persones que haguessin de viatjar a països endèmics.

Donat el desconeixement de la incidència real, origen i vies de transmissió de l'hepatitis E als països industrialitzats, és difícil establir unes mesures de control adequades. La Organització Mundial de la Salut³ ha publicat un seguit de mesures per prevenir l'hepatitis E. Entre elles recomanen rentar-se bé les mans amb sabó abans de cuinar, coure bé la carn, no barrejar la carn cuita amb la crua o pelar la fruita. Per les persones que estan en

³ Organització Mundial de la Salut. "Key messages for health education: Hepatitis E"
http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/education_messages/en/index.html (consultat 15 juny 2009)

contacte amb porcs, se'ls recomanaria rentar-se bé les mans després de manipular els animals (Meng, 2009).

Actualment no es disposa de cap vacuna comercial per prevenir la infecció del VHE. La producció de vacunes mortes o atenuades és inviable ja que no existeix un sistema eficaç de cultiu del virus. Per això, les investigacions s'han centrat en la producció de vacunes basades en proteïnes recombinants de l'ORF2, ja que és una proteïna altament conservada, immunogènica i que inclou un domini reconegut pels anticossos neutralitzants (Schofield et al., 2000). També s'han fet estudis de vacunes basades amb partícules víriques buides (VLPs o "*Virus-Like Particles*"), proteïnes recombinants o pèptids expressats en *E. coli* o vacunes DNA (Kamili et al., 2004; Li et al., 2004; Li et al., 2005a). Existeix només una vacuna que, actualment, ja estigui a la fase III dels assajos clínics, produïda a partir d'una proteïna recombinant de 56-kiloDaltons expressada en cèl·lules d'insecte de la soca Pakistaní Sar-55 (Tsarev et al., 1997). Aquesta vacuna s'ha comprovat que té una eficàcia del 95.5% després de 3 dosis vacunals i d'un 87% amb només 2 dosis (Shrestha et al., 2007). La posada al punt d'un ELISA de detecció d'anticossos neutralitzants capaç de reconèixer els anticossos dels 4 genotips (Zhou et al., 2004) així com la disposició de models animals capaços de generar una resposta immunitària enfront la proteïna de la càpsida del VHE humà (Aggarwal and Krawczynski, 2000) són eines que permetrien una avaluació més ràpida de l'eficàcia vacunal.

2. Objectius

Aquest estudi forma part d'un projecte del *Ministerio de Educación y Ciencia* titulat "*Infección por el virus de la hepatitis E en el cerdo: diagnóstico, epidemiología y patogenia*" iniciat l'any 2004 al CReSA. En els darrers anys també ha format part del projecte d'àmbit nacional "*PORCIVIR: Patogenia de infecciones víricas del cerdo*", del qual formen part cinc institucions espanyoles, entre elles el CReSA. L'objectiu principal d'ambdós projectes és aprofundir en el coneixement de la infecció pel virus de l'hepatitis E (VHE) en el porc per tal d'esbrinar el risc de transmissió a les persones. Aquesta tesi, que engloba part dels estudis realitzats sobre l'epidemiologia i la patogènia de l'hepatitis E, vol donar resposta als objectius següents:

1. Determinar l'aparició de la infecció del VHE a la població porcina espanyola.
2. Estudiar la dinàmica d'infecció en granges infectades endèmicament pel VHE i esbrinar el percentatge d'animals que poden arribar infectats al moment del sacrifici.
3. Investigar mètodes de diagnòstic immunològic alternatius pel VHE a l'escorxador.
4. Desenvolupar un model animal que permeti estudiar millor la infecció natural del VHE en el porc.

Per poder desenvolupar aquests quatre objectius, es varen dissenyar els estudis següents:

Estudi I:

Amb l'objectiu de conèixer la prevalença de la infecció del VHE en el porc i consegüentment determinar el moment d'aparició de la infecció a Espanya, es va dur a terme un estudi serològic retrospectiu, des de l'any 1985 fins el 1997, utilitzant mostres d'arxiu disponibles al CReSA, recollides per l'IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària) i el DAR (Departament d'Agricultura i Acció Rural). Aquesta col·lecció és la més extensa i antiga que s'ha pogut recopilar i inclou sèrums d'explotacions de tota Espanya des de l'inici de les campanyes de lluita contra la pesta porcina l'any 1985.

Estudi II:

Per tal de conèixer millor la dinàmica d'infecció i mode de manteniment del VHE a les granges porcines, es va realitzar un estudi longitudinal prospectiu en sis granges de cycle tancat, prèviament identificades com a positives enfront el VHE. Els animals se segueixen

fins a l'escorxador per determinar el percentatge d'infectats i poder valorar el possible risc del VHE per a les persones.

Estudi III:

Es comparà la utilització del suc de carn i el sèrum per a la detecció d'anticossos contra la infecció pel VHE en porcs d'escorxador. Aquest estudi es realitzà amb les mostres dels animals de l'estudi II.

Estudi IV:

En primer lloc, es dissenyà un estudi per comprovar la infectivitat de l'inòcul i, posteriorment, es realitzà una segona infecció experimental amb l'objectiu d'estudiar la via de transmissió natural en el porc per inoculació oral d'un nombre significatiu d'animals i investigar la possibilitat d'infecció per contacte directe amb animals sentinella. Aquest estudi es realitzà en instal·lacions d'alta seguretat controlant així les possibles contaminacions creuades a partir de l'ambient, fòmits i/o individus.

3. Estudi I

Retrospective Serological Study on Hepatitis E Infection in Pigs from 1985 to 1997 in Spain

3.1 Introduction

The first evidence that acute hepatitis outbreaks in humans can be caused by an agent different from hepatitis A or hepatitis B viruses is dated in 1980 when Wong et al. demonstrated that none of the abovementioned agents were involved in the large epidemic of acute hepatitis in India in 1955-1956. Later on, in the 1980 and 1990 decades that new agent was shown to be a virus that was called hepatitis E virus (reviewed by Purcell and Emerson, 2008).

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped positive-sense single-stranded RNA virus of 27-34 nm in diameter which has been classified as *Hepevirus* genus (Emerson et al., 2004), and proposed as family *Hepeviridae* (Meng et al., 2008). In humans, HEV is responsible of major outbreaks of acute viral hepatitis in developing countries that, generally, are associated with poor sanitary conditions. In contrast, in industrialized countries HE outbreaks are not reported and cases are mostly diagnosed in individuals with no history of previous travel to endemic countries (Emerson and Purcell, 2003). Sporadic or endemic, the disease usually appears as a self-limiting acute hepatitis with a low (<1%) fatality rate. However, fatality in pregnant women can reach up to 25% (Kumar et al., 2004).

In 1997 a novel virus closely related to the known human HEV isolates was detected in pigs (Meng et al., 1997). Different serological studies reported that swine HEV infection is widespread in pigs regardless of whether HEV is endemic in the respective human population or not (reviewed by Meng and Halbur, 2006). Sequence analysis have shown that swine HEV isolates are more similar to human HEV isolates from the same geographic area than to swine HEV isolates from other regions (Huang et al., 2002a). Experimental infections have demonstrated that swine HEV can infect non-human primates and that pigs can be infected with the human strain US-2 (Meng et al., 1998b; Halbur et al., 2001). Direct evidence of human hepatitis E associated with consumption of undercooked or uncooked boar and deer products have been reported (Tei et al., 2003; Li et al., 2005b). These findings suggest that, potentially, hepatitis E is a zoonotic disease.

In Spain, HEV RNA has been detected in human cases of hepatitis, urban sewage and swine samples, confirming thus that HEV circulates in both human and animal populations in Spain (Pina et al., 2000; Clemente-Casares et al., 2003). A recent study showed that HEV is present in Spanish pig farms since, at least 1998, being 97% farms positive for anti-HEV IgG

antibodies (Seminati et al., 2008). The objective of the present retrospective study was to determine the presence of HEV antibodies in archived porcine sera (1985-1997) in order to elucidate when HEV appeared in Spain.

3.2. Materials and Methods

3.2.1. Sample collection

Spain is an important swine-raising country of Europe, with more than 22 million pigs (Anonymous, 2007). The study was conducted using serum samples collected between 1985 and 1997 by the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA, Barcelona, Spain) and the Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural (DAR, Barcelona, Spain) of the Catalan Government for monitoring health of pig farms. Sera were obtained from randomly selected farms. It was assumed that a HEV positive farm would have at least a proportion of 20% positive sows (95% confidence) and, accordingly, 15 sera per farm were analyzed. In 60 farms where this number of samples was not available, at least eight sera were analyzed (detection limit: 30% prevalence). Therefore, a total of 2,871 sera from 208 farms of Spain were examined. For 13 farms sera were available for three consecutive years (1995-1997).

3.2.2 Serological analysis

Sera were tested for anti-HEV IgG antibodies by means of a previously described in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Meng et al., 1997). Oldest sera (1985-1987) with optical densities (OD) close to the cut-off (that is between 0.25 and 0.4) were also tested by dot-blot analysis to confirm the ELISA results. Both serologic assays (ELISA and dot-blot) were based on the detection of a purified recombinant ORF2 HEV protein from Sar55 strain (genotype 1) (Robinson et al., 1998) provided by Drs. R.H. Purcell and S.U. Emerson (National Institutes of Health, Bethesda, MD). This antigen has been shown to be efficient for the detection of anti-HEV antibodies in pigs infected by HEV genotype 3 (Engle et al., 2002; Meng et al., 2002).

3.2.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The test was performed as described by Meng et al. (1997) with minor modifications. Briefly, sera were initially diluted 1:100 and 100 µl were dispensed in wells of a 96 wells

plate previously coated with the ORF2 truncated protein (100 µl/well of a 0.25 mg/ml dilution of the ORF2 protein in 0.05M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6). To minimize false positive reactions caused by the test background, each serum was tested simultaneously in ORF2-coated and un-coated wells. After 30 min of incubation of the sera at 37°C, an anti-swine IgG conjugated with peroxidase (Bethyl) was added (100µl, dilution 1:80,000) and, finally, test was revealed by adding tetramethylbenzidine as a substrate (TMB-Sigma). The reaction was stopped with H₂SO₄ 2M and ODs were read at 450 nm. For each sample a corrected OD was calculated by subtracting the value obtained in uncoated wells from the value of HEV coated wells. Samples having a corrected OD equal or higher than 0.300) were considered to be positive (Meng et al., 1997). In each plate one positive control, one negative control and two blank samples were included. Control sera were obtained from conventional pigs identified as positive or negative as previously described (Meng et al., 1997).

3.2.2.2 Dot-blot analysis

Dot-blot was performed only with the older sera (1985-1987) that yielded OD values close to the cut-off. Briefly, nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences Hybond-ECL) strips were spotted with 1 ml of ORF2 protein in 2x-urea lysis buffer (30mM Na₂HPO₄, 18mM NaCl, 2% SDS, 200mM DTT, 0.4mM pefabloc-Sigma) at 20 ng/ml and 10 ng/ml. A spot of the lysis buffer was included as a blank. Blots were blocked by shaking the strips overnight at 4°C with TBS-T (2% Tris-HCl pH 7.5, 140mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 2% blocking reagent (ECL Advance™ Western Blotting Detection kit, GE Healthcare Amersham). Then, blots were washed six times with TBS-T and incubated with each serum diluted 1:250 in blocking solution (1h at room temperature with constant shaking). Positive and negative controls were included at dilutions 1:1,000 and 1:250, respectively. After incubation, blots were washed six times with TBS-T, and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-pig IgG (Bethyl) at a 1:125,000 dilution. After 1h of incubation at room temperature, blots were washed six times with TBS-T and color development was carried out using a chemiluminescence detection reagent (ECL Advance™ Western Blotting Detection kit, GE Healthcare Amersham). For the image capture and analysis, developed spots were photographed with a FluorChem® HD2 Imaging System's (Alpha Innotech). Cut-off was determined by comparing the spot produced by each serum to the reaction of the negative control.

3.2.3 Statistical analysis

Win Episcopo 2.0 software (Thrusfield et al., 2001) was used for calculating sample size. Statistical analysis was carried out using SPSS 15.1 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A generalized linear model was used to evaluate the relationship between total positive sera (log transformed) and years. In order to reduce variability, years were grouped as follow: 1) 1996-1997; 2) 1994-1995; 3) 1992-1993; 4) 1990-1991; 5) 1988-1989 and 6) 1985-1987. EpiCalc 2000 software (<http://www.brixtonhealth.com/epicalc.html>) was used to assess statistical differences by Chi-square test among years in a same farm. Significance level was set at $p < 0.05$. Confidence intervals (95% CI) for standard errors were estimated using the expression $C.I. = 1.96\sqrt{p(1-p)/n}$ (Martin et al., 1987).

3.3 Results

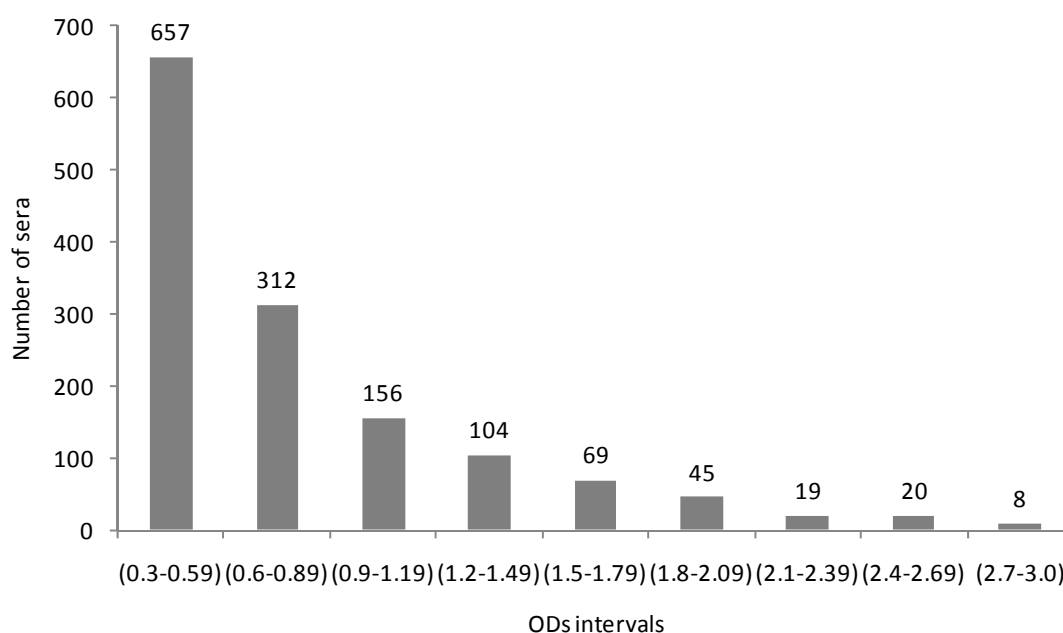
3.3.1 Serological analysis

3.3.1.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Of the 2,871 sera analyzed by ELISA, 1,390 were positive for anti-HEV IgG antibodies (48.4%, 95% CI: 46.9%-49.9%). Optical densities of positive sera ranged from 0.3 to 3.0, with an average OD of 0.81 (standard deviation: 0.53). Distribution of ODs is shown in figure 3.1. Two hundred and four out of 208 farms had at least one seropositive pig (98%, 95% CI: 96.1%-99.9%). Seroprevalence per year ranged from 25% to 71% (Table 3.1). Statistical analysis of the ELISA results revealed significant differences between groups of years. Thus, the earlier examined years (1985 to 1987) had the highest seroprevalence compared to the other groups ($p < 0.01$). The percentage of seropositive sows in farms varied greatly from herd to herd, ranging from 0% to 100% with an average of 47.8% (standard deviation: 25.1). In the 13 farms where sera were available for three consecutive years (1995 to 1997) no significant differences were found among years.

3.3.1.2 Dot-blot analysis

Sixty-four sera belonging to years 1985, 1986 and 1987 yielded ODs between 0.25 and 0.4. Of them 58 were positive in dot-blot, confirming that the samples recognized the Sar55 antigen (Figure 3.2).

Figure 3.1. Optical densities intervals of positives sera (cut-off ≥ 0.300).**Table 3.1.** Prevalence of HEV antibodies in pigs in different years (1985-1997).

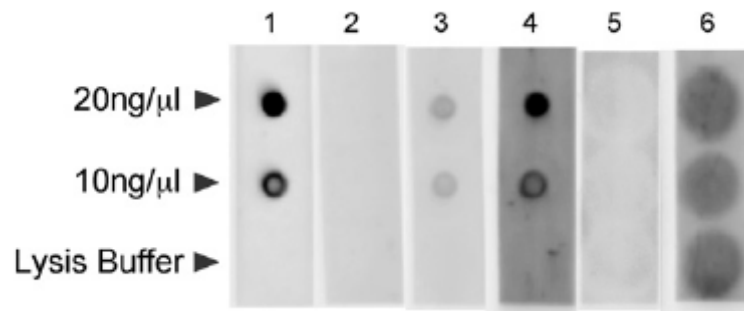
Year	Nº farms	Nº analyzed sera	Nº positive sera	Proportion (95% CI)
1985	4	32	8	25% (10-40)
1986	13	179	116	65% (58.1-71.9)
1987	8	119	85	71% (62.9-79.1)
1988	8	105	54	51% (41.5-60.5)
1989	34	474	238	50% (45.6-54.4)
1990	32	422	177	41% (36.4-45.6)
1991	23	304	156	51% (45.5-56.5)
1992	3	41	19	46% (30.8-61.2)
1993	21	278	113	40% (34.3-45.7)
1994	15	223	104	46% (39.5-52.5)
1995	8	120	33	27% (19.1-34.9)
1996	18	270	165	61% (55.3-66.7)
1997	21	304	122	40% (34.6-45.4)
Total	208	2871	1390	48.4% (46.9-49.9)

3.4 Discussion

This study proves that HEV infection has been present in the Spanish swine population since at least 1985, 13 years before any other report of HEV in pigs of this country (Pina et al., 2000; Seminati et al., 2008). In a previous study (Seminati et al., 2008) reported that HEV seroprevalence was increasing with years (1998: 32.1%; 1999: 57.5% and 2000:

45.8%) and they had suggested that HEV infection in swine probably begun to spread soon before 1998. The present study shows that HEV infection was widespread in Spanish pig

Figure 3.2. Dot blot analysis of ELISA positive samples (1985-1987). Strips 1 and 2: positive and negative controls (recent sera); strips 3 and 4: positive serum samples (old sera); strips 5 and 6: negative serum samples (old sera).



livestock in 1985. The use of the dot-blot allowed the confirmation of the specific reactivity of the oldest examined sera and minimizes the chance for inclusion of false positive results.

Our results support the notion proposed by Purcell and Emerson (2008) that HEV could have probably been present for many years but would not have been recognized until recently. Those authors suggested that HEV could have been the cause of epidemic and endemic hepatitis in adults -supposedly immune to hepatitis A virus- that occurred regularly in different areas of the world before the 20th century.

On the other hand, our data agree with retrospective studies performed in other countries, in which HEV antibodies and/or viral RNA were detected in swine before 1998. In India, anti-HEV antibodies have been in swine sera collected between 1985 and 1987 (Arankalle et al., 2003). Also, a study done in Korea reported that HEV was identified in archived porcine hepatic tissues of 1995 (Jung et al., 2007). Finally, a recent study has demonstrated that HEV was present in the wild boar population of Germany from at least 1995 (Kaci et al., 2008).

The statistical differences for prevalences in different years must be interpreted cautiously. Although seroprevalence of HEV in the first examined years seem to be very high, hidden biases related to sampling cannot be discarded and differences could be due

to factors such as the geographic location of farms, hygienic conditions in positive farms, density of animals in the farm, etc. The present study did not find differences among consecutive years in the 13 farms in which samples for three consecutive years were available (data not shown). These findings probably indicate that the HEV infection was endemic in the Spanish pig farms at least since 1985.

A significant variation in the percentage of seropositive sows between herds was reported by Meng et al. (1999), although these authors attributed variations to the small sample size. Our results seem to indicate that differences between farms could be real. More studies are needed to know which variables can have influence in the distribution of the HEV infection in the farm and how they would affect the overall seroprevalence of sows.

Recent studies have shown that human and animal Spanish HEV isolates are genetically similar (Pina et al., 2000; Pérez-Gracia and Rodríguez-Iglesias, 2003; Pérez-Gracia et al., 2004; de Deus et al., 2007) a fact that could indicate a common origin for the viruses circulating in humans and pigs. Nevertheless, the role of HEV infection in industrialized countries remains unknown. Pérez-Gracia and Rodríguez-Iglesias (2003) suggested that, in an industrialized country, HEV variants were determined by an animal reservoir. In fact, some studies have shown that exposure to swine or to contaminated water could be a risk factor for seropositivity in humans (Pina et al., 2000; Meng et al., 2002; Withers et al., 2002; Clemente-Casares et al., 2003; Galiana et al., 2008). In agreement with these studies, Zheng et al. (2006) demonstrated that swine constitute a principal source of genotype 4 of HEV for human infection in eastern China by direct contact with swine and their wastes.

The high prevalence of HEV infection among pig livestock since 1985 detected in our study and the evidence that seroprevalence and clinical cases of HE among human population are relatively low (Buti et al., 1995; Buti et al., 2006), supports the notion that although the virus is endemic in Spanish pig population, transmission to humans is not very frequent. Therefore, more research is necessary to gain insight the role of swine in HEV transmission in industrialized countries, especially the sanitary risk that could suppose this virus in the food chain.

As a conclusion, we have demonstrated that HEV circulates endemically in Spanish pig farms at least since 1985.

4. Estudi II

Longitudinal Study of Hepatitis E Virus Infection in Spanish Farrow-to-Finish Swine Herds

4.1 Introduction

Hepatitis E is responsible for over 50% of cases of acute viral hepatitis in non-industrialized countries associated with poor sanitary conditions, whereas in industrialized countries it occurs infrequently and is generally restricted to people who travel to endemic areas. The infection may be entirely asymptomatic, or may resemble an acute viral febrile illness with a low mortality rate, unless in pregnant women in whom the mortality rate can reach up to 20%. The causative agent is transmitted primarily via the faecal-oral route through contaminated water or food (Dalton et al., 2008). HEV is a single-stranded positive-sense RNA virus of approximately 7.2kb in length and is member of the new family *Hepeviridae* genus *Hepevirus* (Meng et al., 2008). Although a single serotype is recognized, extensive genetic diversity has been observed among HEV isolates, usually divided in four major genotypes. Genotypes 1 (mainly detected in Asia and Africa) and 2 (only detected in Mexico and Africa) are responsible for the major outbreaks in developing countries linked with weak public-health infrastructures. On the other hand, genotypes 3 (described in America, Europe and Asia) and 4 (detected in Asia) are associated with sporadic cases in developed countries.

Purcell and Emerson (2008) described that the relatively high prevalence of anti-HEV antibodies in humans from industrialized countries may result from unapparent infections with strains of HEV derived mainly from swine (genotypes 3 and 4). In fact, autochthonous hepatitis E in humans in these countries have recently been associated with consumption of inadequately cooked pork or wild-boar liver or meat, supporting the zoonotic nature of this virus (Li et al., 2005b; Deest et al., 2007). Furthermore, it has been demonstrated that people in contact with swine were 5.4 times more likely to be anti-HEV positive than those engaged in other occupations (Galiana et al., 2008). However, the public health implication of HEV foodborne transmission is still unknown, and depends, among other factors, on the presence and infectivity of HEV in food samples.

Foodborne transmission has been studied by quantifying the presence of HEV in commercial porcine livers. Between 0-11% of pig livers could be infected with HEV and some of them could maintain its infectiousness (Banks et al., 2007; Bouwknecht et al., 2007; Feagins et al., 2007; Wang et al., 2007). Understanding the infection dynamics of HEV

infection in farms is crucial to develop correct sanitary measures to reduce the number of infected pigs at slaughter.

Cross-sectional studies have been the most frequently used design to determine the circulation pattern of HEV infection within a farm (Takahashi et al., 2003; Nakai et al., 2006; Fernandez-Barredo et al., 2007; Leblanc et al., 2007; Di Bartolo et al., 2008). Only one study carried out in Spain has done a completed description of HEV infection dynamics by means of a longitudinal approach, but only one farm was analyzed (de Deus et al., 2008a). Therefore, it should be of interest to study if the dynamics of HEV differ between farms with the same production system. Furthermore, it is still unclear how the virus is maintained within a farm allowing a new infection in each production batch.

Therefore, a longitudinal study was carried out in six Spanish farrow-to-finish swine herds in order to: i) compare the dynamics of HEV infection in 6 farms with similar production system; ii) elucidate the role of sows in HEV persistence in a farm; and iii) determine the percentage of infected animal at slaughter age.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Study design

Six farrow-to finish swine herds located in Catalonia, an important Spanish swine-raising area, were included in the study. Selected farms had a family production system with similar herd size (100-300 productive sows per farm). Serum samples submitted to our laboratories for diagnostic purpose were previously tested by an in-house ELISA (Peralta et al., 2009b), confirming that the herds were infected by HEV. In order to determine the HEV prevalence, serum and faecal samples of 20 sows at 2 weeks pre-farrowing (total number (n) =120) were selected per farm (detection limit: 15% prevalence; 95% confidence). Then, faeces from 5-6 pre-farrowing sows per farm with different OD ELISA values (2 seropositive sows with high titres, 2 seropositive sows with low titres and one seronegative sow) were taken at 3 weeks post-farrowing (n= 31). At the same time, 20 piglets from these 5-6 selected sows were ear-tagged and blood and faecal samples were serially collected at 3, 7, 13 and 18 weeks of age (n=120). Blood samples were taken from the jugular vein into tubes without anticoagulant. Blood was collected from sows by puncture in the tail

vessels. Faecal samples were obtained directly from the rectum and kept in sterile containers. When faeces could not be collected, rectal swabs were taken and stored with 1ml of phosphate-buffered saline (PBS) solution.

At slaughter (approximately 25 weeks of age), individual blood samples from tagged pigs were taken at bleeding and samples from liver and bile were collected and stored at -80°C until testing. Faecal samples from the large intestine were also taken. A liver sample was taken and fixed by immersion in 10% neutral-buffered formalin for histopathological studies. All faecal samples of the study were diluted in 1:10 in PBS and after vigorous vortexing, were centrifuged at 16,000 x *g* for 30 min. Supernatants, rectal swabs with 1ml of PBS solution as well as serum obtained from blood centrifugation were stored at -80°C until used. All samples were identified with four numbers corresponding to farm, sow, piglet number within each litter and sample week. For example, sample 1.4.1.25 indicates farm number 1, sow 4, the first piglet of this sow and week 25.

4.2.2 Serological analysis

Serum samples from 120 pre-farrowing sows and 120 piglets at 3, 7, 13, 18 and 25 weeks of age were tested for specific anti-HEV IgG and IgM antibodies using an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described elsewhere (Peralta et al., 2009b). To minimize the background color a corrected optical density (OD) was calculated (antigen-coated well OD value less uncoated well OD value). The working solutions for anti-IgG and anti-IgM conjugates were 1:40,000 and 1:10,000, respectively (Serotec Ltd., Oxford, UK). The optical density was read at 450nm. Control sera included in each plate were obtained from pigs identified as positive or negative as previously described (Meng et al., 1997). Samples that had an OD value equal or greater than the cut-off value (0.300) were considered positive (Meng et al., 1997).

4.2.3 Detection of HEV RNA

Serum and faeces from those pre-farrowing sows with high titres of HEV IgM and low titres of HEV IgG were analyzed by RT-PCR (n= 12). On the other hand, faecal samples from 31 selected breeding sows were tested by RT-PCR to determine the presence of HEV RNA. For those that were shedding virus during suckling stage, faecal and serum samples collected at 2 weeks pre-farrowing were also tested for virus in the blood or faeces before delivery. Finally, serum and rectal swabs of all 120 suckling piglets were analyzed by RT-PCR. In

order to determine the isolates present in each herd, 5 piglets per farm were selected to be analyzed twice: at the most probably time of infection (high IgM titres with low IgG titres) and at the slaughter age.

Viral RNA from serum, faecal or rectal swab suspension and bile was extracted using the Nucleospin® RNA virus kit (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Germany), and RNA from liver sample was extracted with RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's recommendations. HEV RNA was detected according to the semi-nested RT-PCR developed by Martín et al. (2007).

4.2.4 Sequencing and phylogenetic analysis

Amplified HEV fragments of 212 pb were checked by electrophoresis on 1.8% agarose and 0.15% ethidium bromide (10 mg/ml solution) gels and positive reactions were purified using the Nucleospin® Extract II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Germany). DNA sequencing reactions for both amplified strands were prepared with BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 following the manufacturer's directions (Applied Biosystems, Foster City, USA). Sequencing products were read via capillary electrophoresis on an ABI PRISM-3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Forward and reverse sequences obtained for every individual were assembled by using the ContigExpress application included in the Vector NTI software v11 (Invitrogen), and a consensus sequence was generated for every individual. Next, sequences were aligned with the Clustal W program implemented in the BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) using SW626/EU723512/Spain reference sequence. A nucleotide distance matrix between sequences was computed to infer a phylogeny by a Neighbor-Joining (NJ) algorithm using MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Confidence in the NJ tree was estimated by 1,000 bootstrap replicates. Sequences were compared using the gamma Tamura-Nei model.

4.2.5 Histopathological studies

Formalin fixed liver samples were dehydrated, embedded in paraffin blocks and stained with hematoxylin and eosin. Microscopic analysis was conducted and hepatic lesions were scored from I to IV according to a previously described staging system (Rosell et al., 2000).

4.2.6 Statistical analysis

A logistic regression was carried out using SPSS 15.1 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) to analyze differences between IgG OD values of sows and their offspring at 3 weeks of age. It was also used to test correlations between IgG OD values of piglets between 3 and 7 weeks of age. SAS system 9.1.3 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) was used to compare OD values, IgM and IgG (\log_{10} transformed), between different weeks in a farm and between farms. A repeated measurement analysis of variance according to the general linear mixed model procedure (PROC MIXED) and least-square means (LSMEANS) follow-up test was used. Constant correlation was assumed between repeated measurements. Post hoc multiple comparisons were addressed using the Tukey's test. The level of significance for all analyses was set to $p < 0.05$.

4.3 Results

4.3.1 Serological results

The HEV prevalence among sows of each herd ranged from 45 to 75% for IgG and from 0 to 40% for IgM as displayed in table 4.1. The mean prevalence was 59% (standard deviation (SD): 10) for IgG and 15% (SD: 14) for IgM. No statistical differences were found between anti-IgG titres and parity of sows. A significant and positive correlation was found between sows and their piglets of HEV antibody titres at 3 weeks of age in farms 1, 3, 4 and 5 ($R^2 = 0.21-0.85$). No correlation was found for antibody titres sow and piglets in farms 2 and 6 ($R^2 = 0.03-0.04$).

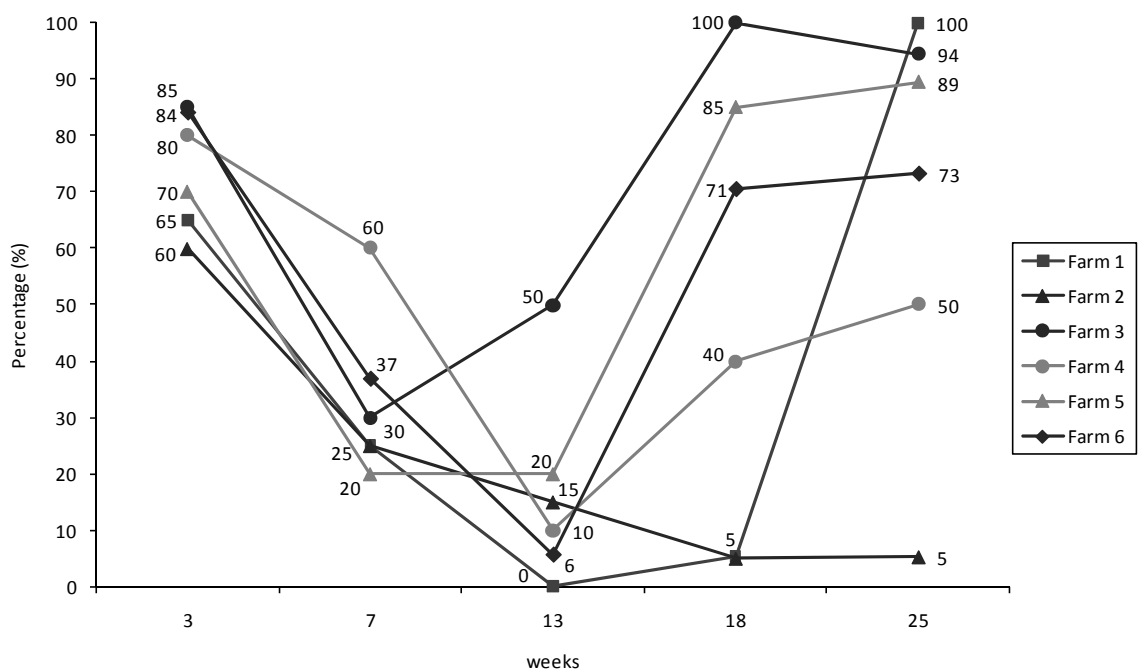
Table 4.1. Prevalence of HEV antibodies in 6 Spanish farrow-to-finish swine herds.

Farm no.	Sows positives/tested (%)	
	IgG	IgM
1	11/20 (55)	5/20 (25)
2	10/20 (50)	1/20 (5)
3	13/20 (65)	2/20 (10)
4	12/19 (63)	2/19 (10)
5	9/20 (45)	0/20 (0)
6	15/20 (75)	8/20 (40)
Total	70/119 (59 ± 10)	18/119 (15% ± 14)

The dynamic of HEV infection in the studied farms from 3 to 25 weeks of age is shown in figure 4.1. Duration of IgG maternal antibodies in piglets was associated with maternal

positivity ($p < 0.05$); the higher the mother titre, the longer the antibodies duration. When HEV maternal antibodies declined, piglets started to develop an IgM response. Anti-HEV IgM were firstly detected at 7 weeks of age in farms 1, 3, 4, 5 and 6 whereas in farm 2 anti-HEV IgM were observed at 13 weeks of age (data not shown). After infection, IgG were firstly detected by 13 weeks of age in farms 1, 3, 4, 5 and 6 or by 18 weeks of age in farm 2. Then, the number of positive animals increased until the end of the study. At that time, between 50-100% of pigs in farms 1, 3, 4, 5 and 6 had seroconverted to IgG HEV antibodies and OD values were significantly higher compared to farms 2. Only 5% of pigs in farm 2 were IgG positive by the end of the study.

Figure 4.1. HEV IgG antibody kinetic curves.



4.3.2 RT-PCR detection

Two out of 12 selected pre-farrowing sows (17%) were shedding virus in faeces but viraemia was not detected in any of them. Five out of 31 breeding sows (16%), one in farm 1 and two in farms 2 and 5, had presence of HEV RNA in faeces, although none of them were positive during pre-farrowing stage. All these positive breeding sows had presence of IgG HEV antibodies at pre-farrowing, ranging from 0.42 to 1.24 with an average OD of 0.8 (SD= 0.38). Farms 4, 5 and 6 had one piglet shedding virus in faeces at 3 weeks of age, but farms 1, 2 and 3 did not shown any RT-PCR positive animal at that time ($3/120=2.5\%$). Of the 96 liver and 80 bile samples collected at slaughter, 6 (6%) and 5 (6%) were positive for

HEV virus. As any animal was positive in liver and in bile at the same time, the total percentage of infected animals was 12%. The distribution of positive livers and biles between herds is shown in table 4.2. Due to the limited number of positive samples, statistical analysis could not be performed. Most of these animals had already seroconverted against anti-HEV at the slaughter age; only animals in farm 2 were viraemic without having presence of antibodies. None of the animals with presence of HEV in liver or in bile had virus in serum or in faeces at the same time. Of the total 11 positive animals at the abattoir, only three pigs (3.11.3, 3.7.4 and 4.15.2), were also positive in faeces or serum at 13 weeks of age (figure 4.2).

Table 4.2. Percentage of positive livers and biles at slaughter age in each farm.

Farm no.	Livers positives/tested (%)	Biles positives/tested (%)
1	2/16 (13)	0/17 (0)
2	0/19 (0)	2/13 (15)
3	1/18 (5)	2/16 (13)
4	2/8 (25)	0/0 (0)
5	1/19 (5)	1/19 (5)
6	0/16 (0)	0/15 (0)
Total	6/96 (6)	5/80 (6)

4.3.3 Sequencing and phylogenetic analysis

The amplification products of the capsid gene from 19 positive samples were sequenced and compared (table 4.3). Thirty-two variable positions in 168 nucleotides (nt) defined three major groups of sequences. Nucleotide intragroup identities were 99.0% in group 1 and 97.0% in group 2, and the intergroup nucleotide identities was 87.0% between group 1 and 2. There were 4 animals (group 3) that showed double phenogram pics in the synapomorphic sites that differentiate the other two groups. The intragroup aminoacid identities were 100% in group 1 and 99.3% in group 2, showing an intergroup aminoacid similarity of 99%.

Strains from all sequence groups were present in farms 2 and 3. Farm 5 and 6 had presence of two different groups of isolates, whereas farms 1 and 4 only showed one group. The HEV sequence from pig number 3.7.4 at 13 weeks of age had 85.8% nucleotide identity with the sequence from the same animal at 25 weeks of age, belonging to a different sequence group. On the other hand, the sequence of pig number 4.15.2 at 13 weeks was 93.2% identical to the HEV from the same animal at 25 weeks, and they were grouped in the same sequence cluster.

Figure 4.2. Optical densities values (—●— IgG; —■— IgM) and RNA detection of pigs that were HEV positive at 13 and 25 weeks of age.

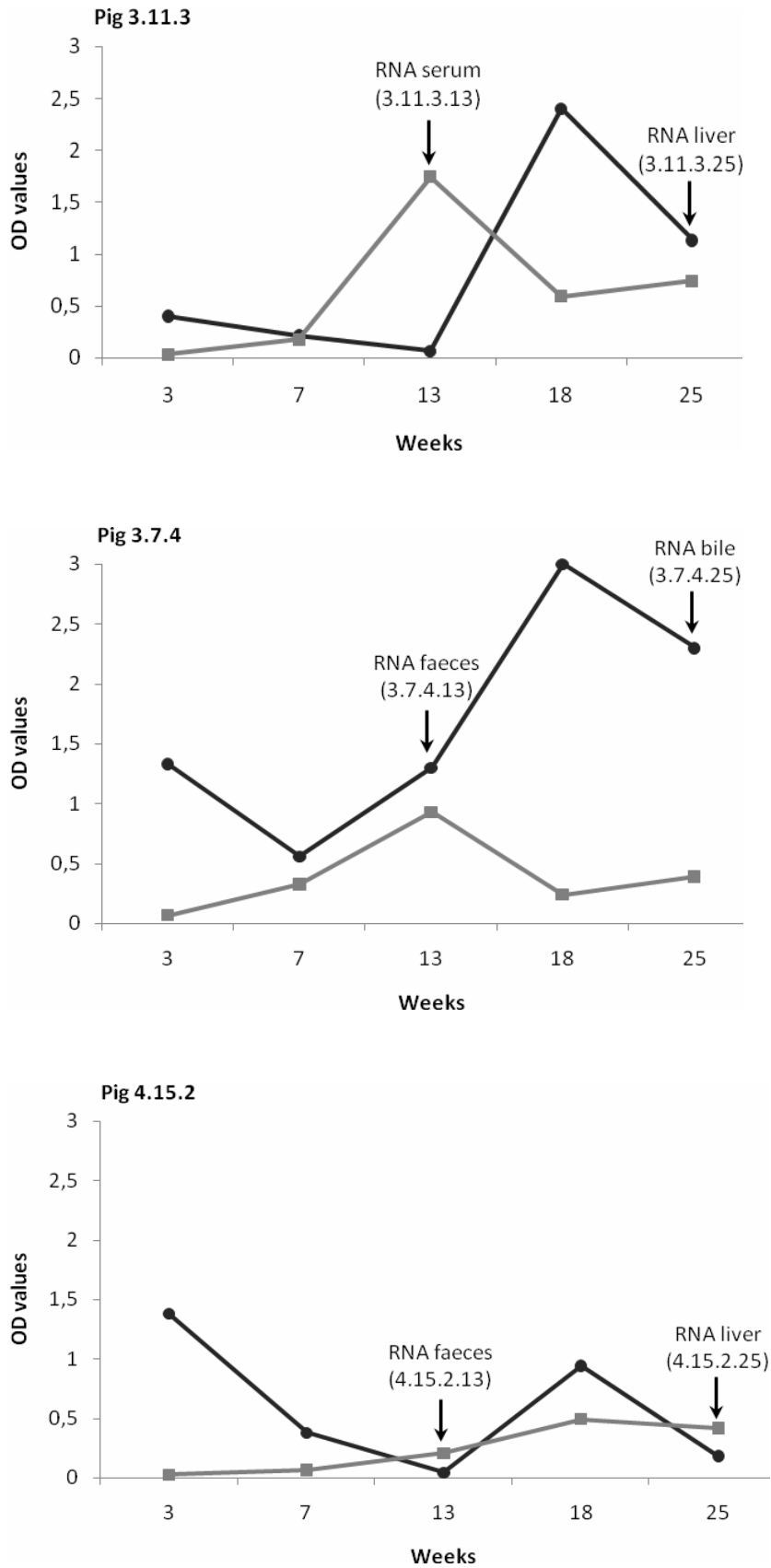


Table 4.3. Variable sites in a 168 nt sequence located in the capsid gene of HEV. In bold, animals that were HEV positive at two sampling times.

