

Estudio serológico preliminar de hepatitis E en cerdos en Chile*

Swine hepatitis E preliminary serological study in Chile

G. REINHARDT¹, M.V. Dr.med.vet.; H. IBARRA², Med.Ciruj.; S. RIEDEMANN¹, T.M., M.V., I. VEGA², B.Q.
¹Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias², Instituto de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.
e-mail: greinhar@uach.cl

SUMMARY

The hepatitis E virus (HEV) can cause acute epidemic hepatitis outbreak in humans. The path of transmission is oro-fecal, especially through contaminated water. It has been demonstrated that pigs can be infected with the human form of HEV. HEV antibodies and RNA from HEV have been found in pigs and other animals. Recently a new strain, called porcine HEV, was identified which differs from the human HEV. In Chile prevalence of anti-HEV in human general population reach 7%. However no studies have been made in pigs using ELISA and RT-PCR.

Two hundred and 175 serum samples from pigs of different ages and both sexes of Central Chile and Province of Valdivia, respectively were studied to determinate anti-HEV (IgG) by ELISA (Abbott Laboratories). RT-PCR was applied in 4 anti-HEV positive samples using human HEV sequence.

Nine point five percent (19/200) of the pigs in Central Chile and 0.6% (1/175) in the province of Valdivia were ELISA positive. The RT-PCR study of the four anti-HEV positive samples did not show the expected precipitation bands.

Our preliminary results show the presence of HEV in pigs in Chile. However, further studies to evaluate the magnitude of the problem are necessary using swine HEV sequences. This will allow to determine the real significance of HEV in Chile.

Palabras claves: Virus hepatitis E (VHE), ELISA, RT-PCR, cerdos, zoonosis.

Key words: Hepatitis E virus (HEV), ELISA, RT-PCR, pigs, zoonosis.

INTRODUCCION

El virus de la hepatitis E (VHE) es un patógeno de importancia en salud pública, sobre todo en países en vías de desarrollo donde puede provocar epidemias masivas de hepatitis aguda. En el hombre, la infección por VHE es autolimitante y no progresa a la cronicidad (Chandler y col., 1999).

El VHE se transmite preferentemente por vía oro-fecal y muy especialmente a través de agua contaminada (Meng y col., 1998).

Balayan y col. (1990) fueron los primeros investigadores que demostraron que el cerdo doméstico puede ser infectado en forma experimental con el VHE aislado del hombre. Por su parte, Clayson y col. (1995) informaron de la presencia de anticuerpos y de ARN del VHE en cerdos de Nepal, en el valle de Katmandú, donde la enfermedad es endémica en la población humana, todo lo cual sugeriría que podría existir un reservorio animal para el VHE (Reyes, 1997). También se han determinado anticuerpos anti-VHE en bovinos, primates y roedores (Maneerat y col., 1996; Favorov y col., 1998; Tsarev y col., 1998; Kabrane-Lazizi y col., 1999), lo que sugiere que esos animales podrían

Aceptado: 16.09.2003.

* Proyecto S-200176 DID-UACH.

haber infectado con el VHE o un agente viral relacionado y que la hepatitis E podría ser una enfermedad zoonótica.

En Chile se han efectuado diversos estudios de virus E mediante ELISA en seres humanos (Ibarra y col., 1994) que revelan una prevalencia de 4 a 7% (Brahm y col., 1996; Ibarra y col., 1997) Por otro lado, el VHE es responsable del 7% de hepatitis aguda en adultos en la X Región (Ibarra y col., 2001). En Chile, hasta el momento, no se ha determinado el virus E mediante técnicas de biología molecular. Sin embargo, existen resultados no publicados que han detectado bandas de precipitación concordantes con VHE en pacientes con hepatitis aguda (Ibarra, 2003)*.

Meng y col. (1997) identificaron un nuevo agente en el cerdo, denominándolo virus hepatitis E porcino, que reacciona en forma cruzada con anticuerpos contra el antígeno de la cápside del virus hepatitis E humano. Los análisis filogenéticos demuestran que el virus porcino está estrechamente relacionado con el agente viral de humanos, pero es distinto.

La presente comunicación informa de resultados preliminares de aplicación de ELISA para VHE y RT-PCR en muestras de suero de porcinos, como un estudio complementario al efectuado en pacientes humanos con hepatitis aguda por virus E.

MATERIAL Y METODOS

Para el estudio serológico de VHE se obtuvieron 200 sueros de cerdos de planteles de la zona central de Chile, donde se encuentra la mayor concentración de planteles porcinos, y 175 sueros de cerdos faenados en mataderos de Paillaco y Valdivia, X Región de Chile. Estos sueros fueron obtenidos por conveniencia, esto es, enviados a nuestro laboratorio para estudios de leptospirosis. Los sueros correspondían a animales de diferentes edades y de ambos sexos.

El método inmunoenzimático (ELISA) para la realización de la pesquisa de anticuerpos

correspondió a un “kit” comercial utilizado para la determinación de anticuerpos IgG por técnicas recombinantes (Abbott Laboratories).

Para el estudio por RT-PCR se seleccionaron 4 sueros anti-HEV positivos a ELISA, los que se analizaron mediante termociclador PTC-100, amplificando con la siguiente secuencia de partidores externos:

GGG-CCC-CAA-TTC-TTC-T
TTT-TCA-GGT-GGC-TGC-C

La secuencia de partidores internos fue:

GAA-GCG-CAC-AAC-ATC-AGG
ATC-GTC-AGA-GTC-CAG-GAG

La sonda de hibridación:

CTG-TGG-CTT-GAA-GTT-GAA-GG

Se esperó una banda de precipitación de 250 pb en electroforesis en gel de agarosa al 2% y bromuro de ethidio para su visualización.

RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis serológico de los 200 sueros de porcino enviados desde planteles porcinos de la zona central de Chile, mediante la prueba de ELISA permitió detectar 19 sueros reaccionantes a la prueba, lo que corresponde al 9.5% (19/200). En cuanto a los 175 sueros porcinos obtenidos de mataderos de Paillaco y Valdivia, solo 1 de ellos resultó reaccionante a la prueba serológica, lo que corresponde al 0.6% (1/175).

Mediante el empleo de una prueba de polimerasa en cadena (PCR), se examinaron 4 sueros porcinos de los que resultaron positivos a la prueba de ELISA. En ninguno de ellos se observó banda de precipitación esperada, lo que podría interpretarse como anti-VHE falso positivo por esa técnica, lo que parece poco probable, porque ésta detecta anticuerpos con alta sensibilidad. Por otro lado, la negatividad podría deberse a que el período de viremia es muy fugaz y por lo tanto no detectable, o más probablemente, que la secuencia de partidores utilizados del VHE humano no detecte al virus E porcino, siendo recomendable a futuro utilizar secuencias descritas para cerdos (Arankalle y col., 2002).

* Comunicación personal.

Los resultados obtenidos indican que el virus hepatitis E se encuentra presente en las poblaciones de cerdos en Chile, especialmente en plantales porcinos que habitualmente importan sus reproductores y hembras desde Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU.), donde la infección ha sido informada en diversas publicaciones (Meng y col., 1997; Meng y col., 1999; Meng, 2000).

La baja tasa de reaccionantes en sueros de porcinos faenados en mataderos de la provincia de Valdivia podría indicar que, por tratarse de cerdos que provenían de plantales pequeños y de producción autóctona, no existiría aún un grado muy alto de infección.

Todo lo anterior debería ser interpretado con cuidado, dado que este es el primer intento de pesquisar la probable presencia del agente en el país, lo que obliga a ser muy cauto en el análisis de los resultados y continuar con estudios más acabados para determinar exactamente la real magnitud del problema y relacionarlo con una probable infección que podría transmitirse al hombre.

Por lo anteriormente expuesto parece necesario continuar con estudios de análisis serológicos en porcinos, junto a estudios moleculares que permitan determinar el genoma viral para realizar las comparaciones con los aislados de otros países y con el agente viral que está actuando en la población humana de Chile.

Del mismo modo parece necesario obtener suero de personal que labora en contacto estrecho con porcinos, esto es médicos veterinarios, encargados de porquerizas, personal de mataderos dedicados al beneficio de porcinos, entre otros, con el objeto de verificar la posible implicancia del cerdo en la presencia de la infección con VHE en la población humana. Ello deberá ir acompañado de un número de muestras control de una población humana sin contacto estrecho con porcinos para evaluar la importancia de la especie como reservorio de una posible zoonosis.

Los resultados obtenidos concuerdan con aquellos informados en la literatura y en diversos países donde se han llevado a cabo análisis semejantes. Posiblemente la situación en Chile

sería más parecida a la que se observa en EE.UU que en países en vías de desarrollo, con una alta tasa de infección en la población humana, ya que el porcentaje de infección en humanos en nuestro país, como se planteaba en la introducción, no sobrepasa un 7%, porcentaje muy inferior a lo informado para países como Taiwán, China, y otros, con una alta tasa de infección, muchas veces de carácter epidémico (Arankalle y col., 1995; Huang y col., 1995; Hsieh y col., 1998; Wang y col., 1999).

RESUMEN

El virus de la hepatitis E (VHE) en el hombre puede provocar epidemias masivas de hepatitis aguda. Se transmite vía oro-fecal, especialmente por agua contaminada. Se ha demostrado que el cerdo puede ser infectado con el VHE humano. Se han detectado anticuerpos y ARN del VHE en cerdos y otras especies animales, lo que sugiere un reservorio animal. Por otro lado, se identificó un agente nuevo denominado VHE porcino, distinto del VHE humano. En Chile, en seres humanos se ha encontrado prevalencia de anti-HEV de hasta 7%, pero no se ha determinado su estudio por RT-PCR ni tampoco se ha investigado su significado en especies animales.

Mediante ELISA se determinaron anti-VHE (IgG), en 200 sueros de cerdos de plantales de la zona central de Chile y en 175 de la provincia de Valdivia, de diferentes edades y ambos sexos. De estos se seleccionaron 4 sueros anti-VHE positivos para estudios de VHE por RT-PCR, usando secuencias de VHE humano.

Por ELISA se detectaron 9.5% anti-VHE positivos (19/200) en plantales de la zona central y 0.6% (1/175) de la provincia de Valdivia, Chile. El estudio por RT-PCR de los 4 sueros anti-VHE positivos no visualizó las bandas de precipitación esperadas.

Estos resultados preliminares indican, por primera vez en Chile, que el virus E está presente en poblaciones de cerdos. Sin embargo, se necesitan de estudios más acabados para evaluar la magnitud del problema, usando secuencias de VHE porcinos y lograr la determinación del genoma viral.

BIBLIOGRAFIA

- ARANKELLE, V.A., S.A. TSAREV, M.S. CHADHA, D.W. ALLING, S.U. EMERSON, K. BANERJEE, R.H. PURCELL. 1995. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. *J. Infect. Dis.* 171: 447-450.
- ARANKALLE, V. A., L. P. CHOBE, M. V. JOSHI, M. S. CHADHA, B. KUNDU, A. M. WALIMBE. 2002. