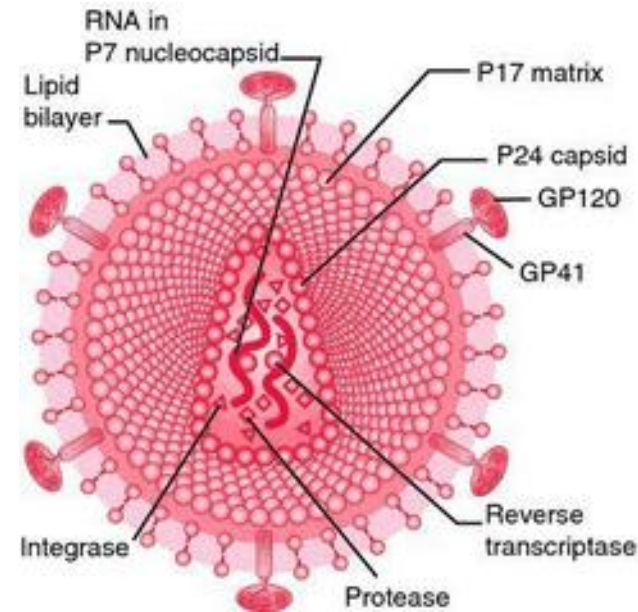


Virus de la Hepatitis E (VHE) en el ganado porcino de España detección y caracterización

Arnal J.L., Benito A.A., Chacón G., Fernández A.,
Serrano J.D., Barrios J.
jlarnal@exopol.com

Introducción

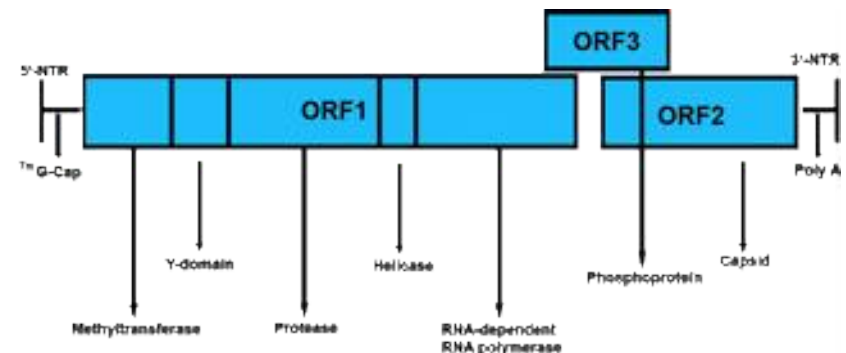
- Virus ss(+)RNA
- Genoma 7,2 kb.
- 3 ORF



- En base a secuencia parcial ORF2 (final 5´), muy conservada

– 4 genotipos y 24 subtipos

- GENOTIPO 1 (a-e): HOMBRE
- GENOTIPO 2 (a-b): HOMBRE
- GENOTIPO 3 (a-j): HOMBRE Y ANIMALES
- GENOTIPO 4 (a-g): HOMBRE Y ANIMALES



Introducción

- Virus hepatitis E afecta a diferentes especies animales



Introducción

- Presentación de la enfermedad:

- **Hombre:** Hepatitis **E**ntérica y **E**pidémica.

Infección aguda autolimitada

Problemas para población de riesgo



- Países en vías de desarrollo: presentación epidémica
- Países industrializados: brotes esporádicos autolimitados

ZOONOSIS

PRINCIPAL RIESGO

- AGUAS CONTAMINADAS
- CARNE POCO COCINADA



Porcino: ASINTOMÁTICA

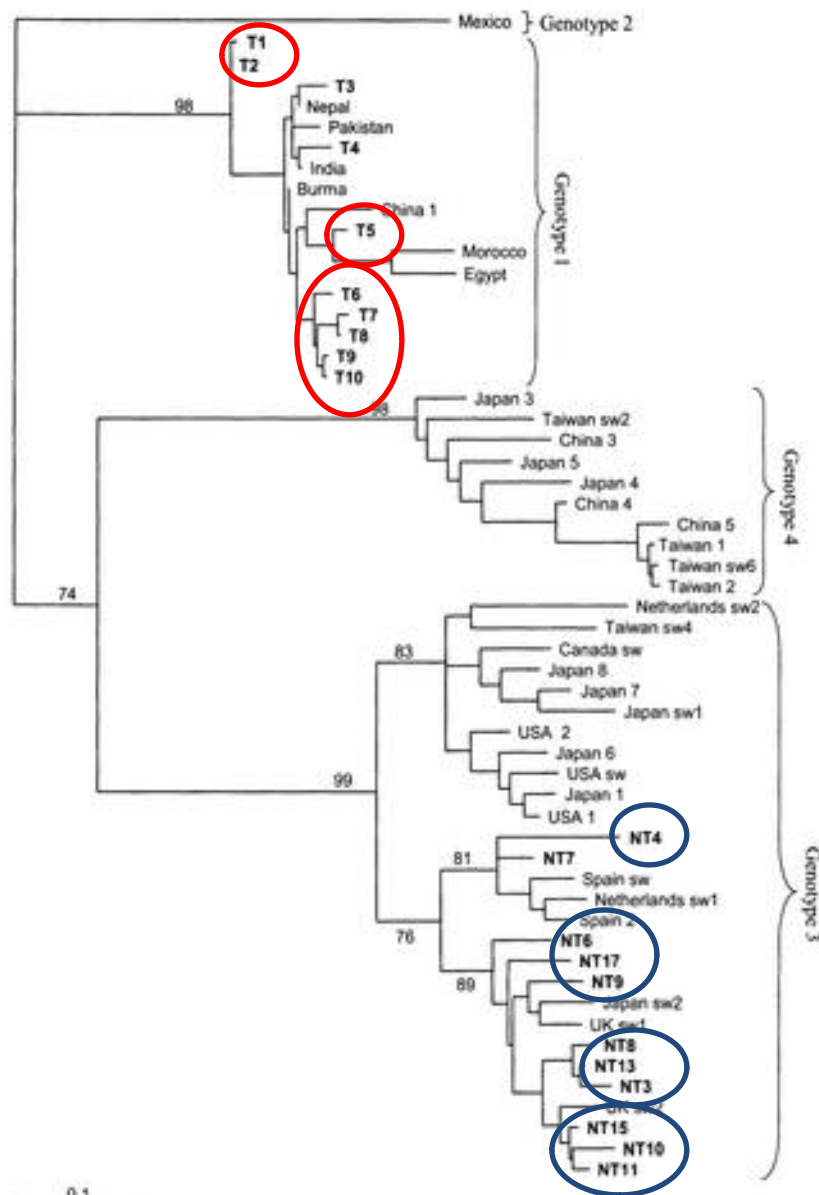
Transmisión feco oral

Viremia transitoria 1-2 semanas

- Excrección hasta 7 semanas p.i.

Introducción

Ijaz S. et al., 2016

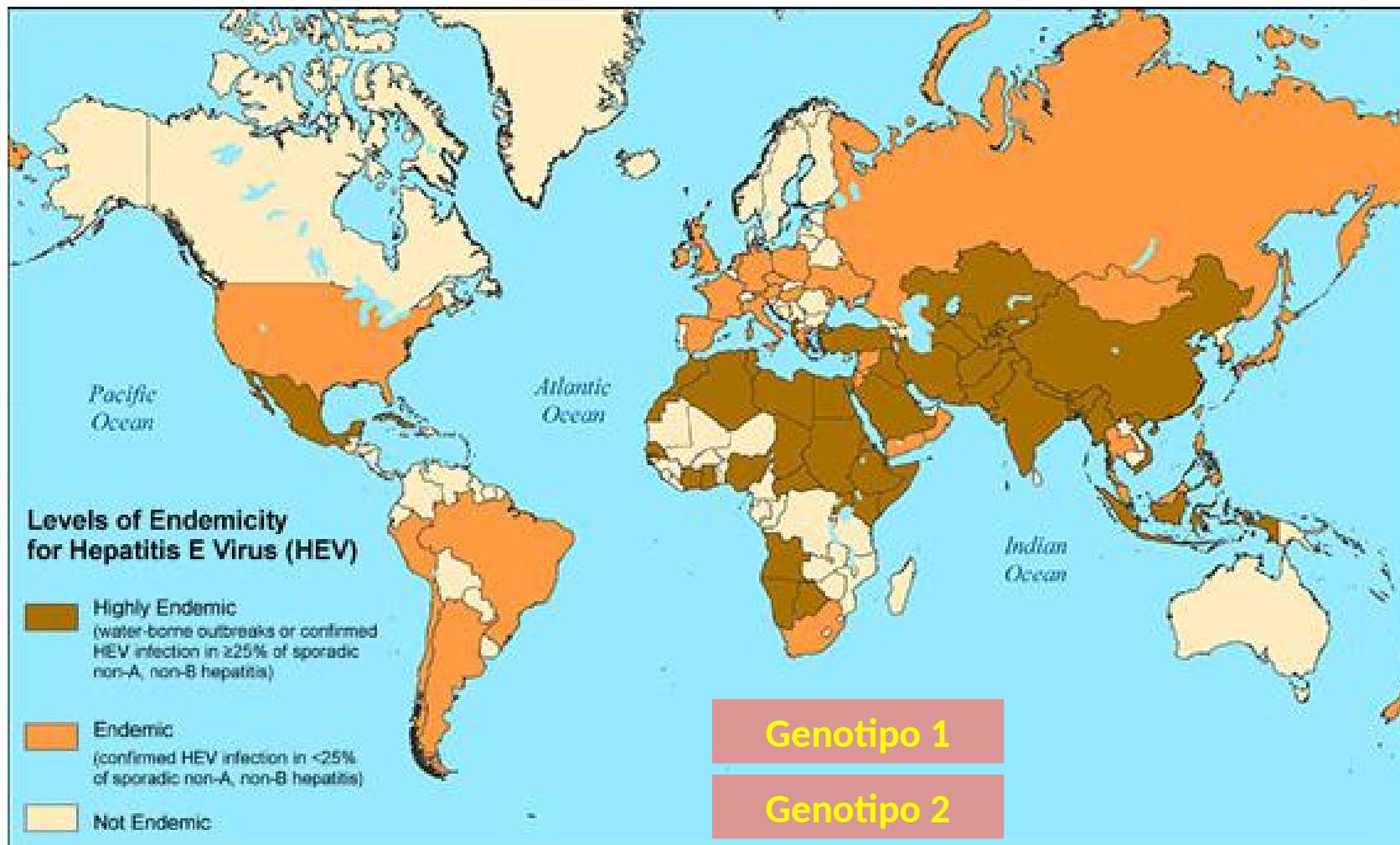


PACIENTES DE UN ESTUDIO EN UK

Pacientes que han viajado (T)

Pacientes que no han viajado (NT)

Introducción



Fuente: cdc.gov

jlarnal@exopol.com

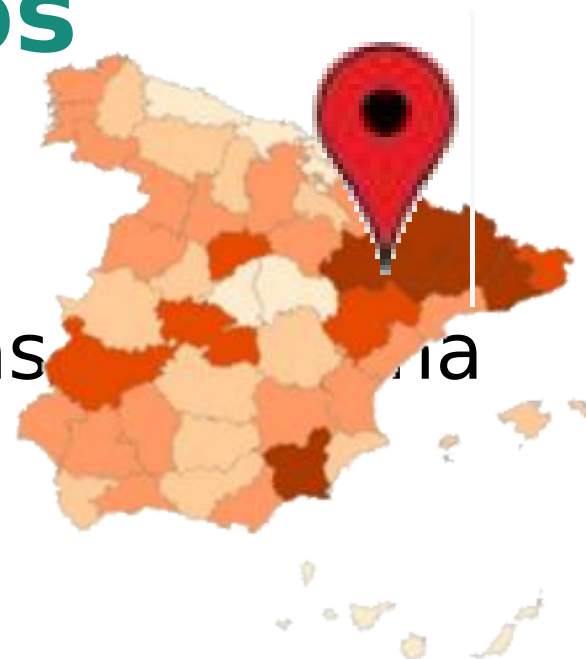
exopol

Objetivo del estudio

Evaluar la presencia de VHE en el ganado porcino de España y además, realizar una sencilla caracterización filogenética de los virus encontrados.

Material y métodos

- Población del estudio
Animales sanos de granjas
Edad: transición y cebo
Fecha del estudio: 2018



Tipo de muestra	n
Hígado	20
Heces	37
Fluido oral	23
TOTAL	80

Material y métodos

Detección del VHE

Pretatamiento de las muestras

Hígado y heces (homogeneizado)

MagNA Lyser Roche (Zirconia beads 0.1 mm)

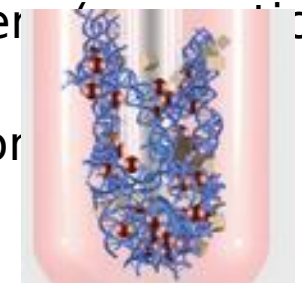
Fluido oral (decantación y procesado)



Extracción ácidos nucleicos (DNA+RNA)

Equipo automático de extracción KingFisher Flex System (Zirconia beads)

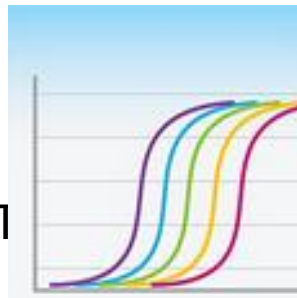
Kit extracción MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification



Amplificación

Diseño ensayo qPCR

7500 FAST RT PCR SYSTEM



Material y métodos

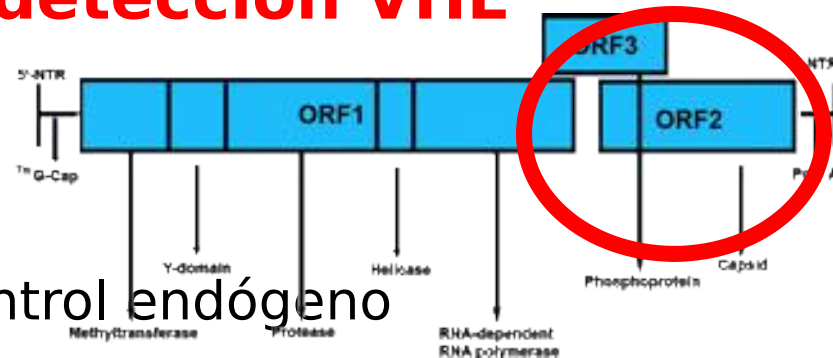
Ensayo qPCR para la detección VHE

Target: cápside (ORF2)

Amplicón 75 pb.

Criterio positivo $C_q < 40$

Detección simultánea control endógeno



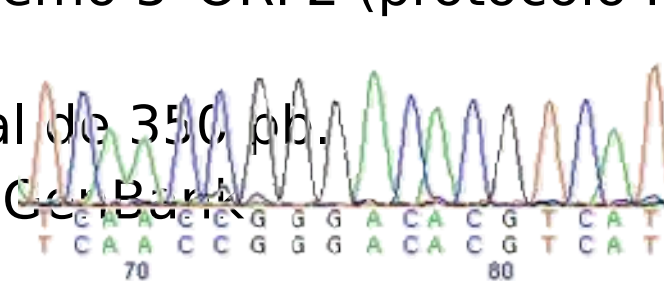
Estudio filogenético

Muestras positivas al ensayo qPCR

Secuenciación Sanger del extremo 5` ORF2 (protocolo Pina S., 2000) **Nested PCR**

Obtención de secuencia parcial de 350 pb.

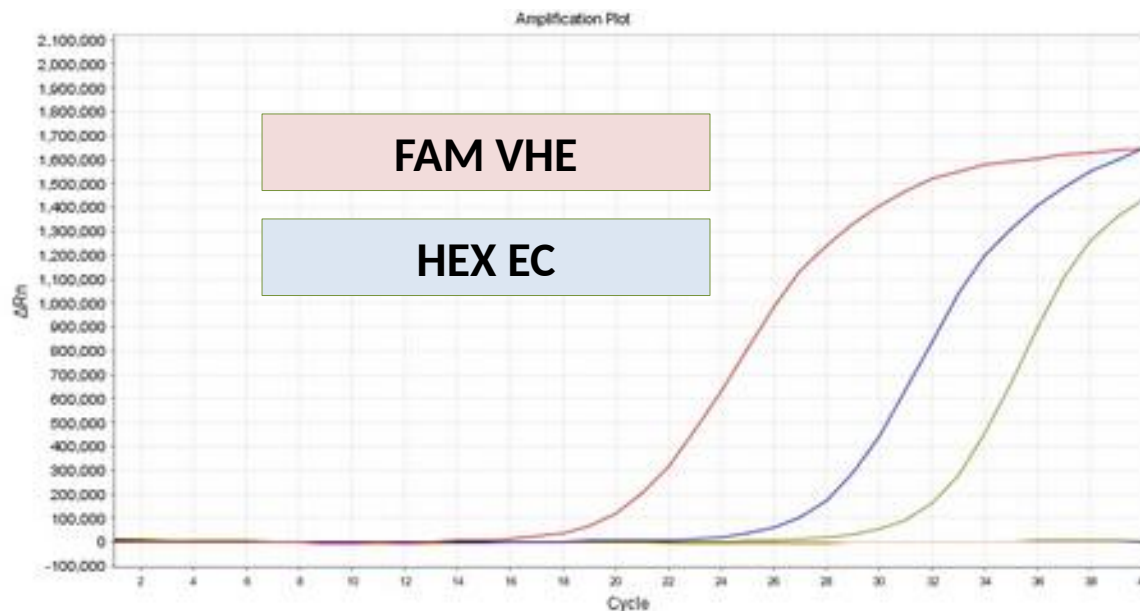
Comparación con secuencias GenBank



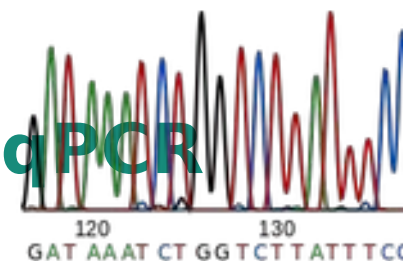
Resultados.

Detección qPCR VHE en muestras de cerdo.

MUESTRA	ANALIZADAS	POS	% POS	RANGO VALOR CQ
HÍGADO	20	0	0%	
HECES	37	8	21%	23-35
FLUIDO ORAL	23	4	17%	22-40
TOTAL	80	12	15%	22-40



Resultados. Secuenciación muestras positivas qPCR



Id. Caso	Muestra	Cq VHE	nested PCR	Secuencia
110047	Heces	31,09	BANDA INESPECIFICA	SUCIA
102960	Fluido oral	22,1	BANDA	OK
102961	Fluido oral	40,86	NO BANDA	
103389	Fluido oral	34,24	NO BANDA	
106543	Fluido oral	31,17	NO BANDA	
110081,1	Heces	35,53	NO BANDA	
110081,2	Heces	25,92	BANDA	OK
110301	Heces	32,0	NO BANDA	
110758	Heces	33,7	NO BANDA	
110760	Heces	23,96	BANDA	OK
110802	Heces	23,86	BANDA	OK
110865	Heces	23,48	BANDA	OK

Éxito en la secuenciación muestras con valor Cq < 31-32

Resultados. Filogenia.

Comparación homología de las muestras secuenciadas

	102960	110081	110760	110802	110865
102960		93	90	92	90
110081	93		88	93	89
110760	90	88		91	89
110802	92	93	91		90
110865	90	89	89	90	

Las muestras presentan una homología con rango 88%-93%. No muy alta.

Resultados. Filogenia.

Comparación secuencias con base datos GenBank

Id. Caso	Homología	Id. GenBank	País	Hospedador
102960	97%	KR027663	Francia	Humano
	96%	KT581448	España	Cerdo
110081	99%	LT745942	Francia	Humano
110760	95%	KR027325	Francia	Humano
	92%	FJ718691	Francia	Jabalí
110802	98%	KR027042	Francia	Humano
110865	95%	KJ742843	Francia	Humano
	95%	KC145135	España	Cerdo

Las muestras presentan una **homología alta** con VHE procedente de **pacientes humanos** de nuestro ámbito geográfico. Rango **99%-95%**.

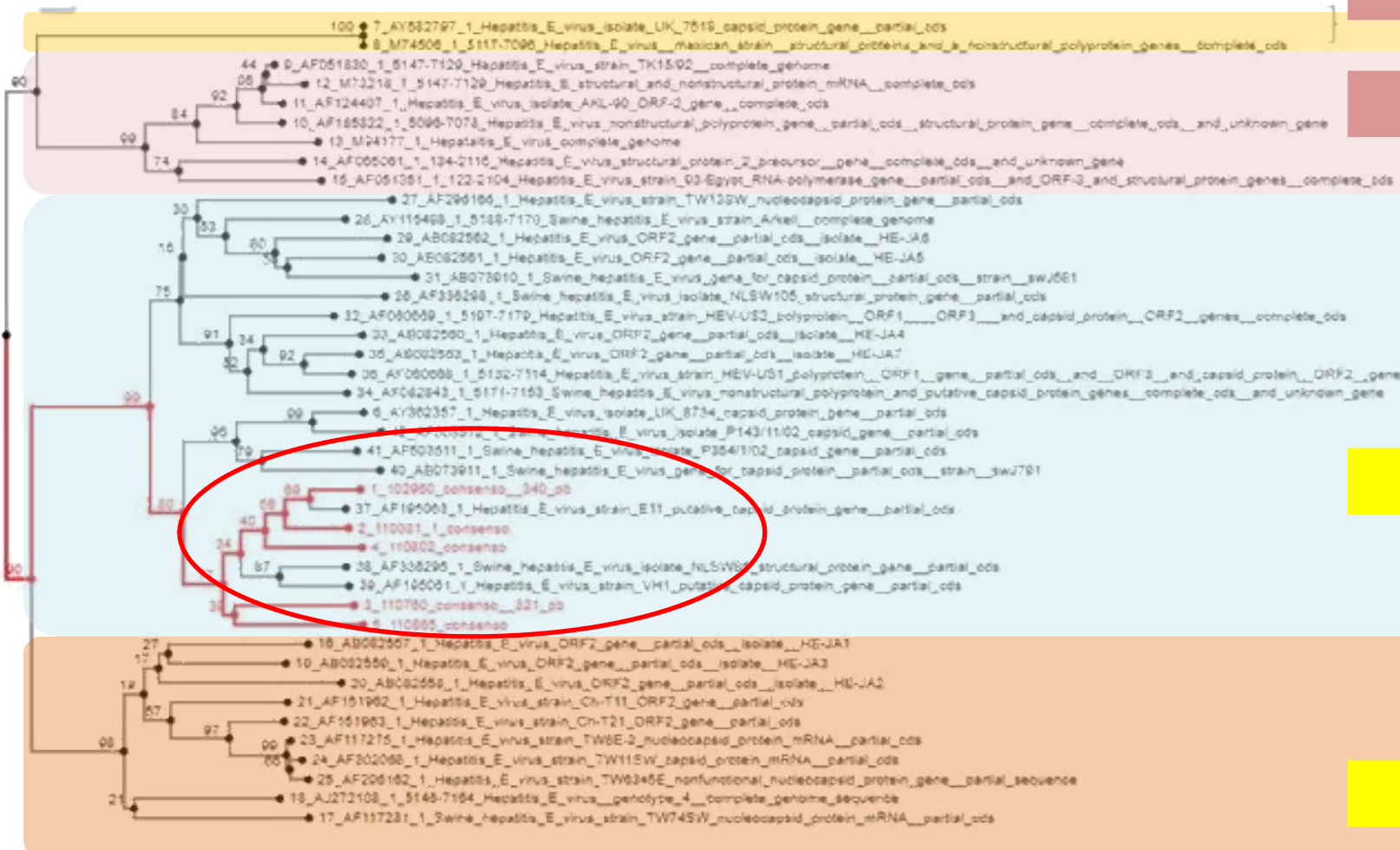
Resultados. Filogenia.

Genotipo 2

Genotipo 1

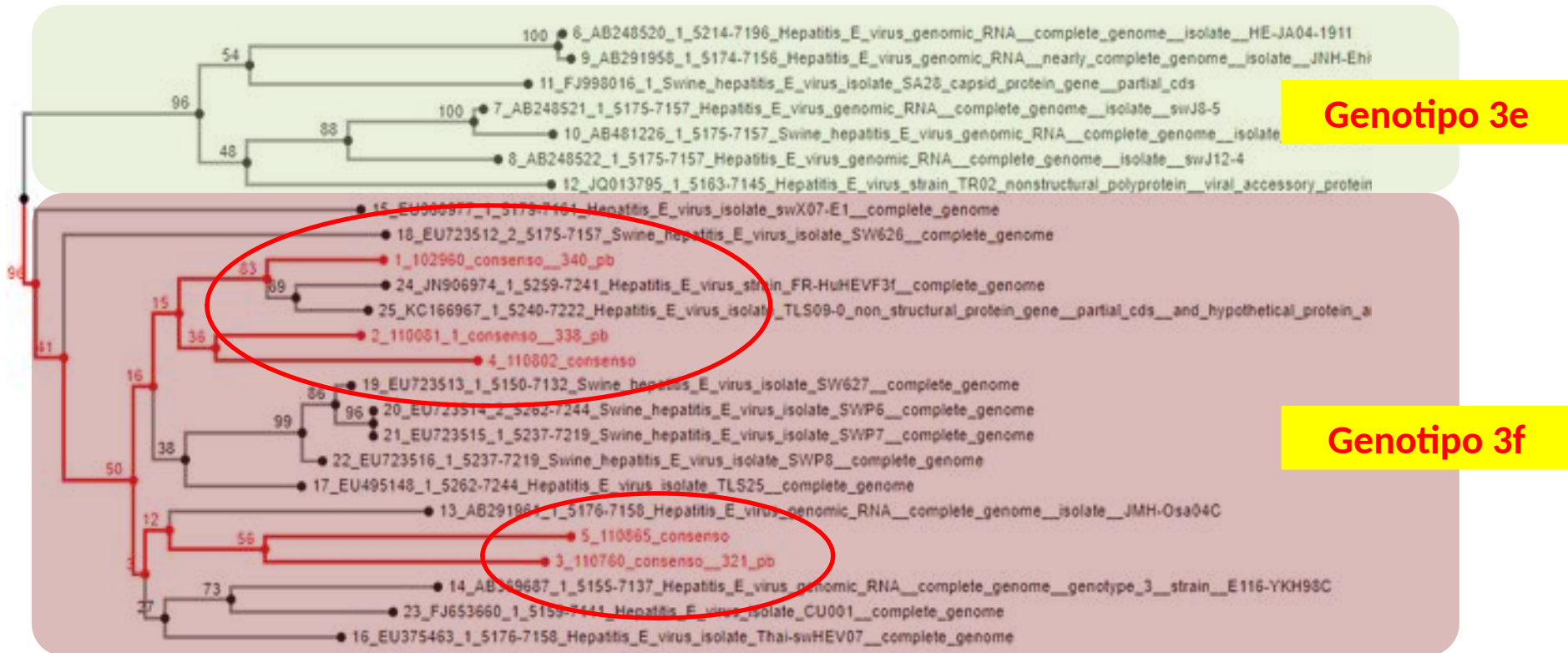
Genotipo 3

Genotipo 4



Secuencias referencia de VHE genotipo 1, 2, 3 y 4.

Resultados. Filogenia.



Secuencias referencia de VHE genotipo 3E y 3F. Fuente Lhome et al., 2015

Discusión.

1. Se detecta amplia distribución VHE en nuestro ganado porcino

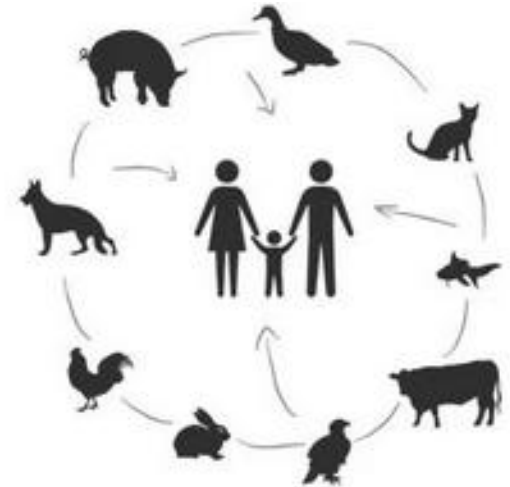
Prevalencias a nivel de individuo. La prevalencia a nivel granja debería ser

ESTUDIO	PREVALENCIA	PAÍS	AÑO
Este trabajo	15%	ESPAÑA	2018
Grierson S. et al.	15%	REINO UNIDO	2013
Wenzell JJ et al.	4%	ALEMANIA	2011
Rose N. et al.	31%	FRANCIA	2011
Di Bartolo et al.	31%	ITALIA	2011

Títulos altos de excreción (encontramos heces con Cq=25)
aumenta la circulación del virus entre los animales
aumenta el riesgo de contagio a personas expuestas

Discusión.

2. ¿VHE tiene carácter zoonótico? **S**



Argumentos

I. Homología muy alta entre cepas porcinas y humanas (95-99%)

Incluso más altas que las descritas anteriormente: Pina S. et al., 2000
92-94%

II. Seroprevalencia (IgG antiVHE) aumenta en población expuesta (Galiana et al., 2008) Datos Comunidad Valenciana: 19% expuestos vs 4% no expuestos

Factores de riesgo: bebida de agua no tratada y exposición a ganado porcino.

III. Coincidencia de subgrupos (humano y cerdo) en zonas de alta presión de infección

Discusión.



3. Importancia subestimada de la enfermedad

Veterinarios:

no causa enfermedad en cerdos

Médicos:

no se busca por exótica

se confunde con daño hepático por medicamentos

no hay tratamiento específico

China ha lanzado 2 vacunas

Conclusiones

- 1. Queda demostrada la presencia del VHE (genotipo 3f) en la ganadería intensiva de porcino de España en niveles comparables a países de nuestro entorno.**
- 2. VHE3f tiene carácter zoonótico, es agente etiológico de una enfermedad infecciosa emergente y queda establecida la homología entre cepas del virus de origen porcino con aquellas aisladas de pacientes humanos con infecciones autóctonas de Hepatitis E.**

Gracias por su atención!

jlarnal@exopol.com