Pig	Sample	Variable sites																																	
		12	30	33	42	45	48	51	57	58	66	69	81	84	96	97	111	120	123	124	125	129	132	135	137	141	147	153	154	160	161	162	164	165	
SW626 ¹	Bile	T	T	C	T	G	C	A	T	T	C	C	G	C	C	A	G	A	T	C	T	T	T	T	G	G	C	C	G	G	G	T	G	T	
1.4.1.25 ²	Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	?	-	?
2.6.0.3	Faeces	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	?	-	?
3.7.4.25	Bile	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	?	-	?	
6.9.2.25	Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	?	-	?	
5.12.3.25	Bile	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	?	-	?	
1.1.0.3	Faeces	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	?	-	?	
5.6.0.3	Faeces	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	?	-	?	
6.9.0.0	Faeces	-	C	-	-	A	T	G	-	-	T	T	A	-	T	C	T	G	C	T	C	-	C	C	-	A	T	G	C	A	A	G	C	G	
4.15.2.13	Faeces	C	C	A	C	A	T	G	-	-	T	T	A	-	T	C	T	G	C	T	C	-	C	C	-	A	T	G	C	A	A	G	C	G	
2.3.0.3	Faeces	C	C	-	-	A	T	G	-	-	T	T	A	-	T	-	T	G	C	T	-	C	C	C	-	A	T	T	-	-	-	?	-	?	
3.7.4.13	Faeces	C	C	A	-	A	T	G	-	-	T	T	A	-	T	-	T	G	C	T	-	-	C	C	-	A	T	T	-	-	-	?	-	?	
3.4.1.25	Bile	C	C	-	-	A	T	G	-	-	T	T	A	-	T	-	T	G	C	T	-	C	C	C	-	A	T	T	-	-	-	?	-	?	
3.11.3.13³	Serum	C	C	-	-	A	T	G	-	-	T	T	A	-	T	-	T	G	C	T	-	C	C	C	-	A	T	T	-	-	-	?	-	?	
4.10.1.13	Faeces	C	C	-	-	A	T	G	-	-	T	T	A	-	T	-	T	G	C	T	-	C	C	C	-	A	T	T	-	-	-	?	-	?	
4.15.2.25	Liver	C	C	-	-	A	T	G	-	-	T	T	A	-	T	-	T	G	C	T	-	C	C	C	-	A	T	T	-	-	-	?	-	?	
2.8.2.25	Bile	?	?	-	-	?	T	?	-	-	?	?	?	-	?	-	?	?	?	T	-	?	?	?	-	?	?	?	T	-	-	-	?	-	?
5.6.1.25	Liver	?	?	-	-	?	T	?	-	-	?	?	?	-	?	-	?	?	C	T	-	?	?	?	-	?	?	?	T	-	-	-	?	-	?
3.12.0.0	Faeces	?	-	-	-	?	T	?	-	-	?	?	?	-	?	-	?	?	?	?	-	?	?	?	-	?	?	?	T	-	-	-	?	-	?
2.3.3.25	Bile	?	-	-	-	?	?	-	-	?	?	?	-	?	-	?	-	?	?	-	-	-	-	-	-	-	?	?	T	-	-	-	?	-	?

¹ SW626 (EU723512) from Peralta et al., 2009c was used as the reference sequence

² (1) farm, (4) sow, (1) piglet number within each litter and (25) sample week

³ Sequence of liver at 25 weeks of age could not be determined

⁴ Double phenogram pics in the synapomorphic sites

Phylogenetic analysis revealed that all swine sequences from this study belonged to genotype 3 and shared 83.5-98.7% nucleotide identity with other genotype 3 HEV isolates.

4.3.4 Histopathological results

At slaughter age, none of the animals had significant macroscopic lesions in the liver. Slight periportal hepatic fibrosis (stage I of Rosell et al., 2000) was histologically seen in nine pigs (15%), while only one animal (1.7%) presented mild periportal hepatitis (stage II of Rosell et al., 2000). Since only one pig that presented a slight periportal hepatic fibrosis was also RT-PCR positive in liver, no correlation between liver lesions and presence of HEV RNA in liver could be established.

4.4 Discussion

This study represents the first longitudinal survey on swine HEV infection dynamics conducted in different farms. Animals were followed from nursery to slaughter in order to detect virus and antibodies during their productive life and its presence in the carcass. Other studies also have described serologic and excretion patterns of HEV infection between farms, but by means of a cross-sectional studies (Takahashi et al., 2003; Nakai et al., 2006; Fernandez-Barredo et al., 2007; Leblanc et al., 2007; Di Bartolo et al., 2008).

Our data of HEV seroprevalence in Spanish swine herds agree with a previous study conducted by the same research group, where an average of 47.8% seropositive sows was found in 208 farms (Study I). Although most sow antibody titres were correlated with their piglets, some positive sows had negative piglets as well as some negative sows had positive piglets. These discrepancies might have been caused by an insufficient or inadequate colostrum intake or to a cross-fostering practice during suckling stage.

Slight differences in antibody dynamics of HEV infection were found in the 6 studied farms. Five of these farms showed evidence of HEV infection at 7 weeks of age, whereas in farm 2 pigs started to develop IgM antibodies some weeks later, at 13 weeks of age. Assuming that IgM presence is related with viraemia (de Deus et al., 2008a), pigs from farm 2 may have been in contact with the virus later than in the other 5 farms. In consequence, animals can be

seronegative at the slaughter age but being infected during the latest fattening period. In two studies conducted in Japan, similar differences in virus detection in faeces or IgG appearance were found (Takahashi et al., 2003; Nakai et al., 2006). A lower infection pressure in farm 2 and also in 4 may have reduced the probability of infection and consequently prolonged the period between exposure and infection (Bouwknegt et al., 2008a). Satou and Nishiura (2007) also described that a decline in the force of HEV infection in a farm would elevate the age at infection. These hypotheses could probably explain the observed difference in HEV serological curves. Even though Satou and Nishiura described that a lower force of infection could increase the number of infected pigs at the slaughter age, we have not observed any apparent differences in this percentage among farms. Further research is necessary to elucidate if different infection dynamics may affect the proportion of infected pigs at slaughter age.

How the virus persists within a herd while being able to infect each production batch is still not clarified. Some studies suggest that breeding sows could play a role as HEV reservoirs being able to transmit the virus to suckling piglets (Fernandez-Barredo et al., 2007; Di Bartolo et al., 2008). In the present study only 2 pre-farrowing sows (17%) and 5 breeding sows were shedding virus in faeces (16%), similar percentages as showed in other studies (Fernandez-Barredo et al., 2006 and 2007). How these breeding sows could be infected despite having IgG HEV-antibodies is still uncertain. Physiological changes during pregnancy (high level of steroid hormones) or farrowing (stress) might induce a reactivation of HEV replication, as suggested by Fernandez-Barredo et al. (2006) and Navaneethan et al. (2008). Stress during farrowing may explain why all sows that were shedding virus in faeces during suckling period were not excreting virus during pre-farrowing stage. Even though transmission from sows to piglets has not been excluded, none of the studied piglets born from positive sows became infected at 3 weeks of age. Despite of this, an efficient disinfection of pens between batches should be recommended to avoid virus persistence.

Viraemia and virus excretion in experimentally infected pigs are expected to last for 1-2 weeks and 2-3 weeks, respectively (Halbur et al., 2001); virus in liver can be detected until 4 weeks post infection (Bouwknegt et al., 2009). In the current study, most HEV positive animals at slaughterhouse had not had virus detection before. Although some pigs had already developed an antibody response at the abattoir, none of them had virus in serum or in faeces,

suggesting that they had probably finished the acute phase of HEV infection. Interestingly, three animals that had virus in serum or faeces at 13 weeks of age also showed virus in liver or in bile 12 weeks after their first detection. What is more, sequences from the same animal at different sampling ages were not identical. We can speculate that these sequences could have had enough mutations to change into other HEV strain, but the calculated mutation rate in these cases (10^{-1}) would be higher than the calculated for positive-sense single-stranded RNA virus like HEV (10^{-3}) (Duffy et al., 2008). Therefore, it is easier to assume that these pigs could be infected with two different strains of HEV over their life. It could happen that a higher amplification rate of each isolate in liver at different time points results in a different strain detection. The presence of virus in liver until 3 months after its detection in faeces may be due to a possible persistence of virus in target organs. A short protective immunity could also facilitate new HEV infections during its productive life, as described by Chandra et al. (2008). In both cases, animals infected during early life could still contain HEV at slaughter age, representing a risk for public health.

Phylogenetic analysis of 19 positive samples, representing the different farms tested, indicated that multiple HEV strains can be present in a same farm (Huang et al., 2002; Nakai et al., 2006; Di Bartolo et al., 2008). Huang et al. (2002) demonstrated that in 37 swine farms from the United States, HEV isolates from the same geographic region showed higher percentages of identities than those from different geographic region. Although the distance between the 6 farms in our study is quite large (25-30 Km), they are located in an area with high density of pig production and consequently with substantial concentration of slurry in the environment. Water sources may have been contaminated with swine faeces that have facilitated HEV transmission between farms. It is worthy to note that pigs that have isolates of group 3 could be infected for two different HEV strains at the same time, since they displayed two different nucleotides at the same variable regions than group 2. However, this must be confirmed cloning this sequences and isolating the two supposed different strains separately.

In the current study, a total of 12% of pigs had presence of RNA in liver or in bile at the slaughter time. Whether this HEV RNA had an extrinsically (cross-contamination) or intrinsically (natural infection) source or whether it continuous to be infectious or not, remains to be examined. Nonetheless, the prevalence is slightly higher than found in other

European countries (Banks et al., 2007; Bouwknecht et al., 2007), but similar to the proportion showed in United States (Feagins et al., 2007). A nutritional survey performed in Catalonia during 2002-2003 revealed that viscera consumption was very low (0-2.9 grams/person/day (g/p/d)) compared with meat and fish consumption (57.6-86.6 g/p/d and 56.1-84.3 g/p/d, respectively) (Anonymous, 2005). These data suggested that the risk for infection by consumption of pig livers in Catalonia (Spain) might be extremely small. However, manipulation of HEV-infected livers or other organs from pigs could be considered a possible route of transmission, as has been reported recently in a butcher and in a slaughterhouse worker (Jary, 2005; Pérez-Gracia et al., 2007).

5. Estudi III

Comparison of Muscle Fluid and Sera for detection of Antibodies against Hepatitis E Virus Infection in Slaughter Pigs

5.1 Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is the aetiological agent of hepatitis E. In developing countries, HE usually occurs as epidemics transmitted through drinking water in which HEV genotypes 1 and 2 are the cause. In industrialized countries, autochthonous cases most often are of sporadic nature and caused by HEV genotypes 3 and 4 (Purcell and Emerson, 2008). In this later case, pigs have been suggested to be a potential source of infection since HEV prevalence is very high (Seminati et al., 2008; Yoo et al., 2001; Banks et al., 2004b). In fact, several human cases of HE have been associated with the consumption of inadequately cooked meat (Li et al., 2005) and it has been reported that people in contact with swine are more likely to have anti-HEV antibodies (Galiana et al., 2008). Although monitoring of HEV is not routinely performed, the potential of this virus as a food-borne zoonosis might suggest so in the future and serology at the slaughterhouse could be a convenient mean to do it. The objective of the present study was to investigate the use of the muscle fluid as an alternative to serum for detecting anti-HEV antibodies by ELISA in swine.

5.2 Materials and methods

A total of 67 pigs from five Spanish farrow-to-finish farms were sampled at 4 different abattoirs. Each pig had been previously tagged in each ear in order to identify specific animals and samples during the slaughter chain. Individual blood samples were taken during bleeding. In parallel, thoracic viscera were taken during the evisceration process from the corresponding carcasses and stored in individual boxes until muscle sampling. A piece of 4 cm x 4 cm x 1 cm of the diaphragm was taken and kept in sterile plastic bags. All blood tubes and bags were correctly identified and frozen at -80°C until used. Muscle samples were then thawed and the released juice was collected and transferred to serological tubes.

All serum and muscle fluid samples were tested for anti-HEV IgG by means of a previously described ELISA (Martín et al., 2007). Firstly, some samples of muscle juice at dilutions 1:10; 1:50 and 1:100 were compared with their correspondent serum at dilution 1:100 as previously determined (Meng et al., 1997). When the optimal muscle fluid dilution was established

(1:10), muscle fluid and serum for each pig were analyzed in the same plate to avoid possible interplate differences. To minimize the background of the test a corrected optical density (OD) was calculated (antigen-coated well OD value less uncoated well OD value). Positive and negative control sera included in each plate were obtained from naturally infected pigs identified as positive or negative by RT-PCR and which had high or low titres of anti-IgG HEV, respectively. Serum samples that had an OD \geq 0.300 were considered as positive (Meng et al., 1997).

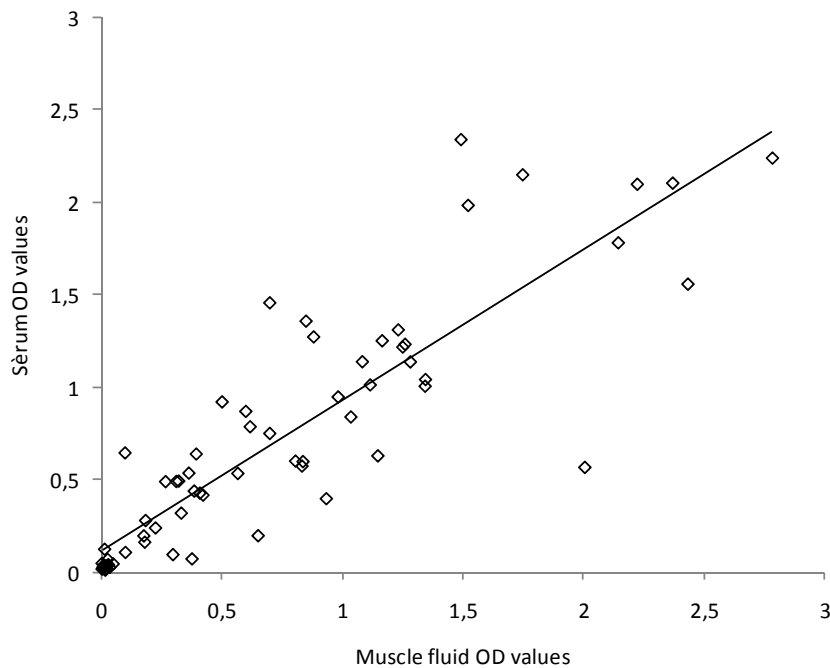
Statistical analysis was performed using STATA v.8.2 (SAS Institute, Cary, N.C., USA). Cut-off, sensitivity and specificity for the muscle fluid ELISA as compared with the serum ELISA were calculated by ROC curves. *Kappa* value and Spearman correlation were also calculated. A linear regression analysis was used to obtain the determination coefficient (R^2).

5.3 Results

Of the 67 serum samples analyzed, 43 (64%) were positive for anti-HEV IgG. Considering the serum ELISA as the standard, the optimal cut-off of the muscle fluid ELISA was 0.322 corresponding to a sensitivity of 93% (CI_{95%}: 80.9%-98.5%), whereas the specificity was 91.7% (CI_{95%}: 73%-99%). Of the 67 muscle fluid samples analyzed, 43 (64%) were positive for anti-HEV IgG. *Kappa* value for the comparison between the serum and the muscle ELISAs was 0.84 (CI_{95%}: 0.72-0.96) whereas Spearman correlation was 0.91 ($p < 0.05$) (Figure 5.1). Therefore, the determination coefficient of the linear regression model between sera and diaphragm muscle fluid optical densities (ODs) was 0.77. ELISA results for each farm are shown in table 5.1.

Table 5.1. HEV ELISA results for muscle fluid and serum in each farm.

Farms n ^o	Serum positive/tested (%)	Muscle fluid positive/tested (%)
1	14/14 (100)	14/14 (100)
2	1/19 (5)	0/19 (0)
3	17/18 (94)	18/18 (100)
4	4/8 (50)	4/8 (50)
5	7/8 (87)	7/8 (87)
Total	43/67 (64)	43/67 (64)

Figure 5.1. Scatterplot of serum and muscle fluid ODs for anti-HEV IgG ELISA.

5.4 Discussion

The use of porcine muscle fluid as a material for serology has been reported previously for *Salmonella* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Nielsen et al., 1998; Wallgren and Persson, 2000). The present study shows that this type of sample could also be used for the serologic detection of HEV. Considering muscle fluid a dilution of serum (Nielsen et al., 1998), we would expect a smaller sensitivity of muscle fluid compared with serum one. However, the results obtained with muscle juice diluted 1:10 were comparable to those produced by serum. Moreover, the *kappa* value for the comparison of tests showed that the agreement of results was acceptable-to-good and therefore both of them could be used for anti-HEV IgG antibodies detection.

This method allows knowing the percentage of seropositive pigs at the slaughter age giving information about the infection status of farms regarding infections with HEV. The simplicity of sample collection of this method offers new possibilities which will facilitate monitoring of pig herds. Besides, diaphragm sampling is routinely performed in some countries for the surveillance of *trichinellosis* at the abattoirs. In conclusion, the present study shows that

66 | Comparison of muscle fluid and sera for detection of antibodies against hepatitis E virus infection in slaughter pigs

muscle fluid can be used as an alternative to serum for serologic detection of hepatitis E virus antibodies in slaughter pigs.

6. Estudi IV

**Pigs Orally Inoculated with Swine Hepatitis
E virus are able to Infect Contact Sentinels**

6.1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV) infection in humans is one of the most important causes of acute clinical hepatitis in developing countries. Transmission of the virus occurs primarily by the faecal-oral route through contaminated drinking water in areas with poor sanitary conditions. Although the case fatal rate is generally low ($\leq 1\%$), it can reach up to 25% in pregnant women (Kumar et al., 2004).

The existence of sporadic HEV infection cases in individuals of industrialized countries with no history to travel to endemic areas has suggested the possibility of an animal reservoir (Pina et al., 2000; Pavio et al., 2008). After the first description of swine HEV in USA (Meng et al., 1997), sequence analyses have shown high nucleotide identity between swine and human isolates from the same geographic area (Huang et al., 2002a). The facts that human clinical hepatitis E has been associated with consumption of undercooked meat products (Tei et al., 2003; Li et al., 2005b) and swine HEV strains can infect non-human primates (Meng et al., 1998b) provide more evidence that HEV should be considered an agent with zoonotic potential.

The lack of a practical animal model has hindered a better knowledge of human HEV infection mechanisms. Different experimental infections have been done in swine, most of them using the intravenous (IV) inoculation as the route of exposure. In an experiment performed in 1998 (Meng et al., 1998a), pigs got infection after IV inoculation of a swine strain of HEV and were able to infect non-inoculated contact animals. In the same study, pigs could not become infected by some human HEV strains (Mex-14 and Sar-55). However, in a subsequent study from the same research group, another human strain (US-2) was infectious for pigs (Meng et al., 1998b). Following these studies, a comparison of pathogenesis of pigs infected with swine and human strains of HEV was performed (Halbur et al., 2001). When pigs are inoculated IV, liver seems to be the primary site of virus replication (Lee et al., 2008). Then, the virus can be accumulated into the gallbladder, probably as a consequence of HEV liver replication in large amounts. The virus seems to be excreted into the bile duct and finally shed in faeces. Williams et al. (2001) showed the existence of extrahepatic sites of HEV replication, including the small intestines, colon, and hepatic and mesenteric lymph nodes, as the most important tissues.

As previously said, almost all studies focused on HEV infection mechanisms with swine HEV have used the IV inoculation as the route of infection. Taking into account that the most likely natural route of transmission among pigs is the faecal-oral one (Meng and Halbur, 2006; de Deus et al., 2008a), the pathogenic events that occur under natural conditions are not really known. Few experimental infections have used oral inoculation as the route of exposure. The first one was reported in 1990 by Balayan et al., in which two young piglets were inoculated with a 1:10 faecal suspension containing a human HEV strain of genotype 1. Even though they attributed the infection to the virus inoculated from the human stool, further studies demonstrated that those pigs were already infected with a swine HEV strain of genotype 3 (Lu et al., 2004). In 2002, Kasorndorkbua et al. tested the faecal-oral route infecting two pigs, one inoculated with a stomach tube and the other using an oral drop system. None of them got infection although the inoculum contained a virus titer of 10^6 GEs/ml. In a subsequent study from the same research group using the oral route of inoculation (Kasorndorkbua et al., 2004), three pigs were inoculated by an oral gavage with 15 g of fresh swine faeces for 3 consecutive days. Only one animal shed virus in faeces (from 21 to 35 days post-inoculation (dpi)) and seroconverted by 56 dpi. No direct contact exposure was evaluated in this work. Besides, the oral route of transmission has also been investigated using manure slurry as inoculum, although no evidence of infection was obtained (Kasorndorkbua et al., 2005).

Taking into account the poorly documented infectiousness of HEV exposed orally to pigs, the objectives of the present study were to explore the most likely natural route of infection by oral inoculation of a larger group of pigs and to investigate the possibility of infection by direct contact to sentinel animals.

6.2. Materials and methods

6.2.1. Virus inoculum

The swine HEV inoculum used in this study was prepared from bile of a naturally infected pig. The bile was tested positive for HEV by a semi-nested RT-PCR as described previously (Martín et al., 2007) and had a titer of 10^6 GEs/ml (see Annex III). The phylogenetic analysis revealed that the HEV strain used belonged to genotype 3 (Peralta et al., 2009c). A second bile,

negative by semi-nested RT-PCR, was used as negative control. Biles were kept at -80°C until used.

6.2.2. Experimental design

6.2.2.1. Preliminary infectivity study

In order to test the infectivity of the inocula, four 2-week-old piglets with very low values of IgG antibody to HEV measured by an in-house ELISA (Martín et al., 2007) and free of swine HEV in faeces and blood were housed in a biosecurity level 3 (BL-3) facility. After one week of acclimatization, each piglet was inoculated IV with 1 ml of a 1:5 bile suspension (infectious dose: 10^5 GEs/ml) in physiological saline solution. Clinical signs and rectal temperature were recorded every 2 to 3 days through a 28 day-period. Serum and rectal swabs were taken twice a week to be analyzed by a semi-nested RT-PCR (Martín et al., 2007). Serum samples were also analyzed by ELISA to detect anti-HEV IgG antibodies. Bile collected at the necropsy day (28 dpi) was also tested to detect the presence of HEV RNA. All samples were stored at -80°C until analysis.

6.2.2.2. Transmission study

Thirty-seven 2-week-old piglets with no or very low HEV IgG antibody OD ELISA values and negative by semi-nested RT-PCR to the virus in blood and faeces were included in the study. Pigs were kept together for 1-week acclimatization period in the same experimental box in a BL-3 facility until the moment of challenge (0 dpi). Then, animals were divided in two groups (group A, n=25; group B, n=12), taking into account the ELISA OD values of each animal; therefore, no statistical significant difference in mean OD between groups were observed. Sixteen animals of group A were inoculated orally using a syringe with 2 ml of a 1:10 suspension (infectious dose: 10^5 GEs/ml) of a RT-PCR positive bile in physiologic saline serum. The remaining nine pigs were kept as sentinels (contact controls) and were inoculated with 2 ml of 1:10 suspension of a RT-PCR negative bile in physiologic saline serum. Pigs from group B (negative controls) received orally the same inoculum as the sentinels.

Clinical signs and rectal temperature were monitored every 2 to 3 days until the end of the experiment at 64 dpi. Five or 6 pigs from the inoculated group, 3 from the contact group (sentinels) and 4 from the control group were randomly euthanized at 16, 32 and 64 dpi.

Serum and faecal samples were collected twice a week to be analyzed by semi-nested RT-PCR; bile obtained at necropsy was also tested for the mentioned technique. Serum samples were studied for anti IgG HEV antibodies by ELISA. Faecal samples were collected directly from the rectum and diluted 1:10 in PBS. After vigorous vortexing, faecal samples were centrifuged at $16.000 \times g$ for 30 min and supernatants were taken to perform RT-PCR. All samples were stored at -80°C until further use. Liver samples obtained at necropsy were also taken and fixed by immersion in 10% neutral-buffered formalin for histopathological studies.

Both experiments were performed in accordance with the guidelines of the Good Experimental Practices (GEP), under the supervision of the Ethical Welfare Committee on Human and Animal Experimentation of the Universitat Autònoma de Barcelona (CEEAH), Spain.

6.2.3 Detection of anti-HEV antibodies

Serum and bile used as inoculum samples were tested for specific anti-HEV IgG antibodies by an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) previously described (Martín et al., 2007). This assay was performed using a purified ORF2 truncated protein as antigen, which was obtained from a local strain of swine HEV genotype 3 that was expressed into recombinant baculovirus (Peralta et al., 2009b). To minimize the background on the ELISA results, each serum was analyzed both in coated and un-coated wells. The working solution for the anti-IgG conjugate was 1:40,000 (Serotec). The reaction was stopped with H_2SO_4 2M and the optical density (OD) of each plate was read at 450 nm. Samples that had an OD value (antigen-coated well OD value less uncoated well OD value) equal or greater than the cut-off value (0.300) were considered positive (Martín et al., 2007).

6.2.4 Detection of HEV RNA

Total RNA from serum, bile, rectal swabs and faecal suspension was extracted with Nucleospin® RNA virus kit (Macherey-Nagel), reverse-transcribed, and subjected to a semi-nested RT-PCR as previously described (Martín et al., 2007). Sequencing analysis was performed on all resulting positive samples to verify that the HEV strain found in pigs was the same as the inoculated one. The resulting sequences were also compared with the one used

as positive control in the RT-PCR to check that no cross contamination occurred. Serial dilutions of serum, faeces and bile were used to determine the titer of viral genomes by semi-nested RT-PCR. Viral concentrations were expressed as GE per microliters of sample (serum, faecal suspension or bile) as described elsewhere (Meng et al., 1998a).

6.2.5 Histopathological studies

Fixed liver samples were dehydrated, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. Microscopic analysis was performed with special emphasis for the presence or absence of hepatitis, the main lesion found in HEV infected pigs (Meng et al., 1997; de Deus et al., 2007). Hepatic lesions were scored following a previously described staging system (from I to IV) proposed by Rosell et al. (2000) to evaluate liver inflammation associated to porcine circovirus type 2 infection.

6.3 Results

6.3.1 Preliminary infectivity study

All four pigs inoculated IV with the swine HEV inoculum remained clinically healthy during the whole experimental period. Rectal temperatures remained within the normality rank throughout the study with an average (avg) of 39.7°C (standard deviation (SD): 0.22).

RT-PCR results of HEV RNA detection in faeces and bile are shown in Table 1. Three out of 4 animals became infected. HEV was firstly detected in faeces on 3 dpi in animal A and on 7 dpi in animal B. Faecal shedding of pig A lasted for 1 week and only 4 days for pig B. Viraemia was not detected in any studied animal. HEV RNA was not detected in faeces of pig C, although virus genome was detected in bile at necropsy (28 dpi). The sequencing of all RT-PCR products demonstrated a 100% nucleotide identity with respect to the inoculated virus. Pig D did not show any evidence of HEV infection by RT-PCR.

Pig A seroconverted to anti-HEV IgG by 21 dpi. No other pig seroconverted at any time of the experimental period. Bile used as inoculum did not contain specific anti-HEV IgG antibodies. None of the animals had significant macroscopic and microscopic lesions.

Table 6.1. Viraemia, faecal shedding and serological OD values in pigs inoculated intravenously from the preliminary infectivity study.

Pig	Virus/antibody detection ^a		Days post-inoculation						
			0	3	7	10	14	21	28
A	Virus	Serum	-	-	-	NT	-	-	-
		Feces	-	+	+	+	-	-	-
		Bile	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-
	Antibodies		0.18	0.11	0.08	0.04	0.10	1.08	0.33
B	Virus	Serum	-	-	-	NT	-	-	-
		Feces	-	-	+	+	-	-	-
		Bile	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-
	Antibodies		0.29	0.09	0.32	0.21	0.14	0.11	0.05
C	Virus	Serum	-	-	-	NT	-	-	-
		Feces	-	-	-	-	-	-	-
		Bile	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+
	Antibodies		0.24	0.27	0.44	0.19	0.18	0.13	0.08
D	Virus	Serum	-	-	-	NT	-	-	-
		Feces	-	-	-	-	-	-	-
		Bile	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-
	Antibodies		0.33	0.26	0.19	0.16	0.12	0.05	0.05

^a -, negative; +, positive; NT, not tested; NA, non-available; cut-off ≥ 0.300

6.3.2 Transmission study

Control animals remained healthy during the whole experimental period. Pigs from the inoculated and contact group did not show clinical signs attributable to HEV during the experiment; however five animals, three from the inoculated group and two from the contact group, showed pyrexia and different clinical signs (prostration, difficult breathing and shivers), dying during the first 3 weeks of experiment. Rectal temperatures remained within normality in all the remaining animals: inoculated group, avg: 39.48°C / SD: 0.27; sentinel group, avg: 39.52°C / SD: 0.35; control group: avg: 39.54°C / SD: 0.4. Bacteriological culture of different swabs (from cerebrospinal fluid and pericardium, thoracic and abdominal cavities) obtained at necropsy, revealed the presence of colonies compatibles with common pathogens of swine farms such as *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* and *Escherichia coli* (data not shown). No significant gross lesions were observed in any of the pigs from all three experimental groups (besides those that died because of systemic bacterial infections, which showed fibrino-purulent meningitis, polyserositis and/or polyarthritis). Slight perilobular or periportal hepatic fibrosis was histologically seen in animals 16 (inoculated) and 59 (contact),

respectively. Slight or mild periportal hepatitis (stage I of Rosell et al., (2000)) was observed in pigs 17 and 89 (inoculated), 59 (contact) and 82 (control). No microscopic hepatic lesions were seen in the remaining pigs.

Some animals had antibody titers of IgG at the beginning of the study: 8 from the HEV inoculated group; 1 from the contact group and 3 from the control group. Most of these animals lost maternal antibodies after 8 dpi.

A total of 4 out of 16 pigs presented one or more evidences of HEV infection (Table 2). Three pigs from the HEV inoculated group shed virus in faeces, none of them had detectable viraemia, two had virus RNA in bile at the day of necropsy and two of them seroconverted to IgG anti-HEV antibodies. Nevertheless, these animals were able to infect contact sentinels; two contact pigs got infection, with presence of HEV in bile. None of the contact pigs had virus faecal shedding, viraemia or seroconversion at 64 dpi. Finally, control pigs remained seronegative throughout the study. None of them had HEV RNA in faeces, blood or bile during all the experimental period. Positive RT-PCR products showed a 100% nucleotide identity with respect of the inoculated virus. Faecal shedding was detected between 22 and 36 dpi (Table 2). Only one animal (pig 87) had HEV RNA detectable in faeces during different time points of the experiment. Pig 94 (euthanized at 16 dpi) had detectable virus in bile, but it was never recorded as positive in faeces. Pig 16 died at 22 dpi and was HEV RT-PCR positive both in bile and faeces at necropsy; serial dilutions of positive bile and faeces of this pig revealed that the genomic titer of HEV in bile (10^3 - 10^4 GEs/ml) was higher than that in faeces (10 GE/ml). Seroconversion of inoculated pigs appeared 43 days after challenge onwards. In the contact group of pigs, virus was only detected in bile of two animals euthanized at 64 dpi.

6.4 Discussion

Porcine HEV was firstly described in 1997 (Meng et al., 1997); since then, several experimental studies have been performed to clarify the pathogenesis of this viral infection. Most of them used IV inoculation although oral HEV exposure would be the most natural route of infection.

Table 6.2. HEV RNA detection in faeces and bile, and HEV IgG presence (OD values) in orally inoculated and contact sentinel pigs showing evidence of infection during the experimental period.

Group	Pig	Virus/antibody detection ^a		Days post-inoculation													
				0	3	8	11	16	22	25	29	32	36	43	50	57	64
Inoculated	16	Virus	Feces	-	-	-	-	-	+								
			Bile	NA	NA	NA	NA	NA	+								
		Antibodies	0.02	NT	0.05	NT	0.01	0.01									
	87	Virus	Feces	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
			Bile	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		Antibodies	0.56	NT	0.39	NT	0.17	0.10	NT	0.04	NT	0.21	0.33	0.04	1.18	1.31	
	94	Virus	Feces	-	-	-	-	-									
			Bile	NA	NA	NA	NA	+									
		Antibodies	0.36	NT	0.30	NT	0.09										
	95	Virus	Feces	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Bile	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		Antibodies	0.44	NT	0.14	NT	0.06	0.07	NT	0.04	NT	0.04	0.13	0.20	0.41	0.22	
Sentinels	40	Virus	Feces	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Bile	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		Antibodies	0.04	NT	0.03	NT	0.03	0.03	NT	0.03	NT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
	99	Virus	Feces	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Bile	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		Antibodies	0.55	NT	0.33	NT	0.24	0.13	NT	0.08	NT	0.04	0.03	0.02	0.02	0.10	

^a -, negative; +, positive, NT, not tested; NA, non-available; cut-off ≥ 0.300

Few experimental infections have been performed using the latter route of exposure, clearly indicating the difficulty to cause HEV infection (Kasorndorkbua et al., 2002, 2004, 2005). The present report further investigated the oral route of administration of HEV, demonstrating its feasibility, and describes for the first time the successful transmission of HEV from orally inoculated pigs to sentinel ones. Other experiments showed that pigs with direct contact exposure to positive controls got also infection, but those controls were inoculated IV (Meng et al., 1998a; Kasorndorkbua et al., 2004; Bouwknecht et al., 2008a).

Most of HEV experimental infections have mainly used faeces from infected pigs as inocula (Meng et al., 1998b; Kasorndorkbua et al., 2002, 2004; Lee et al., 2008). In contrast, this study used bile from a naturally infected pig; this animal had higher amount of HEV genome copies in bile than faeces (data not shown). The used bile was previously tested by ELISA to ensure that specific IgG antibodies that may hinder HEV infection progress were not present.

The preliminary study performed demonstrated that the bile recovered from a naturally infected animal was infectious for pigs when inoculated IV. Two of the pigs (A and B) got infection because of the IV inoculation of the bile; however, a third pig only showed evidence of infection by RT-PCR at the end of the experiment, suggesting that infection probably occurred by oro-faecal transmission due to contact with the other two. The lack of virus detection in faeces and blood of this animal previous to its detection in bile may suggest that liver is the primary site of HEV replication, as described in other IV experimental infection (Lee et al., 2008); therefore, bile would be one of the most important samples to find the virus, as has also been suggested under natural infection conditions (de Deus et al., 2007). It is worthy to note that a fourth animal did not show evidence of infection during the whole experimental period, which suggests an inadequate IV inoculation but also an apparent difficulty of horizontal transmission from infected pigs.

Faecal-oral route is believed to be the natural route of HEV transmission among pigs (Meng and Halbur, 2006; de Deus et al., 2008a). In fact, a recent study demonstrated the potential of HEV to cause epidemics in populations of pigs since the basic reproduction ratio (R_0) for contact-exposure was estimated to be 8.8 (Bouwknegt et al., 2008a). In the present study, pigs could be infected orally and they were able to infect animals in contact. A previous study demonstrated that faeces containing a high titer of HEV (10^6 GEs/g) was

able to infect animals when they were inoculated orally, but three inoculations of 15 g of faeces each were necessary to infect only one out of 3 animals (Kasorndorkbua et al., 2004). Although the present work has reproduced HEV infection successfully by oral inoculation, the infection rate was less efficient than when using IV inoculation, and orally inoculated animals showed faecal shedding and seroconversion later compared with IV inoculations (Tsarev et al., 1994; Kasorndorkbua et al., 2004, 2005). Moreover, in the study cited above, pigs inoculated IV with an HEV dose of 10^6 GEs shed the same concentration of viral particles in faeces (Kasorndorkbua et al., 2004). In contrast, pigs from the present study inoculated orally with an HEV dose of 10^5 GEs excreted much lower concentrations of virus in faeces (data not shown).

McCaustland et al. (2000) described that multiple variables may influence the outcome of HEV infection: virus titer, the ratio of infectious to defective particles, the route of infection and host factors such as immune status and age of exposure. The present results showed that a single dose of 10^5 GEs is insufficient to induce a large infection rate, since only four out of 16 inoculated pigs got measurable infection. Moreover, these four pigs could only infect two contact animals. Thus, it remains unclear whether oral route explains the high incidence of HEV infection in pig population (Meng and Halbur, 2006; Leblanc et al., 2007; Satou and Nishiura, 2007; Seminati et al., 2008). Some studies attributed this difference between experimental and natural conditions to the repeated exposure of animals to HEV that is probably needed for a successful transmission (Kasorndorkbua et al., 2002, 2004, 2005). On the other hand, pigs kept under experimental facilities imply box cleaning every day and, therefore, pigs probably do not have the same HEV infectious pressure as pigs in conventional farms where slurry is not often removed during all the growing period.

How host factors influence HEV infection when pigs are inoculated orally is still not known (Kasorndorkbua et al., 2004). In the present study, all 16 inoculated pigs received the same dose, but a variety of responses was seen. Several facts might explain such response variability to infection. On one hand, conventional pigs usually have remaining humoral immunity of maternal origin. In the present study, half of these inoculated animals had residual IgG antibodies at the beginning of the study. Although this fact would apparently be detrimental to achieve infection, 3 out of the 4 pigs that got infection (No. 87, 94 and 95) had some residual HEV antibodies, while only one of them was seronegative to the

virus. On the other hand, it has been described that host mucosal immunity in the alimentary tract could play a role in the susceptibility to HEV infection (Kasorndorkbua et al., 2002). It is feasible that IgA may neutralize the virus on mucosal surfaces (Tizard, 2000), which would explain the highest efficiency of IV inoculations than oral ones. Recent studies have demonstrated that IgA maternal antibodies can be transferred to piglets (de Deus et al., 2008a). On the other hand, at least in dogs, this immunoglobulin can be present in bile to high amounts (German et al., 1998); it cannot be ruled out that a strong IgA positivity in bile used as inoculum might interfere the outcome of HEV infection. In the present work, IgA antibodies were not determined, so it remains unknown the role of them in the success of oral infections.

Data obtained on virus shedding and seroconversion agree with results showed in a previous oral inoculation study in which only one animal got infection (Kasorndorkbua et al., 2004). This animal started to shed virus in faeces from 21 dpi to 35 dpi and seroconverted by 56 dpi; bile was not tested in the mentioned study. In contrast, some differences are observed when comparing data from oral inoculations and IV ones. When animals are inoculated IV, virus in faeces is firstly detected at 7 dpi and lasts up to 3 weeks. Virus in bile is firstly detected at 3 dpi and seroconversion appears only 2 weeks after challenge (Halbur et al., 2001). Oral intake of HEV needs to pass through the intestinal tract, which implies a delayed appearance of virus in faeces and bile as well as seroconversion compared to IV inoculation (Kasorndorkbua et al., 2004; Bouwknegt et al., 2008a). Moreover, the same dose given by one or the other route show different bioavailability, which means that the real amount of virus inoculated *per os* reaching the systemic circulation, can be rather low.

It has been described that HEV RNA is more frequently detected in faeces and for longer periods than in blood (Wu et al., 2002; de Deus et al., 2007; Leblanc et al., 2007). Therefore, to certain degree, it should not be surprising that viraemia was not detected in the present study. It is possible that a localized HEV replication in the intestines, low amounts of HEV particles in serum as a consequence of the low infection pressure, or an intermittent viraemia could explain the negative results of RT-PCR of studied pigs in sera.

Transmission of HEV infection to contact sentinels appeared approximately 1 month after HEV-excretion occurrence in inoculated pigs. In an experimental infection performed to

quantify the transmission of HEV among pigs showed that this period was only 6 days for contact sentinels exposed to pigs previously in contact with IV infected animals (Bouwknegt et al., 2008a). This result is in contrast with data from the present study, but the source of infection (IV versus oral) may explain a much lower infection pressure for the latter inoculation route, thus, reducing the probability of infection and prolonging the period between exposure and infection.

The histopathological liver lesions observed in only five animals were slight and could not have any relation to virus detection since only one of these pigs got infection. In fact, it has been described that mild, non-suppurative hepatitis can be considered as normal background of pig liver (Halbur et al., 2001). In regards the five animals that died naturally during the second experiment, they probably were carriers of common pathogens from the farm origin and, when specific maternal immunity waned, bacteria were able to cause disease in a limited number of pigs.

In conclusion the results from this study demonstrated that pigs orally inoculated with a single HEV dose of 10^5 GEs got infection. Although few animals had evidence of infection, thus confirming the more difficult reproduction of an oral HEV infection than IV one, those animals were able to successfully transmit the virus to direct contact exposure sentinels.

7. Discussió General

L'any 1998 es diagnosticà el primer cas d'hepatitis E (HE) aguda en un pacient d'Estats Units sense historial d'haver viatjat a països considerats endèmics, especialment d'Àsia i Àfrica (Kwo et al., 1997; Schlauder et al., 1998). Encara que el nou aïllat estava relacionat genèticament amb els aïllats de Burma (genotip 1) i Mèxic (genotip 2), formava un grup completament diferenciat, per la qual cosa se l'anomenà genotip 3. Posteriorment, es van anar identificant altres casos especialment a països d'Europa, Amèrica del Nord i Japó, cosa per la qual es va suposar que l'HE era una malaltia autòctona dels països industrialitzats (Buti et al., 2004; Péron et al., 2006; Takahashi et al., 2001). La identificació del VHE en diverses espècies animals, especialment en el porc, i amb seroprevalències molt elevades va fer sospitar que es pogués tractar d'una zoonosis. Des d'aleshores, una de les principals qüestions en l'estudi del VHE ha estat considerar-lo o bé un agent emergent tant en la població humana com porcina, o bé una infecció present en els països industrialitzats des de fa molt de temps (Inoue et al., 2009; Lewis et al., 2008).

En base als resultats obtinguts en l'estudi serològic retrospectiu (**estudi I**), es demostra que la infecció pel VHE està present a la població porcina espanyola almenys des de l'any 1985. De fet, a l'Índia i al Japó, també s'ha confirmat que hi és present d'ençà d'aquest mateix període, tant en la població porcina com en els humans (Arankalle et al., 2003; Okamoto et al., 2003). El fet que no hi hagi diferències significatives entre les prevalències al llarg dels 13 anys analitzats indica, probablement, que la circulació del VHE és endèmica entre els porcs. Cal destacar que, si bé la infecció pel VHE és endèmica a la població porcina, no significa que també ho sigui a la població humana. Les seroprevalències trobades entre la població de donants reflecteixen un grau d'exposició baix al virus que explicarien les infeccions inaparents i els casos esporàdics de malaltia que es troben en aquestes zones.

Tot i que per aquest estudi es disposava de mostres d'animals de qualsevol edat, només es seleccionaren les mares pel fet que eren els animals que en presència d'infecció tenien més probabilitat d'haver seroconvertit (Seminati et al., 2008). Per a cada comunitat autònoma (CCAA), s'agafaren totes les granges de què es disposava; per tant, la selecció no es va fer en funció del cens de porcí de cada zona. Així doncs, en total es varen incloure 2871 sèrums que corresponien a 208 granges de diferents CCAA en diferent proporció.

D'aquest estudi també es desprèn que, en un 98% (interval de confiança: 96.1-99.9%) de les granges espanyoles, circula el VHE i que el percentatge mitjà d'animals seropositius a una granja és del 47.8% (desviació estàndard (DS): 25.1). Aquestes seroprevalences són comparables a dades anteriors obtingudes a Espanya (Seminati et al., 2008) i a granges porcines d'altres països europeus: 85.5% al Regne Unit; 58% a Suècia i 23.5% als Països Baixos (Banks et al., 2004b); i no europeus: 68.9% a Estats Units (Meng et al., 1997); 75% a Nova Zelanda (Garkavenko et al., 2001); 78.8% a Xina (Wang et al., 2002); 59.5% a Canadà (Yoo et al., 2001) i 63.6% a Brasil (Vital et al., 2005). Tot i que hi ha diferències entre països, la mitjana de porcs seropositius de 16 països diferents calculada per Vasickova et al. (2007) és d'un 44% (DS: 24.2).

El temps transcorregut i les condicions de conservació de les mostres podien haver afectat la qualitat d'aquestes i produir falsos positius. Per resoldre aquest problema en la realització de l'ELISA es va utilitzar doble pouet (antigenat i no antigenat) en totes les mostres de l'estudi i, a més a més, aquelles que tenien valors molt propers al cut-off també es van testar per dot-blot. Aquesta tècnica només es va realitzar en sèrums dels 3 primers anys (1985, 1986 i 1987) perquè només es volia confirmar que la infecció del VHE era una malaltia que feia temps que hi era. A més, el dot-blot és un mètode molt més sensible i específic que l'ELISA (Porat et al., 1995; Roda et al., 2004) i, per tant, encara que d'una banda va augmentar el nombre de positius vertaders (de 64 sèrums analitzats, 38 eren positius per ELISA i 58 per dot-blot), per l'altra, va assegurar que els sèrums testats per ELISA eren realment positius. Només haguéssim testat sèrums més recents en cas que haguéssim tingut una proporció molt baixa de positius per ELISA.

Durant la realització d'aquesta tesi, i com a part del projecte del Ministeri, es dugué a terme l'estudi de la infecció pel VHE en una granja de cicle tancat (de Deus et al., 2008a). Aquest estudi va permetre entendre la dinàmica d'infecció en una granja infectada endèmicament on els animals, després de perdre els anticossos maternals aproximadament cap a les 9 setmanes, es començaven a infectar, de manera que a les 22 setmanes de vida tots els animals havien seroconvertit. Resultats similars s'havien obtingut en estudis anteriors com el realitzat per Meng et al. (1997). Els resultats de l'**estudi II** indiquen que no totes les granges de cicle tancat segueixen la mateixa dinàmica

d'infecció pel VHE. Tot i que es demostrí que el virus és present en totes elles, ja que les mares tenen anticossos anti-HEV i es produeix infecció natural dels garrins en algun moment del cicle productiu, a les granges 2 i 4 més de la meitat d'animals no són positius a anticossos a l'edat adulta. Aparentment, aquest possible retard en la infecció es podria atribuir a diversos factors com: un lot concret d'animals, el manteniment de les garrinades inicials, una major neteja i desinfecció o un maneig tot-dins-tot-fora estricte (Nakai et al., 2006; Li et al., 2009a). Alguns estudis demostren que l'aplicació de mesures de bioseguretat estrictes poden arribar a reduir significativament la incidència del VHE a les granges porcines (Wu et al., 2002; Li et al., 2009b).

Per poder esbrinar realment quins són els factors relacionats amb la dinàmica d'infecció caldria fer un estudi amb moltes més granges, realitzar una enquesta acurada de les característiques d'aquestes i determinar els factors que significativament estiguessin més relacionats amb el fet de seroconvertir més tard o més d'hora. De totes maneres, d'aquest estudi se'n pot dependre que per conèixer el seroperfil d'infecció del VHE en una granja concreta cal realitzar-lo específicament. Es podria recomanar realitzar un seroperfil amb un total de 5 mostrejors semblants als que s'han realitzat en aquest estudi: 1 setmana de vida; 4-5 setmanes; 7-8 setmanes; 15-16 setmanes i finals d'engreix.

Actualment encara no es coneixen els mecanismes que el VHE utilitza per mantenir-se en una granja i poder persistir al llarg dels anys. Un dels objectius d'aquest segon treball era esbrinar el paper de les mares com a possible reservori del virus a l'explotació. Per això es recolliren mostres de les mares 2 setmanes abans del part i durant la lactació, així com els fills d'algunes d'aquestes mares. En cas que s'haguessin aïllat soques semblants entre mare i fill podríem haver explicat aquesta hipòtesi inicial. Desafortunadament, molt poques mares resultaren positives i els garrins positius eren d'altres garrinades. Per poder estudiar aquest aspecte de la infecció del VHE, es podria dissenyar un estudi on se seguís un nombre considerable de mares i fills, a principis i a finals de la lactació. En augmentar el nombre d'animals, els percentatges d'infectats també ho farien i hi hauria més probabilitats de trobar mares amb els seus corresponents fills infectats. Segurament, però, el virus utilitza diferents "estratègies" per persistir a les explotacions. En ser un virus sense embolcall, és molt resistent a la dessecació i a molts desinfectants com els fenols, amoníac, quaternaris o la clorhexidina. Un mostreig de les sales, abeuradors i menjadores, especialment de transició i engreix, abans i després de la neteja i desinfecció, ens ajudaria

a saber si el VHE es manté a l'ambient i per tant, si pot infectar fàcilment cada lot de producció.

Segons alguns autors, la regió d'aproximadament 300-450 nt (corresponent als nt 5994 i 6294 del genoma M73218⁴) situada a l'extrem 5' de l'ORF2 és la més conservada entre tots els aïllats de VHE, alhora que és la que millor es correlaciona amb l'anàlisi filogenètica del genoma complet (Lu et al., 2006; Legrand-Abravanel et al., 2009). El fragment amplificat en l'estudi II era de 168 nt i corresponia als nt 6096 i 6307 de la càpsida (veure Annex I). Malgrat que teòricament aquesta regió podia determinar acuradament genotips i subtipus, en fer l'arbre filogenètic amb altres aïllats de genotip 3, els *bootstraps* eren molt baixos, a més de donar resultats inconsistents quant a la divisió dels subtipus. Per tant, per poder determinar els subgrups del genotip 3 a què corresponien les soques, segurament hauríem d'haver amplificat una regió més gran del genoma. Malgrat això, l'anàlisi de seqüències de l'estudi dóna informació suficient per determinar que, en una mateixa granja i en un mateix animal en diferents moments de la seva vida, poden coexistir dues soques diferents del virus.

El percentatge d'animals que arribaren positius a l'escorxador va ser d'un 12%, dels quals un 6% eren fetges i l'altre 6% eren bilis, on els animals positius a una mostra no ho eren per l'altra. Molts d'aquests animals que arribaren infectats a l'escorxador no se'ls detectà ni virèmia ni excreció fecal durant les setmanes 13 o 18. Seria erroni dir que aquests animals s'infectaren al final del cicle productiu, ja que segurament el fet de mostrejar uns dies concrets i que sovint la virèmia i l'excreció fecal són intermitents no deurien permetre detectar el VHE. En alguns animals, però, el virus ja era present a l'engreix (13 o 18 setmanes) així com al sacrifici, i a més s'amplificaren aïllats lleugerament diferents. El més segur és que aquests animals s'infectessin, no necessàriament al mateix moment, per dues soques diferents del virus (de Deus et al., 2008a). De totes maneres, cal plantejar-se la possibilitat que el virus pogués tenir la capacitat de persistir durant llargs períodes de temps als òrgans diana, de manera que poguessin arribar animals positius a l'escorxador havent-se infectat fa temps. En aquests casos, el virus present al fetge podria tornar a excretar-se per l'estrès durant el transport cap a l'escorxador o a les sales d'espera, com s'ha descrit en el cas de la infecció per *Salmonella* (Isaacson et al., 1999). Aquesta

⁴ M73218 correspon a la seqüència de genotipus 1 amplificada per Tam et al., 1991.

reactivació podria arribar a representar un risc per a la contaminació de canals durant l'etapa d'evisceració.

Malgrat que només dos treballs hagin descrit amb total seguretat la transmissió d'origen alimentari del VHE (Tei et al., 2003; Li et al., 2005b), altres estudis han comprovat que la ingestió de carn o despulles de porc pot ser un important factor de risc d'infectar-se pel VHE (Yazaki et al., 2003; Mizuo et al., 2005; Mansuy et al., 2008; Toyoda et al., 2008). Tot i així, per valorar aquest risc cal tenir en compte els costums alimentaris de cada regió. Al Japó, per exemple, hi ha força costum de menjar el fetge de porc molt poc cuinat, però no és el cas d'Espanya o altres països europeus⁵ (Serra Majem et al., 2007). Al nostre país només podria arribar a suposar un risc el consum de carn poc feta o certs embotits poc curats.

Els resultats de l'**estudi III** demostren que la mostra de sèrum i de suc muscular tenen resultats comparables i que, per tant, ambdues poden ser utilitzades pel control serològic del VHE a les granges porcines. Aquesta tècnica, ja utilitzada en el monitoratge d'altres infeccions porcines com la salmonel·losi (Nielsen et al., 1998), facilita el mostreig d'aquests animals a l'escorxador. D'aquesta manera es pot conèixer de manera ràpida el percentatge d'animals seropositius al moment del sacrifici i, en conseqüència, l'estatus de la granja en relació a la infecció pel VHE.

La tècnica desenvolupada, però, no dóna informació de la presència del virus a la canal. Per això, seria recomanable ampliar aquest estudi analitzant les mostres de múscul mitjançant RT-PCR i avaluar, així, el risc que podria representar aquesta mostra per a les persones. De fet, un estudi recent demostra que els animals infectats experimentalment poden arribar a contenir el virus en múscul fins un mes després de la infecció (Bouwknegt et al., 2009). Per tal de determinar la presència del VHE en porcs d'escorxador, es recomanaria agafar mostres de múscul, sobretot de les parts comercials (llom, costella, etc.) i de vísceres, especialment dels intestins, pel risc que podria suposar la seva manipulació i possible contaminació creuada de la canal.

⁵ Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food (UK). Hepatitis E (ACM/766) (2005) <http://acmsf.food.gov.uk/acmsfmeets/acmsf2005/acmsfmeet021205/acmsfmin011205> (consultat 18 juny 2009)

En l'**estudi IV** es va realitzar una infecció experimental per tal d'estudiar la patogènia del VHE per inoculació oral en l'espècie porcina. La descripció d'un model animal mitjançant la via més probable de transmissió entre els porcs també ajudaria a entendre el mecanisme que utilitza el VHE per tal de mantenir-se i circular dins d'una mateixa granja i entre granges. Fins al moment de l'inici d'aquest estudi, les infeccions que s'havien dut a terme per tal de demostrar la transmissió oral del VHE en porcs no eren prou convincents. Tan sols Kasorndorkbua et al. (2004) va aconseguir que 1 animal de 3 excretés el virus en femtes i seroconvertís després de la inoculació oral de 15 g de femtes durant 3 dies consecutius.

Els resultats de l'estudi IV confirmen la dificultat d'infectar porcs per via oral ja que només 4 de 16 animals inoculats desenvoluparen infecció. Malgrat el poc nombre d'animals infectats, aquests van ser capaços de transmetre la infecció a animals en contacte. Aquest últim punt s'ha de considerar com una novetat significativa d'aquesta tesi, donat que els models habituals de transmissió utilitzen porcs infectats via intravenosa. De fet, l'ús d'animals inoculats intravenosament com a model per estudiar la infecció natural en els porcs ha permès quantificar la transmissió i, també, explicar el curs de la infecció natural del VHE en animals en contacte (Bouwknegt et al., 2008a i 2009).

La principal dificultat en la realització d'aquest estudi va ser la selecció d'animals lliures d'anticossos anti-HEV, ja que gairebé en el 100% de granges s'ha demostrat la circulació del virus. La granja de la qual provenien els animals del nostre estudi havia estat analitzada anteriorment amb resultats negatius d'ELISA en animals d'engreix (61 animals; DOs entre 0-0.04, mitja: 0.009 i DS: 0.009). En aquells moments es va assumir que la granja d'origen era seronegativa enfront del VHE. No obstant, no fou fins als estudis epidemiològics realitzats posteriorment que ens permeté adonar-nos que en alguns casos les truges són seropositives però el seu engreix pot mantenir-se negatiu. La selecció d'animals de 2 setmanes de vida positius a ELISA, tant a la infecció preliminar com en la definitiva, va implicar la inoculació d'animals que encara tenien anticossos maternals. La millor opció hagués estat realitzar la inoculació setmanes més tard perquè els títols haguessin baixat; però el calendari estricte de les instal·lacions feia impossible retardar la infecció. Una altra opció hauria estat seleccionar animals més grans que ja haguessin perdut els anticossos i

que encara no s'haguessin infectat, o bé utilitzar animals privats de calostre. No obstant, el model utilitzat es pot considerar perfectament com un model natural vàlid, en el qual un cert percentatge de porcs que s'infecten encara presenten immunitat maternal residual.

A més a més, a part de la detecció d'immunoglobulines IgG dies abans de la inoculació, hauria estat interessant haver mesurat els títols d'IgA tant en els animals com en l'inòcul utilitzat. Per una banda, s'ha demostrat que aquests anticossos poden transferir-se passivament de mare a fill tenint una durada aproximada de 3-4 setmanes (de Deus et al., 2009a); de fet, la proporció d'IgA respecte d'IgM i IgG augmenta considerablement a la llet materna després de la presa de calostre, demostrant-se que tenen un paper molt important en la immunitat intestinal del garrí durant tota la lactació (Porter et al., 1970). Per tant, hagués estat d'interès haver mesurat per una banda les IgA al sèrum i, per una altra, esperar el temps suficient perquè les defenses intestinals haguessin desaparegut completament després del deslletament.

Inicialment, estava previst preparar l'inòcul del segon estudi a partir de fetge o bilis recuperats dels animals de la infecció preliminar. No obstant, la poca quantitat de virus que contenia la bilis d'aquests, va fer que s'optés per utilitzar el mateix que a la primera prova. Cal tenir en compte que, encara que l'inòcul utilitzat tenia un títol de 10^5 GE/ml, no podem assegurar que la proporció de partícules infectives fos la mateixa.

Segons Bouwknecht et al. (2008a), la primera evidència de la infecció pel VHE és la detecció fecal del virus durant 2-3 setmanes, generant-se subseqüentment virèmia i seroconversió. Tot i que en el present treball l'excreció fecal només durà 1-2 setmanes i, a més, no es detectà virèmia en cap dels animals, alguns d'ells mostraren seroconversió i en altres es detectà el virus a la bilis. A més, es confirmà per dot-blot la presència d'anticossos específics enfront al VHE (resultats no mostrats). Podem confirmar, doncs, que en base a la resposta humoral generada i a la detecció de virus en femtes, que tant els animals inoculats com els porcs en contacte s'infectaren.

Quant a les diferències d'eficiència observades en les infeccions experimentals, es pot considerar el subtipus de soca utilitzada. En el nostre estudi la soca SWP6/EU723514/Spain està classificada al genotip 3 subtipus f (Peralta et al., 2009c). En canvi, tot i que encara no s'ha confirmat el subtipus al qual pertany la soca utilitzada a l'estudi de Bouwknecht et al. (2008a), hi ha evidències que pertanyi al 3e (Rutjes et al.,

2009; Saskia A. Rutjes⁶, comunicació personal). Recentment s'ha descrit que el canvi d'un aminoàcid en la regió de l'helicasa pot estar associat amb una major virulència del genotip 3 (Takahashi et al., 2009).

Durant la realització d'aquesta tesi es va posar a punt un ELISA indirecte utilitzant com antigen una proteïna de l'ORF2 purificada, obtinguda a partir d'una soca autòctona de VHE porcí i expressada en cultiu cel·lular. Els resultats obtinguts amb aquesta proteïna eren equiparables als resultats amb la proteïna Sar-55 corresponent al genotip 1 ($kappa=0,82$) (Peralta et al., 2009a). D'aquesta manera, en l'estudi retrospectiu (estudi I) es va utilitzar la proteïna Sar-55, mentre que en els altres 3 ja es va utilitzar la proteïna desenvolupada al nostre laboratori. A fi de comparar els ELISA anti-HEV utilitzats en els diferents laboratoris d'Europa, es va dur a terme un *ring trial* (prova de l'anell) on van participar un total de 9 instituts, entre ells el CRESA. Vuit dels 9 laboratoris van ser capaços de detectar com a positiu un sèrum no diluït d'un animal infectat experimentalment amb VHE de genotip 3. Al CRESA es va testar tant la proteïna Sar-55 com l'expressada en cultiu cel·lular i els resultats s'equiparaven als dels altres laboratoris (Wim van der Poel⁷, resultats no publicats).

Els encebadors utilitzats es varen dissenyar l'any 2003 a partir de seqüències dipositades al Genbank (Martín et al., 2007). S'inclogueren soques americanes i japoneses d'origen porcí de genotip 3, una soca japonesa porcina de genotip 4, una soca espanyola d'origen humà de genotip 3 i una soca espanyola de genotip 1 detectada a partir d'aigües residuals urbanes. Encara que fins al moment a Europa no s'hagin descrit aïllats porcins de VHE diferents del genotip 3, podria ser interessant utilitzar un nou joc d'encebadors dirigit a la detecció de cada un dels genotips i, especialment, pel genotip 4.

Tot i els nombrosos estudis realitzats fins ara per tal de conèixer les vies de transmissió del VHE en els països industrialitzats, encara queden moltes preguntes per resoldre. Malgrat que la majoria d'aquests estudis s'han realitzat en l'espècie porcina, l'existència d'altres

⁶ National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands.

⁷ Animal Science Group of Wageningen UR, Department of Infectious Diseases, Lelystad, The Netherlands.

espècies animals seropositives enfront el VHE suggereix que hi pot haver altres espècies que poden ser-ne reservori (Peralta et al., 2009b). Alhora, també caldria estudiar el risc potencial de transmissió a través dels conreus on s'aboquen purins o arriben aigües residuals de granges i, en conseqüència, es pot produir la contaminació pel VHE dels vegetals o fruits.

Respecte a l'espècie porcina, seria important conèixer els productes que poden arribar contaminats al consum i alhora estudiar la viabilitat del virus en cada un dels processos de transformació. Per tal de predir el risc que suposarien els productes derivats del porc cap a les persones, caldria desenvolupar una anàlisi de risc de tipus quantitatiu que abastés totes les etapes de producció: de la granja a la taula. Aquesta anàlisi ajudaria a conèixer quins són els punts crítics de control pel VHE en tota la cadena de producció. De manera general, s'ha vist que els purins, el contacte amb porcs i la manipulació d'òrgans d'animals infectats (fetge, bilis, múscul, etc.) podrien representar un risc per a les persones (Fernández-Barredo et al., 2006; Feagins et al., 2007; de Deus et al., 2009a). Per tal de reduir aquest risc, és important el seguiment de les mesures higièniques bàsiques. A la granja, s'aconsellaria especialment després de manipular animals i a les necròpsies; mentre que a l'escorxador, s'hauria d'evitar que no es produís contaminació creuada entre vísceres i la canal.

8. Conclusions

1. La infecció pel virus de l'hepatitis E està present a la població porcina espanyola almenys des de l'any 1985. L'anàlisi d'un nombre significatiu de mostres porcines incloent sèrums de tota Espanya ha permès confirmar que el VHE és present a la majoria de granges (98%) amb un percentatge mitjà d'animals seropositius dins la granja proper al 50%. Les prevalences es mantenen estables al llarg dels anys indicant probablement que la infecció pel VHE és endèmica a les explotacions porcines des de fa dècades.
2. L'estudi longitudinal de 6 granges de cycle tancat, amb sistemes de producció i densitats d'animals semblants, ha mostrat que les granges poden tenir dinàmiques d'infecció diferents. Els animals poden arribar a l'edat de sacrifici sent seronegatius però havent-se infectat al final de l'engreix, portant així el virus a l'escorxador.
3. L'anàlisi de 19 seqüències de VHE detectades en l'estudi longitudinal indica que totes elles pertanyen al genotip 3. En una mateixa granja i en un mateix animal en diferents moments de la seva vida productiva, poden detectar-se almenys dues soques diferents del virus.
4. Els resultats de l'estudi prospectiu demostren que el fetge i la bilis poden estar contaminats pel VHE al moment del sacrifici. Aquests òrgans poden representar un risc per a les persones, especialment durant la seva manipulació i per la possible contaminació creuada amb altres aliments frescos.
5. El suc de carn obtingut a partir de diafragma pot ser utilitzat com a mètode de diagnòstic alternatiu al sèrum per la detecció d'anticossos mitjançant ELISA enfront el VHE en porcs d'escorxador.
6. Els resultats obtinguts en la infecció experimental demostren la dificultat de reproduir la infecció oral del VHE ja que una sola dosi de 10^5 GEs/ml de bilis només és capaç d'infectar 4 de 16 animals. Per altra banda, els animals que s'han infectat han estat capaços de transmetre amb èxit la infecció per contacte directe a porcs sentinella.

9. Bibliografia

- Aggarwal, R., Krawczynski, K., 2000, Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol* 15, 9-20.
- Aguilera Guiraoa, A., Romero Yusteb, S., Regueiroa, B.J., 2007, Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24, 264-76.
- Ahn, J.M., Rayamajhi, N., Gyun Kang, S., Sang Yoo, H., 2006, Comparison of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nested or commercial reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of hepatitis E virus particle in human serum. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56, 269-274.
- Anonymous, 2007. INE: Anuario estadístico de España 2007: Agricultura, caza y pesca: http://www.ine.es/prodyser/pubweb/anuario07/anu07_12agric.pdf.
- Arankalle, V.A., Chobe, L.P., Walimbe, A.M., Yergolkar, P.N., Jacob, G.P., 2003, Swine HEV infection in south India and phylogenetic analysis (1985-1999). *J Med Virol* 69, 391-396.
- Arankalle, V.A., Chobe, L.P., Joshi, M.V., Chadha, M.S., Kundu, B., Walimbe, A.M., 2002, Human and swine hepatitis E viruses from Western India belong to different genotypes. *J Hepatol* 36, 417-425.
- Arankalle, V.A., Paranjape, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Walimbe, A.M., 1999, Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). *J Gen Virol* 80 (Pt 7), 1691-1700.
- Atiq, M., Shire, N.J., Barrett, A., Rouster, S.D., Sherman, K.E., Shata, M.T., 2009, Hepatitis E virus antibodies in patients with chronic liver disease. *Emerg Infect Dis* 15, 479-481.
- Balayan, M.S., Usmanov, R.K., Zamyatina, N.A., Djumaliev, D.I., Karas, F.R., 1990, Brief Report: Experimental Hepatitis E Infection in Domestic Pigs. *J Med Virol* 32, 58-59.
- Balayan, M.S., Andjaparidze, A.G., Savinskaya, S.S., Ketiladze, E.S., Braginsky, D.M., Savinov, A.P., Poleschuk, V.F., 1983, Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 20, 23-31.
- Banks, M., Grierson, S., Fellows, H.J., Stableforth, W., Bendall, R., Dalton, H.R., 2007, Transmission of hepatitis E virus. *Vet Rec* 160, 202.
- Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J., Dalton, H., 2004a, Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 10, 953-955.
- Banks, M., Heath, G.S., Grierson, S.S., King, D.P., Gresham, A., Girones, R., Widen, F., Harrison, T.J., 2004b, Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet Rec* 154, 223-227.
- Berke T., Matson, D.O.2000. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol* 145(7), 1421-1436
- Bhatia, V., Singhal, A., Panda, S.K., Acharya, S.K., 2008, A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse? *Hepatology* 48, 1577-1585.
- Billam, P., Huang, F.F., Sun, Z.F., Pierson, F.W., Duncan, R.B., Elvinger, F., Guenette, D.K., Toth, T.E., Meng, X.J., 2005, Systematic pathogenesis and replication of avian hepatitis E virus in specific-pathogen-free adult chickens. *J Virol* 79, 3429-3437.

- Bouwknegt, M., Rutjes, S.A., Reusken, C.B., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M.C., de Roda Husman, A.M., Poel, W.H., 2009, The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* 5, 7.
- Bouwknegt, M., Frankena, K., Rutjes, S.A., Wellenberg, G.J., de Roda Husman, A.M., van der Poel, W.H., de Jong, M.C., 2008a, Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res* 39, 40.
- Bouwknegt, M., Rutjes, S., Van der Poel, W., Frankena, K., Wellenberg, G., De Jong, M., De Roda Husman, A. M. 2008b. Hepatitis E in pigs in the Netherlands. *Proceedings COST Action 929, Pisa*.
- Bouwknegt, M., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W.H., Rutjes, S.A., de Roda Husman, A.M., 2007, Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot* 70, 2889-2895.
- Bradley, D.W., Krawczynski, K., Cook, E.H., Jr., McCaustland, K.A., Humphrey, C.D., Spelbring, J.E., Myint, H., Maynard, J.E., 1987, Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm viruslike particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6277-6281.
- Buisson, Y., Grandadam, M., Nicand, E., Cheval, P., van Cuyck-Gandre, H., Innis, B., Rehel, P., Coursaget, P., Teyssou, R., Tsarev, S., 2000, Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria. *J Gen Virol* 81, 903-909.
- Buti, M., Dominguez, A., Plans, P., Jardi, R., Schaper, M., Espunes, J., Cardenosa, N., Rodriguez-Frias, F., Esteban, R., Plasencia, A., Salleras, L., 2006, Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin Vaccine Immunol* 13, 1328-1332.
- Buti, M., Clemente-Casares, P., Jardi, R., Formiga-Cruz, M., Schaper, M., Valdes, A., Rodriguez-Frias, F., Esteban, R., Girones, R., 2004, Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J Hepatol* 41, 126-131.
- Buti, M., Jardi, R., Cotrina, M., Rodriguez-Frias, F., Troonen, H., Viladomiu, L., Esteban, J.I., Esteban, R., Guardia, J., 1995, Hepatitis E virus infection in acute hepatitis in Spain. *J Virol Methods* 55, 49-54.
- Cacopardo, B., Russo, R., Preiser, W., Benanti, F., Brancati, G., Nunnari, A., 1997, Acute hepatitis E in Catania (eastern Sicily) 1980-1994. The role of hepatitis E virus. *Infection* 25, 313-316.
- Caprioli, A., Martelli, F., Ostanello, F., Di Bartolo, I., Ruggeri, F.M., Del Chiaro, L., Tolari, F. 2007. Detection of hepatitis E virus in Italian pig herds. *Vet Rec* 161, 422-423.
- Caron, M., Enouf, V., Than, S.C., Dellamonica, L., Buisson, Y., Nicand, E., 2006, Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol* 44, 3440-3442.
- Clayson, E.T., Innis, B.L., Myint, K.S., Narupiti, S., Vaughn, D.W., Giri, S., Ranabhat, P., Shrestha, M.P., 1995, Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 53, 228-232.
- Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martín, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2003, Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis* 9, 448-454.
- Cooper, K., Huang, F.F., Batista, L., Rayo, C.D., Bezanilla, J.C., Toth, T.E., Meng, X.J., 2005, Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from

- pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol* 43, 1684-1688.
- Cubitt, D., Bradley, D.W., Carter, M.J., Chiba, S., Estes, M.K., Saif, L.J., Schaffer, F.L., Smith, A.W., Studdert, M.J., Thiel, H.J., 1995, *Caliciviridae*. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., Summers, M. D. (Eds.), *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Springer-Verlag, Vienna & New York, pp. 359-363.
- Chandler, J.D., Riddell, M.A., Li, F., Love, R.J., Anderson, D.A., 1999, Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet Microbiol* 68, 95-105.
- Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M., Jameel, S., 2008, Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* 33, 451-464.
- Chauhan, A., Jameel, S., Dilawari, J.B., Chawla, Y.K., Kaur, U., Ganguly, N.K., 1993, Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 341, 149-150.
- Dalton, H.R., Bendall, R., Ijaz, S., Banks, M., 2008, Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis* 8, 698-709.
- de Deus, N., Casas, M., Peralta, B., Nofrarias, M., Pina, S., Martín, M., Segalés, J., 2008a, Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol* 132, 19-28.
- de Deus, N., Peralta, B., Pina, S., Allepuz, A., Mateu, E., Vidal, D., Ruiz-Fons, F., Martín, M., Gortazar, C., Segalés, J., 2008b, Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol* 129, 163-170.
- de Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martín, M., Segalés, J., 2007, Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol* 119, 105-114.
- Deest, G., Zehner, L., Nicand, E., Gaudy-Graffin, C., Goudeau, A., Bacq, Y., 2007, [Autochthonous hepatitis E in France and consumption of raw pig meat]. *Gastroenterol Clin Biol* 31, 1095-1097.
- Di Bartolo, I., Martelli, F., Inglese, N., Pourshaban, M., Caprioli, A., Ostanello, F., Ruggeri, F.M., 2008, Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol* 132, 47-55.
- Duffy, S., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., 2008, Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 9, 267-276.
- Emerson, S.U., Arankalle, V.A., Purcell, R.H., 2005, Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 192, 930-933.
- Emerson, S.U., Anderson, D., Arankalle, A., Meng, X.J., Purdy, M., Schlauder, G.G., Tsarev, S.A., 2004, Hepevirus. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy: eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/ Academic Press, London, United Kingdom, pp. 851-855.
- Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2003, Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 13, 145-154.
- Engle, R.E., Yu, C., Emerson, S.U., Meng, X.J., Purcell, R.H., 2002, Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 40, 4576-4580.
- Enouf, V., Dos Reis, G., Guthmann, J.P., Guerin, P.J., Caron, M., Marechal, V., Nicand, E., 2006, 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* 78, 1076-1082.
- Erker, J.C., Desai, S.M., Mushahwar, I.K., 1999, Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J Virol Methods* 81, 109-113.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2008, Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int J Food Microbiol* 123, 32-37.
- Feagins, A.R., Opriessnig, T., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2007, Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol* 88, 912-917.
- Fernandez-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Gomez-Munoz, M.T., Vega, S., Rodriguez-Iglesias, M.A., 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.
- Fernandez-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Vega, S., Gomez, M.T., 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.
- Galiana, C., Fernandez-Barredo, S., Garcia, A., Gomez, M.T., Perez-Gracia, M.T., 2008, Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg* 78, 1012-1015.
- Garkavenko, O., Obriadina, A., Meng, J., Anderson, D.A., Benard, H.J., Schroeder, B.A., Khudyakov, Y.E., Fields, H.A., Croxson, M.C., 2001, Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol* 65, 525-529.
- German, A.J., Hall, E.J., Day, M.J., 1998, Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. *Vet Immunol Immunopathol* 64, 107-121.
- Ghabrah, T.M., Tsarev, S., Yarbough, P.O., Emerson, S.U., Strickland, G.T., Purcell, R.H., 1998, Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *J Med Virol* 55, 134-137.
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., Emerson, S.U., 2006, A Bicistronic Subgenomic mRNA Encodes both the ORF2 and ORF3 Proteins of Hepatitis E Virus. *J. Virol.* 80, 5919-5926.
- Guo, H., Zhou, E.M., Sun, Z.F., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006, Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *J Gen Virol* 87, 217-223.
- Guthmann, J.P., Klovstad, H., Boccia, D., Hamid, N., Pinoges, L., Nizou, J.Y., Tatay, M., Diaz, F., Moren, A., Grais, R.F., Ciglenecki, I., Nicand, E., Guerin, P.J., 2006, A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin Infect Dis* 42, 1685-1691.
- Halbur, P.G., Kasorndorkbua, C., Gilbert, C., Guenette, D., Potters, M.B., Purcell, R.H., Emerson, S.U., Toth, T.E., Meng, X.J., 2001, Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol* 39, 918-923.
- Hall, T.A., 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41:95-98.
- Haqshenas, G., Huang, F.F., Fenaux, M., Guenette, D.K., Pierson, F.W., Larsen, C.T., Shivaprasad, H.L., Toth, T.E., Meng, X.J., 2002, The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and

- human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J Gen Virol* 83, 2201-2209.
- Haqshenas, G., Shivaprasad, H.L., Woolcock, P.R., Read, D.H., Meng, X.J., 2001, Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* 82, 2449-2462.
- Hartmann, W.J., Frösner, G.G., Eichenlaub, D., 1998, Transmission of hepatitis E in Germany. *Infection* 26, 409.
- He, S., Miao, J., Zheng, Z., Wu, T., Xie, M., Tang, M., Zhang, J., Ng, M.H., Xia, N., 2008, Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. *J Gen Virol* 89, 245-249.
- Herremans, M., Duizer, E., Jusic, E., Koopmans, M.P., 2007, Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin a in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin Vaccine Immunol* 14, 276-280.
- Hirano, M., Ding, X., Tran, H.T., Li, T.C., Takeda, N., Sata, T., Nakamura, S., Abe, K., 2003, Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn J Infect Dis* 56, 8-11.
- Hsieh, S.Y., Meng, X.J., Wu, Y.H., Liu, S.T., Tam, A.W., Lin, D.Y., Liaw, Y.F., 1999, Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 37, 3828-3834.
- Huang, W., Zhang, H., Harrison, T.J., Lang, S., Huang, G., Wang, Y., 2008, Cross-protection of hepatitis E virus genotypes 1 and 4 in rhesus macaques. *J Med Virol* 80, 824-832.
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Schommer, S.K., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng, X.J., 2002a, 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.
- 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., Meng, X.J., 2002b, Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States. *J Clin Microbiol* 40, 4197-4202.
- Huang, R., Nakazono, N., Ishii, K., Li, D., Kawamata, O., Kawaguchi, R., Tsukada, Y., 1995, Hepatitis E virus (87A strain) propagated in A549 cells. *J Med Virol* 47, 299-302.
- Huang, C.C., Nguyen, D., Fernandez, J., Yun, K.Y., Fry, K.E., Bradley, D.W., Tam, A.W., Reyes, G.R., 1992a, Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 191, 550-558.
- Huang, R.T., Li, D.R., Wei, J., Huang, X.R., Yuan, X.T., Tian, X., 1992b, Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China. *J Gen Virol* 73, 1143-1148.
- Hussaini, S.H., Skidmore, S.J., Richardson, P., Sherratt, L.M., Cooper, B.T., O'Grady, J.G., 1997, Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J Viral Hepat* 4, 51-54.
- Ijaz, S., Vyse, A.J., Morgan, D., Pebody, R.G., Tedder, R.S., Brown, D., 2009, Indigenous hepatitis E virus infection in England: more common than it seems. *J Clin Virol* 44, 272-276.
- Inoue, J., Ueno, Y., Nagasaki, F., Akahane, T., Fukushima, K., Kogure, T., Kondo, Y., Kakazu, E., Tamai, K., Kido, O., Nakagome, Y., Ninomiya, M., Obara, N., Wakui, Y., Takahashi, M., Okamoto, H., Shimosegawa, T., 2009, Sporadic acute hepatitis E occurred constantly during the last decade in northeast Japan. *J Gastroenterol* 44, 329-337.

- Ippagunta, S.K., Naik, S., Sharma, B., Aggarwal, R., 2007, Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J Med Virol* 79, 1827-1831.
- Irshad, M., 1999, Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics. *Intervirology* 42, 252-262.
- Ishikawa, K., Matsui, K., Madarame, T., Sato, S., Oikawa, K., Uchida, T., 1995, Hepatitis E probably contracted via a Chinese herbal medicine, demonstrated by nucleotide sequencing. *J Gastroenterol* 30, 534-538.
- Jary, C., 2005, Hepatitis E and meat carcasses. *Br J Gen Pract* 55, 557-558.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006, A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131, 65-71.
- Jung, K., Kang, B., Song, D.S., Chae, C., 2007. Prevalence and genotyping of hepatitis E virus in swine population in Korea between 1995 and 2004: a retrospective study. *Vet J* 173, 683-687.
- 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., Purcell, R.H., 1999, Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 61, 331-335.
- Kamili, S., Spelbring, J., Carson, D., Krawczynski, K., 2004, Protective efficacy of hepatitis E virus DNA vaccine administered by gene gun in the cynomolgus macaque model of infection. *J Infect Dis* 189, 258-264.
- Kannan, H., Fan, S., Patel, D., Bossis, I., Zhang, Y.J., 2009, The hepatitis E virus open reading frame 3 product interacts with microtubules and interferes with their dynamics. *J Virol* 83, 6375-6382.
- Kaci, S., Nockler, K., Johne, R., 2008, Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet Microbiol* 128, 380-385.
- Kar, P., Jilani, N., Husain, S.A., Pasha, S.T., Anand, R., Rai, A., Das, B.C., 2008, Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am J Gastroenterol* 103, 2495-2501.
- Karenyi Iu, V., Dzhumalieva, D.I., Usmanov, R.K., Titova, I.P., Litvak Ia, I., Balaian, M.S., 1993, [The possible involvement of rodents in the spread of viral hepatitis E]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 52-56.
- Kase, J.A., Correa, M.T., Sobsey, M.D., 2009, Detection and molecular characterization of swine hepatitis E virus in North Carolina swine herds and their faecal wastes. *J Water Health* 7, 344-357.
- Kasorndorkbua, C., Opriessnig, T., Huang, F.F., Guenette, D.K., Thomas, P.J., Meng, X.J., 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.
- Kasorndorkbua, C., Guenette, D.K., Huang, F.F., Thomas, P.J., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004, Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol* 42, 5047-5052.
- Kasorndorkbua, C., Thacker, B.J., Halbur, P.G., Guenette, D.K., Buitenwerf, R.M., Royer, R.L., Meng, X.J., 2003, Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res* 67, 303-306.

- Kasorndorkbua, C., Halbur, P.G., Thomas, P.J., Guenette, D.K., Toth, T.E., Meng, X.J., 2002, 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* 101, 71-78.
- Kazachkov Yu, A., Balayan, M.S., Ivannikova, T.A., Panina, L.I., Orlova, T.M., Zamyatina, N.A., Kusov, Y., 1992, Hepatitis E virus in cultivated cells. *Arch Virol* 127, 399-402.
- Khuroo, M.S., Kamili, S., Khuroo, M.S., 2009, Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat* 16, 519-523.
- Khuroo, M.S., Kamili, S., 2003, Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat* 10, 61-69.
- Khuroo, M.S., Dar, M.Y., 1992, Hepatitis E: evidence for person-to-person transmission and inability of low dose immune serum globulin from an Indian source to prevent it. *Indian J Gastroenterol* 11, 113-116.
- Khuroo, M.S., Teli, M.R., Skidmore, S., Sofi, M.A., Khuroo, M.I., 1981, Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med* 70, 252-255.
- Khuroo, M.S., 1980, Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 68, 818-824.
- Kondili, L.A., Chionne, P., Porcaro, A., Madonna, E., Taffon, S., Resuli, B., Taliani, G., Rapticetta, M., 2006, Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) antibody and the possible association with chronic liver disease: a case-control study in Albania. *Epidemiol Infect* 134, 95-101.
- Krawczynski, K., 1993, Hepatitis E *Hepatology* 17, 932-941.
- Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J.B., Murthy, N.S., 2004, Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 85, 240-244.
- Kwo, P.Y., Schlauder, G.G., Carpenter, H.A., Murphy, P.J., Rosenblatt, J.E., Dawson, G.J., Mast, E.E., Krawczynski, K., Balan, V., 1997, Acute hepatitis E by a new isolate acquired in the United States. *Mayo Clin Proc* 72, 1133-1136.
- Leblanc, D., Ward, P., Gagne, M.J., Poitras, E., Muller, P., Trottier, Y.L., 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.
- Lee, Y.H., Ha, Y., Ahn, K.K., Chae, C., 2008, Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet J*.
- Legrand-Abravanel, F., Mansuy, J.M., Dubois, M., Kamar, N., Peron, J.M., Rostaing, L., Izopet, J., 2009, Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg Infect Dis* 15, 110-114.
- Lewis, H.C., Boisson, S., Ijaz, S., Hewitt, K., Ngui, S.L., Boxall, E., Teo, C.G., Morgan, D., 2008, Hepatitis E in England and Wales. *Emerg Infect Dis* 14, 165-167.
- Li, W., She, R., Wei, H., Zhao, J., Wang, Y., Sun, Q., Zhang, Y., Wang, D., Li, R., 2009a, Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. *Vet Microbiol* 133, 75-83.
- Li, Z., Yu, S., Dong, S., Zhu, Y., Si, F., Shen, S., Jiang, Z., Yu, R., Zou, S., 2009b, Reduced prevalence of genotype 3 HEV in Shanghai pig farms and hypothetical homeostasis of porcine HEV reservoir. *Vet Microbiol* 137, 184-189.

- Li, S.W., Zhang, J., Li, Y.M., Ou, S.H., Huang, G.Y., He, Z.Q., Ge, S.X., Xian, Y.L., Pang, S.Q., Ng, M.H., Xia, N.S., 2005a, A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine* 23, 2893-2901.
- Li, T.C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., Kurata, Y., Ishida, M., Sakamoto, S., Takeda, N., Miyamura, T., 2005b, Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 11, 1958-1960.
- Li, T.C., Suzaki, Y., Ami, Y., Dhole, T.N., Miyamura, T., Takeda, N., 2004, Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine* 22, 370-377.
- Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H., 2006, Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 16, 5-36.
- Lu, L., Drobeniuc, J., Kobylnikov, N., Usmanov, R.K., Robertson, B.H., Favorov, M.O., Margolis, H.S., 2004, 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* 74, 556-562.
- Mansuy, J.M., Legrand-Abravanel, F., Calot, J.P., Peron, J.M., Alric, L., Agudo, S., Rech, H., Destruel, F., Izopet, J., 2008, High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J Med Virol* 80, 289-293.
- Mansuy, J.M., Peron, J.M., Abravanel, F., Poirson, H., Dubois, M., Miedouge, M., Vischi, F., Alric, L., Vinel, J.P., Izopet, J., 2004, Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol* 74, 419-424.
- Martelli, F., Caprioli, A., Zengarini, M., Marata, A., Fiegna, C., Di Bartolo, I., Ruggeri, F.M., Delogu, M., Ostanello, F., 2008, Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol* 126, 74-81.
- Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P., 1987. *Veterinary epidemiology*. Iowa State University Press.
- Martín, M., Segalés, J., Huang, F.F., Guenette, D.K., Mateu, E., de Deus, N., Meng, X.J., 2007, Association of hepatitis E virus (HEV) and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) with lesions of hepatitis in pigs. *Vet Microbiol* 122, 16-24.
- Mast, E.E., Alter, M.J., Holland, P.V., Purcell, R.H., 1998, Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 27, 857-861.
- Mataragas, M., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H., 2008, Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *Int J Food Microbiol* 126, 1-12.
- Mateos, M.L., Molina, A., Ta, T.H., Moreira, V., Milicua, J.M., Barcena, R., 2006, [Acute hepatitis E in Madrid: description of 18 cases]. *Gastroenterol Hepatol* 29, 397-400.
- Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K., Mishiro, S., 2003, Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis* 188, 944.
- McCausland, K.A., Krawczynski, K., Ebert, J.W., Balayan, M.S., Andjaparidze, A.G., Spelbring, J.E., Cook, E.H., Humphrey, C., Yarbough, P.O., Favorov, M.O., Carson, D., Bradley, D.W., Robertson, B.H., 2000. Hepatitis E virus infection in chimpanzees: a retrospective analysis. *Arch. Virol.* 145, 1909-1918.

- McCreary, C., Martelli, F., Grierson, S., Ostanello, F., Nevel, A., Banks, M., 2008, Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Vet Rec* 163, 261-265.
- Meng, X.J., 2009, Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol*.
- Meng, X.J., Anderson, D.A., Arankalle, V.A., Emerson, S.U., Harrison, T.J., Jameel, S., Okamoto, H., 2008, Remove and re-align a species in the genus *Hepevirus*; formally recognize the Family *Hepeviridae*. In: *ICTV Discussions*.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006, Swine Hepatitis E Virus. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D. (Eds.), *Diseases of Swine*, Blackwell Publishing, Iowa USA, pp. 537-545.
- Meng, X.J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D.K., Toth, T.E., Engle, R.E., Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2002, 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* 40, 117-122.
- Meng, X.J., 2000, Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol*. 33, 842-845.
- 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., Emerson, S.U., 1999, 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* 59, 297-302.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., Haynes, J.S., Tsareva, T.S., Bruna, J.D., Royer, R.L., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1998a, Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol* 143, 1405-1415.
- Meng, X.J., Halbur, P.G., Shapiro, M.S., Govindarajan, S., Bruna, J.D., Mushahwar, I.K., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1998b, Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72, 9714-9721.
- Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U., 1997, A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9860-9865.
- Mills, C.E., Robins, J.M., Lipsitch, M., 2004, Transmissibility of 1918 pandemic influenza. *Nature* 432, 904-906.
- Mizuo, H., Yazaki, Y., Sugawara, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2005, Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol* 76, 341-349.
- Mochizuki, M., Ouchi, A., Kawakami, K., Ishida, T., Li, T.C., Takeda, N., Ikeda, H., Tsunemitsu, H., 2006, Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 159, 853-854.
- Munne, M.S., Vladimirovsky, S., Otegui, L., Castro, R., Brajterman, L., Soto, S., Guarnera, E., Molina, V., Monfellano, M., Schlauder, G.G., Gonzalez, J.E., 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.
- Mushahwar, I.K., 2008, Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 80, 646-658.

- Nakai, I., Kato, K., Miyazaki, A., Yoshii, M., Li, T.C., Takeda, N., Tsunemitsu, H., Ikeda, H., 2006, Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms. *Am J Trop Med Hyg* 75, 1171-1177.
- Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., Taira, M., Ohno, A., Sakugawa, H., Arai, M., Mishiro, S., 2006, Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* 34, 137-140.
- Nanda, S.K., Ansari, I.H., Acharya, S.K., Jameel, S., Panda, S.K., 1995, Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 108, 225-230.
- Navaneethan, U., Al Mohajer, M., Shata, M.T., 2008, Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int* 28, 1190-1199.
- Nielsen, B., Ekerøth, L., Bager, F., Lind, P., 1998, Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of Salmonella infection in slaughter pig herds. *J Vet Diagn Invest* 10, 158-163.
- Norder, H., Sundqvist, L., Magnusson, L., Ostergaard Breum, S., Lofdahl, M., Larsen, L.E., Hjulsager, C.K., Magnius, L., Bottiger, B.E., Widen, F., 2009, Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Euro Surveill* 14.
- Ohnishi, S., Kang, J.H., Maekubo, H., Arakawa, T., Karino, Y., Toyota, J., Takahashi, K., Mishiro, S., 2006, Comparison of clinical features of acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) genotypes 3 and 4 in Sapporo, Japan. *Hepatol Res* 36, 301-307.
- Okamoto, H., 2007, Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 127, 216-228.
- Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., 2003, Features of hepatitis E virus infection in Japan. *Intern Med* 42, 1065-1071.
- Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U., Yoshikawa, A., 2001, Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 929-936.
- Orru, G., Masia, G., Orru, G., Romano, L., Piras, V., Coppola, R.C., 2004, Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J Virol Methods* 118, 77-82.
- Panda, S.K., Thakral, D., Rehman, S., 2007, Hepatitis E virus. *Rev Med Virol* 17, 151-180.
- Pavio, N., Renou, C., Di Liberto, G., Boutrouille, A., Eloit, M., 2008, Hepatitis E: a curious zoonosis. *Front Biosci* 13, 7172-7183.
- Payne, C.J., Ellis, T.M., Plant, S.L., Gregory, A.R., Wilcox, G.E., 1999, Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet Microbiol* 68, 119-125.
- Pei, Y., Yoo, D., 2002, Genetic characterization and sequence heterogeneity of a canadian isolate of Swine hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 40, 4021-4029.
- Peralta, B., Biarnes, M., Ordonez, G., Porta, R., Martín, M., Mateu, E., Pina, S., Meng, X.J., 2009a, Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet Microbiol* 137, 31-36.
- Peralta, B., Casas, M., de Deus, N., Martín, M., Ortuno, A., Perez-Martin, E., Pina, S., Mateu, E., 2009b, Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. *Vet Microbiol* 137, 66-73.

- Peralta, B., Mateu, E., Casas, M., de Deus, N., Martín, M., Pina, S., 2009c, Genetic characterization of the complete coding regions of genotype 3 hepatitis E virus isolated from Spanish swine herds. *Virus Res* 139, 111-116.
- Perez-Gracia, M.T., Mateos, M.L., Galiana, C., Fernandez-Barredo, S., Garcia, A., Gomez, M.T., Moreira, V., 2007, Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am J Trop Med Hyg* 77, 893-896.
- Pérez-Gracia, M.T., García-Valdivia, M.S., Galán, F., Rodríguez-Iglesias, M.A., 2004. Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol* 48, 197-200.
- Pérez-Gracia, M.T., Rodríguez-Iglesias, M., 2003. [Hepatitis E virus: current status]. *Med Clin (Barc)* 121, 787-792.
- Péron, J.M., Mansuy, J.M., Poirson, H., Bureau, C., Dupuis, E., Alric, L., Izopet, J., Vinel, J.P., 2006, Hepatitis E is an autochthonous disease in industrialized countries. Analysis of 23 patients in South-West France over a 13-month period and comparison with hepatitis A. *Gastroenterol Clin Biol* 30, 757-762.
- Péron, J.M., Mansuy, J.M., Récher, C., Bureau, C., Poirson, H., Alric, L., Izopet, J., Vinel, J.P. 2006. Prolonged hepatitis E in an immunocompromised patient. *J Gastroenterol Hepatol* 21, 1223-1224.
- Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J., Girones, R., 2000, HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 33, 826-833.
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Girones, R., 1998, Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol* 64, 4485-4488.
- Platt, K.B., Yoon, K.-J., Zimmerman, J.J., 1998, Susceptibility of Swine to Hepatitis E virus and its Significance to Human Health. *Swine Research Report*. Iowa State University, Ames, IA., 125-126.
- Porat, Y.B., Zan-Bar, I., Ravid, A., 1995, Quantitative dot-blot assay for low titer anti-lipopolysaccharide antibodies in human plasma. *J Immunol Methods* 180, 213-218.
- Porter, P., Noakes, D.E., Allen, W.D., 1970, Secretory IgA and antibodies to *Escherichia coli* in porcine colostrum and milk and their significance in the alimentary tract of the young pig. *Immunology* 18, 245-257.
- Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2008, Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 48, 494-503.
- Reyes, G.R., Purdy, M.A., Kim, J.P., Luk, K.C., Young, L.M., Fry, K.E., Bradley, D.W., 1990, Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247, 1335-1339.
- Robinson, R.A., Burgess, W.H., Emerson, S.U., Leibowitz, R.S., Sosnovtseva, S.A., Tsarev, S., Purcell, R.H., 1998, Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* 12, 75-84.
- Roda, A., Pasini, P., Mirasoli, M., Michelini, E., Guardigli, M., 2004, Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol* 22, 295-303.
- Rodríguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Girones, R. 2008. Molecular epidemiology and environmental dissemination of HAV and HEV. *Proceedings COST Action 929, Pisa 2008*.

- Rosell, C., Segales, J., Domingo, M., 2000, Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 37, 687-692.
- Rutjes, S.A., Lodder, W.J., Lodder-Verschoor, F., van den Berg, H.H., Vennema, H., Duizer, E., Koopmans, M., de Roda Husman, A.M., 2009, Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 15, 381-387.
- Saad, M.D., Hussein, H.A., Bashandy, M.M., Kamel, H.H., Earhart, K.C., Fryauff, D.J., Younan, M., Mohamed, A.H., 2007, Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol* 7, 368-373.
- Satou, K., Nishiura, H., 2007, Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. *BMC Vet Res* 3, 9.
- Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Erker, J.C., Kwo, P.Y., Knigge, M.F., Smalley, D.L., Rosenblatt, J.E., Desai, S.M., Mushahwar, I.K., 1998, The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 79 (Pt 3), 447-456.
- Schofield, D.J., Glamann, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2000, Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol* 74, 5548-5555.
- Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N., Martín, M., 2008, Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* 175, 130-132.
- Serra Majem, L., Ribas Barba, L., Salvador Castell, G., Roman Vinas, B., Castell Abat, C., Cabezas Pena, C., Pastor Ferrer, M.C., Raido Quintana, B., Ngo de la Cruz, J., Garcia Alvarez, A., Serra Farro, J., Salleras Sanmarti, L., Taradach Antoni, P., 2007, [Trends in the nutritional status of the Spanish population: results from the Catalan nutrition monitoring system (1992-2003)]. *Rev Esp Salud Publica* 81, 559-570.
- Shata, M.T., Navaneethan, U. 2008. The mystery of hepatitis E seroprevalence in developed countries: is there subclinical infection due to hepatitis E virus?. *Clin Infect Dis* 47, 1032-1034.
- 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., Innis, B.L., 2007, Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med* 356, 895-903.
- Smith, J.L., 2001, A review of hepatitis E virus. *J Food Prot* 64, 572-586.
- Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T., Sato, Y., Bando, M., Fukui, E., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2004, 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* 42, 5371-5374.
- Stevenson, P., 2000, Nepal calls the shots in hepatitis E virus vaccine trial. *Lancet* 355, 1623.
- Stoszek, S.K., Abdel-Hamid, M., Saleh, D.A., El Kafrawy, S., Narooz, S., Hawash, Y., Shebl, F.M., El Daly, M., Said, A., Kassem, E., Mikhail, N., Engle, R.E., Sayed, M., Sharaf, S., Fix, A.D., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Strickland, G.T., 2006, High prevalence of hepatitis E antibodies in pregnant Egyptian women. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 95-101.
- Takahashi, K., Okamoto, H., Abe, N., Kawakami, M., Matsuda, H., Mochida, S., Sakugawa, H., Sugino, Y., Watanabe, S., Yamamoto, K., Miyakawa, Y., Mishihiro, S., 2009, Virulent strain of hepatitis E virus genotype 3, Japan. *Emerg Infect Dis* 15, 704-709.

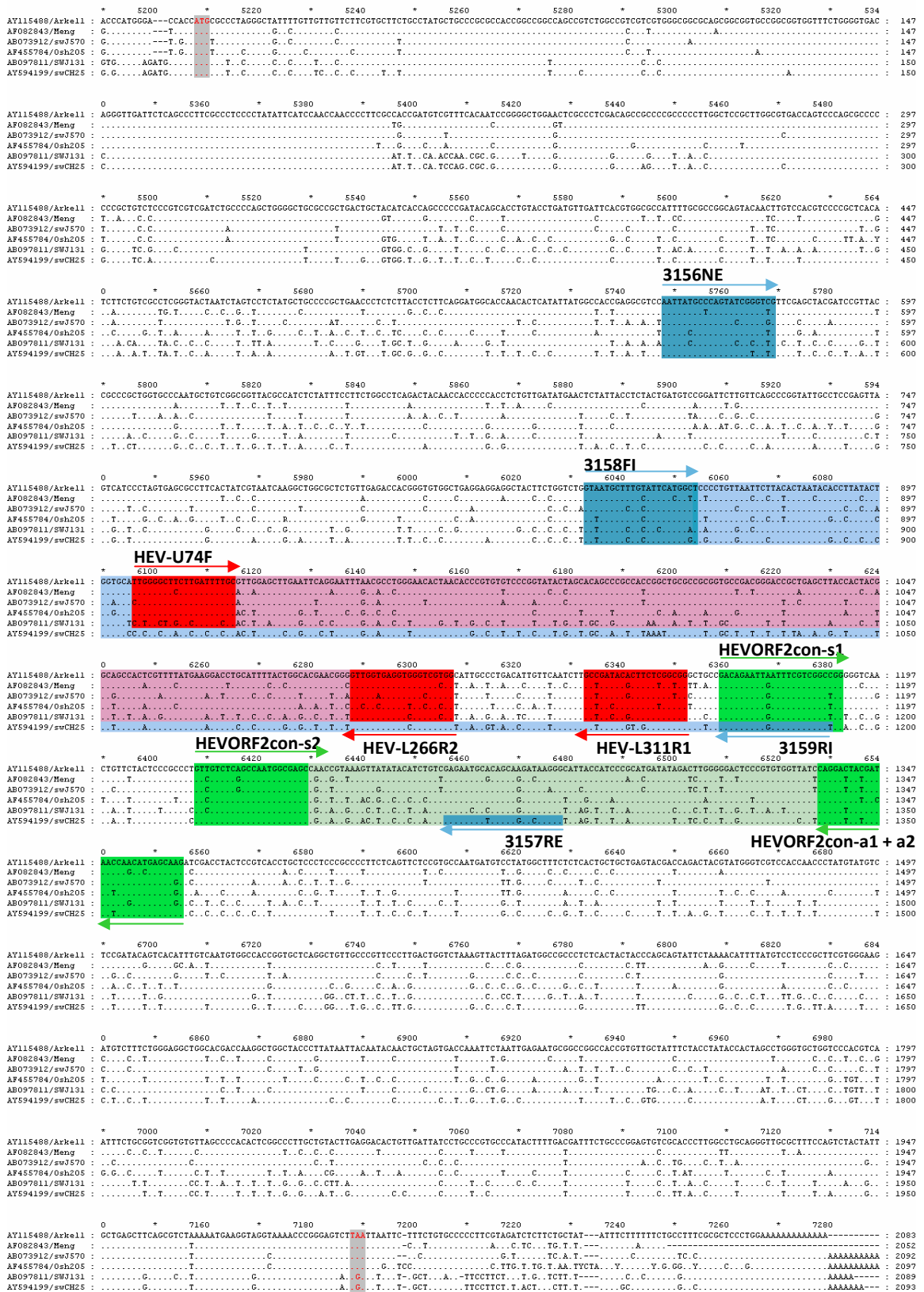
- Takahashi, M., Kusakai, S., Mizuo, H., Suzuki, K., Fujimura, K., Masuko, K., Sugai, Y., Aikawa, T., Nishizawa, T., Okamoto, H., 2005, Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 43, 49-56.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Miyajima, H., Gotanda, Y., Iita, T., Tsuda, F., Okamoto, H., 2003, Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 84, 851-862.
- Takahashi, K., Iwata, K., Watanabe, N., Hatahara, T., Ohta, Y., Baba, K., Mishiro, S., 2001, Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 287, 9-12.
- Tam, A.W., White, R., Reed, E., Short, M., Zhang, Y., Fuerst, T.R., Lanford, R.E., 1996, In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 215, 1-9.
- Tam, A.W., Smith, M.M., Guerra, M.E., Huang, C.C., Bradley, D.W., Fry, K.E., Reyes, G.R., 1991, Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185, 120-131.
- Tamura K. Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007, *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599
- Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., Okamoto, H., 2007, Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 88, 903-911.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiro, S., 2003, Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371-373.
- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J.P., Frankena, K. 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.*148, 567-72.
- Tizard, I.R. 2000. Immunity at body surfaces. In: Tizard, I.R. (Ed.), *Veterinary Immunology*, WB Saunders Company, Pennsylvania, U.S.A, p. 247.
- Toyoda, K., Furusyo, N., Takeoka, H., Murata, M., Sawayama, Y., Hayashi, J., 2008, Epidemiological study of hepatitis E virus infection in the general population of Okinawa, Kyushu, Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 23, 1885-1890.
- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Govindarajan, S., Shapiro, M., Gerin, J.L., Purcell, R.H., 1997, Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine* 15, 1834-1838.
- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Rippey, M.K., Zack, P., Shapiro, M., Purcell, R.H., 1995, Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J Infect Dis* 172, 31-37.
- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Govindarajan, S., Shapiro, M., Gerin, J.L., Purcell, R.H., 1994a, Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10198-10202.
- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Yarbough, P.O., Legters, L.J., Moskal, T., Purcell, R.H., 1994b, Infectivity titration of a prototype strain of hepatitis E virus in cynomolgus monkeys. *J Med Virol* 43, 135-142.
- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Kapikian, A.Z., Ticehurst, J., London, W., Purcell, R.H., 1993, ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading

- frame-2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. *J Infect Dis* 168, 369-378.
- Tyagi, S., Korkaya, H., Zafrullah, M., Jameel, S., Lal, S.K., 2002, The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem* 277, 22759-22767.
- Usmanov, R.K., Balaian, M.S., Dvoynikova, O.V., Alymbaeva, D.B., Zamiatina, N.A., Kazachkov Iu, A., Belov, V.I., 1994, [An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus]. *Vopr Virusol* 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 Ch, T., Kozhomkulov, E.T., et al., 1991, [Experimental hepatitis E infection in piglets]. *Vopr Virusol* 36, 212-216.
- van der Poel, W.H., Verschoor, F., van der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A., Kooreman, M., de Roda Husman, A.M., 2001, Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 7, 970-976.
- Vasickova, P., Psikal, I., Widen, F., Smitalova, R., Bendova, J., Pavlik, I., Kralik, P., 2009, Detection and genetic characterisation of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. *Res Vet Sci* 87, 143-148.
- Vasickova, P., Psikal, I., Kralik, P., Widen, F., Hubalek, Z., Pavlik, I., 2007, Hepatitis E virus: a review. *Veterinarni Medicina* 52, 365-384.
- Vitral, C.L., Pinto, M.A., Lewis-Ximenez, L.L., Khudyakov, Y.E., dos Santos, D.R., Gaspar, A.M., 2005, Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100, 117-122.
- Wallgren, P., Persson, M., 2000, Relationship between the amounts of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 detected in blood serum and in fluids collected from muscles of pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47, 727-737.
- Wang, N., Lu, Y.H., Zheng, Y.J., Jiang, Q.W., 2007, [Isolation of hepatitis E virus from liver of swine at abattoirs in Shandong province]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 28, 1013-1015.
- Wang, Y.C., Zhang, H.Y., Xia, N.S., Peng, G., Lan, H.Y., Zhuang, H., Zhu, Y.H., Li, S.W., Tian, K.G., Gu, W.J., Lin, J.X., Wu, X., Li, H.M., Harrison, T.J., 2002, Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol* 67, 516-521.
- Wang, Y., Ling, R., Erker, J.C., Zhang, H., Li, H., Desai, S., Mushahwar, I.K., Harrison, T.J., 1999, A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* 80 (Pt 1), 169-177.
- Williams, T.P., Kasorndorkbua, C., Halbur, P.G., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Toth, T.E., Meng, X.J., 2001, Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 39, 3040-3046.
- Withers, M.R., Correa, M.T., Morrow, M., Stebbins, M.E., Seriwatana, J., Webster, W.D., Boak, M.B., Vaughn, D.W., 2002, Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg* 66, 384-388.
- Wong, D.C., Purcell, R.H., Sreenivasan, M.A., Prasad, S.R., Pavri, K.M., 1980, Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 2, 876-879.

- Wu, J.C., Chen, C.M., Chiang, T.Y., Tsai, W.H., Jeng, W.J., Sheen, I.J., Lin, C.C., Meng, X.J., 2002, Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan. *J Med Virol* 66, 488-492.
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., Okamoto, H., 2003, Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 84, 2351-2357.
- Yin, S., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1994, A new Chinese isolate of hepatitis E virus: comparison with strains recovered from different geographical regions. *Virus Genes* 9, 23-32.
- Yin, S., Tsarev, S.A., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 1993, Partial sequence comparison of eight new Chinese strains of hepatitis E virus suggests the genome sequence is relatively stable. *J Med Virol* 41, 230-241.
- Yoo, D., Willson, P., Pei, Y., Hayes, M.A., Deckert, A., Dewey, C.E., Friendship, R.M., Yoon, Y., Gottschalk, M., Yason, C., Giulivi, A., 2001, Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 1213-1219.
- Zhao, C., Ma, Z., Harrison, T.J., Feng, R., Zhang, C., Qiao, Z., Fan, J., Ma, H., Li, M., Song, A., Wang, Y., 2009, A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol* 81, 1371-1379.
- Zheng, Y., Ge, S., Zhang, J., Guo, Q., Ng, M.H., Wang, F., Xia, N., Jiang, Q., 2006, Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *J Infect Dis* 193, 1643-1649.
- Zhou, Y.H., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2004, An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine* 22, 2578-2585.

10. Annexes

Annex I. Posició dels encebadors utilitzats en la RT-PCR semi-anidada




Regió encebadors Erker et al., 1999

Regió encebadors Martín et al., 2007

Regió encebadors Huang et al., 2002a

L'ombrejat més clar correspon a la regió que seqüenciem

 <p>CReSA Centre de Recerca en Sanitat Animal</p> <p>Elaborat per: Maribel Casas Data: 14/01/09</p>	<p>Virus Hepatitis E (VHE): semi-nested RT-PCR</p>	<p>Codi: PT PCR 043-02 Data: 08/07/09 Núm. pàg: 119 de 135</p>
	<p>Area: Virologia</p>	<p>Revisat per: Montse Ordoñez Data: 01/07/09</p>
	<p>Aprovat per : Marga Martín Data: 01/07/09</p>	

Mix desnaturalizació dsRNA **TERMOCICLADOR**

Reactius	µl	
Primer L311R ₁ 25 µM	1	5' 65°C ∞ 4°C
Extracció RNA (mostra)	12.25	

RT Mix

TERMOCICLADOR

RT Mix (Invitrogen)	µl	x _____	
5x First-Strand Buffer	4		60' 42 °C ∞ 4 °C
DTT 0.1mM	1		
dNTPs 5mM	1		
RNaseOUT	0.5		
SuperScript™ II Reverse Transcriptasa	0.25		
AFEGIR DE LA MIX A CADA TUB	6.75		

Primera PCR Mix


TERMOCICLADOR

I PCR Mix (Applied)	µl	x _____			
Gold Buffer 10X	1		6' 94 °C	35 cicles 50'' 94 °C 50'' 54 °C 1' 72 °C	7' 72 °C ∞ 4 °C
DEPC-treated water	6.32				
MgCl ₂ 25 mM	0.8				
dNTPs 5 mM	0.4				
Primer L311R ₁ 10 µM	0.2				
Primer U74F 10 µM	0.2				
AmpliAq Gold® DNA Polymerase 5 U/µl	0.08				
AFEGIR DE LA MIX A CADA TUB	9				
cDNA	1				

Segona PCR Mix

TERMOCICLADOR

II PCR Mix (Applied)	µl	x _____			
Gold Buffer 10X	5		6' 94 °C	35 cicles 50'' 94 °C 50'' 54 °C 1' 72 °C	7' 72 °C ∞ 4 °C
DEPC-treated water	35.6				
MgCl ₂ 25 mM	4				
dNTPs 5 mM	2				
Primer L266R ₂ 10 µM	1				
Primer U74F 10 µM	1				
AmpliAq Gold® DNA Polymerase 5 U/µl	0.4				
AFEGIR DE LA MIX A CADA TUB	49				
DNA primera PCR	1				

 <p>Elaborat per: Maribel Casas Data: 14/01/09</p>	<p>Virus Hepatitis E (VHE): semi-nested RT-PCR</p>	<p>Codi: PT PCR 043-02 Data: 08/07/09 Núm. pàg: 120 de 135</p>
	<p>Area: Virologia</p>	<p>Revisat per: Montse Ordoñez Data: 01/07/09</p>
	<p>Aprovat per : Marga Martín Data: 01/07/09</p>	

Mostra	Codi extracció	Mostra	Codi extracció
1.		13.	
2.		14.	
3.		15.	
4.		16.	
5.		17.	
6.		18.	
7.		19.	
8.		20.	
9.		21.	
10.		22.	
11.		23.	
12.		24.	

Seqüències primers

Primer	Seqüència
L311R ₁	5'-CCRCCRAGAAGYGTATCAGC-3'
L266R ₂	5'-CCRCGRCCCACCTCACCAAC-3'
U74F	5'-TTVGGGCTYCTYGACTTTGC-3'

Relació productes

Producte	Proveïdor	Ref. Proveïdor	Codi GESCRESA
5x First-Strand Buffer + DTT 0.1mM + SuperScript™ II Reverse Transcriptasa	Invitrogen	18064014	001945
DEPC-treated water	Applied Biosystems	AM9906	004200
100 mM dATP solution	Invitrogen	10216018	001984
100 mM dCTP solution	Invitrogen	10217016	001985
100 mM dGTP solution	Invitrogen	10218014	001986
100 mM dTTP solution	Invitrogen	10219012	001987
Gold Buffer 10X + MgCl ₂ 25 mM + AmpliTaq Gold® DNA Polymerase 5 U/μl (pack de 12)	Applied Biosystems	4311820G	001736
Primer 50nmol	Invitrogen	10629012	001988
RNaseOUT	Invitrogen	10777019	001923

Annex III. Posada a punt d'una PCR a temps real

Un dels objectius del projecte, en què està inclosa aquesta tesi, fou el de millorar les tècniques de diagnòstic existents per tal d'ampliar i alhora millorar els estudis epidemiològics i de patogènia de les espècies afectades. Entre aquestes tècniques, es posà a punt una PCR a temps real amb l'objectiu de quantificar el nivell d'excreció, la virèmia i la quantitat de virus als teixits en les diferents fases de la infecció. La tècnica es va posar a punt basant-se en l'article de Jothikumar et al. (2006) amb algunes modificacions. Així doncs, es van utilitzar els mateixos encebadors i sonda que els descrits a l'article, així com l'estàndard utilitzat.

Els mètodes de PCR a temps real basats en sondes, com la TaqMan[®], detecten l'acumulació d'ADN amplificat mitjançant fluorescència. La sonda està marcada per un *reporter* a l'extrem 5' (donador de fluorescència) i per un *quencher* a l'extrem 3' (acceptor). Durant l'hibridació de la sonda a la cadena complementària d'ADN, la proximitat del *reporter* amb el *quencher* permet que no s'emeti fluorescència. En el moment de l'amplificació, la polimerasa degrada la sonda separant el *reporter* del *quencher* i augmenta la fluorescència. Aquesta fluorescència és detectada de tal manera que el seu augment és directament proporcional a la quantitat d'amplions generats.

Materials i mètodes

Encebadors i sonda: s'utilitzaren els encebadors i la sonda TaqMan[®]: encebador directe (HEVF) 5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'; encebador revers (HEVR) 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'; i sonda TaqMan[®] 6-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-MGB Jothikumar et al., (2006). La seqüència amplificada tenia una longitud de 70 nt i estava situada a la regió ORF3 del virus.

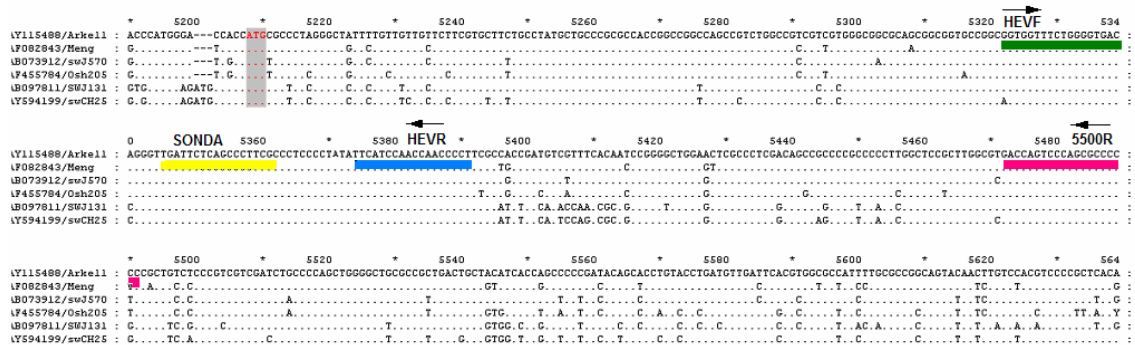
Construcció de l'estàndard: el plàsmid es va construir a partir d'una mostra positiva de bilis per RT-PCR convencional (Annex II) (GenBank: SW626/EU723512/Spain) i els encebadors HEVF i HEVR. Per poder amplificar el fragment, es dissenyà un encebador extern: encebador reverse (5500R): 5'-GVGGGGCGCTGGGACTGGTC-3' (figura 12.1). El fragment de 70 nt es clonà en *pGEM[®]-T Vector System* (Promega) i el producte de lligació

s'incorporà mitjançant electroporació a cèl·lules *E. coli* DH5 α (Invitrogen). L'ADN plasmídic es purificà mitjançant el kit *Nucleospin Plasmid DNA Purification* (Macherey-Nagel) i es quantificà per espectrofotometria. A partir d'una dilució inicial de 10 nanograms/microlitre (ng/ μ l) de plàsmid es feren 10 dilucions 1:10 (1 ng/ μ l a 10⁻¹⁰ ng/ μ l).

Extracció de l'ADN: l'extracció es va fer mitjançant el kit *Nucleospin RNA Virus* (Macherey-Nagel) o bé pel mètode d'extracció amb Trizol (Invitrogen).

Optimització de la concentració d'encebadors i sonda: per a l'optimització dels encebadors (HEVF i HEVR), es testaren les concentracions (nanoMolar (nM)) següents: 50/50; 50/250; 250/250; 50/900; 250/900 i 900/250. Per a la sonda, es testaren les concentracions següents (nM): 50; 100; 125; 150 i 200. La prova es realitzà per triplicat en cada una de les dilucions de l'estàndard i s'escollí la concentració d'encebadors HEVF/HEVR i de sonda amb el C_t més baix (major sensibilitat).

Figura 12.1. Encebadors i sonda utilitzats per la posada al punt de la RT-PCR a temps real



Síntesi del DNAc: la transcripció inversa es dugué a terme segons el protocol utilitzat a la RT-PCR semi-anidada (Annex II).

PCR a temps real: els 25 μ l de reacció contenen 12,5 μ l de TaqMan® Universal PCR Master Mix, encebador HEVF i HEVR a una concentració de 250mM i 900nM respectivament, sonda a una concentració de 150nM i 2,5 μ l de ADNc. Per a la realització de la PCR a temps real, s'utilitzà l'aparell ABI Prism 7000, d'Applied Biosystems. Les condicions del termociclador foren: descontaminació de bases uracil mitjançant l'AmpErase UNG a 50°C per 2 min, desnaturalització a 95°C per 10 min, seguit de 45 cicles de 95° 10 s, 50°C 20 s i 72°C 30 s.

Mostres: per comprovar l'eficiència de la tècnica s'escolliren mostres de bilis, femtes i sèrum de porcs infectats de forma natural testades prèviament mitjançant la RT-PCR semi-anidada (de Deus et al., 2007).

Resultats

Sensibilitat i eficiència: la màxima dilució de plàsmid detectada fou de 10^{-8} ng/ μ l equivalent a <10 còpies d'ARN per reacció. La pendent mitjana de la corba fou de -3.4 corresponent a una eficiència del 96%.

Comparació de mètodes d'extracció: una mostra de bilis positiva a VHE per RT-PCR semi-anidada s'utilitzà per comparar ambdós mètodes d'extracció. Els resultats mostraren que el mètode d'extracció per Trizol és més eficient que el mètode d'extracció per kit comercial: 10^5 - 10^6 equivalents de genoma/ml mostra de bilis *versus* 10 equivalents de genoma/ml mostra de la mateixa bilis. Totes les mostres foren analitzades mitjançant l'extracció per Trizol i es detectà una presència més gran de virus en bilis (10^3 - 10^6 equivalents de genoma/ml de bilis) que en femtes (10^2 - 10^3 equivalents de genoma/ml de suspensió fecal) i sèrum (no detectat).

Discussió

Els mètodes de diagnòstic basats en la PCR quantitativa tenen una major sensibilitat, són menys laboriosos, redueixen el temps de diagnòstic i eviten contaminacions, comparat amb els mètodes de PCR convencional. A part, permeten quantificar el virus present a la mostra donant una idea de la concentració del virus en els diferents teixits al llarg de la infecció. La PCR a temps real que s'ha posat a punt en aquesta tesi té una molt bona sensibilitat i especificitat, i permet quantificar el VHE present en mostres de bilis i femtes. Encara que els resultats son equiparables a la tècnica posada al punt per Jothikumar et al. (2006), la tècnica no és capaç de detectar el virus en mostres de sèrum.

La PCR a temps real desenvolupada per Jothikumar et al. (2006) està basada en "un sol pas", on l'ARN s'incorpora directament a la reacció de la PCR a temps real. Si bé aquest mètode permet reduir considerablement el temps de diagnòstic i les contaminacions, és unes 10 vegades menys sensible que el sistema de "dos passos" on, primerament, es realitza la retranscripció i, tot seguit, s'incorpora la cadena transcrita d'ADN a la barreja de la PCR (resultats no mostrats).

L'objectiu inicial d'aquest estudi fou el de substituir la RT-PCR semi-anidada per la PCR a temps real com a eina de diagnòstic rutinari per a la detecció del VHE en mostres porcines. Malauradament, la PCR a temps real és menys sensible que la RT-PCR semi-anidada, ja que aquesta segona té aproximadament el doble de cicles d'amplificació ($35 \times 2 = 70$ cicles) que la primera (40 cicles). D'aquesta manera, mostres que contenen molt poca quantitat de virus, com el sèrum, són positives per RT-PCR semi-anidada però negatives per PCR a temps real. Recentment, s'han desenvolupant PCR quantitatives més sensibles basades en el sistema de transferència d'energia sondaencebador (PriProET: *Prime-Probe Energy Transfer*) (Gyarmati et al., 2007; Breum et al., 2008). Aquesta tècnica, a diferència del sistema TaqMan®, utilitza, a més de la sonda receptora, un encebador marcat amb un fluorocrom donant en un dels encebadors. Quan la sonda s'hibrida amb la cadena marcada per l'encebador marcat, l'energia es transfereix de l'encebador a la sonda. Així doncs, la quantitat de fluorescència emesa és directament proporcional a la quantitat d'amplicons formats, resultant ser una tècnica més sensible (fins a un equivalent de genoma) i específica (Gyarmati et al., 2007). A més, aquest sistema permet genotipar directament sense la necessitat de seqüenciar. La posada al punt d'aquest sistema permetria substituir el diagnòstic rutinari del VHE mitjançant la RT-PCR semi-anidada per un sistema molt més ràpid i segur.

Bibliografia

- Breum, S. Ø., Hjulsgaard, C.K., De Deus, N., Segalés, J., Enøe, C., Larsen, L.E., 2008, Hepatitis E virus is prevalent in the Danish pig population. Poster 20th International Pig Veterinary Society Congress, Durban (South Africa).
- Gyarmati, P., Mohammed, N., Norder, H., Blomberg, J., Belak, S., Widen, F., 2007, Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J Virol Methods* 146, 226-235.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006, A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131, 65-71.

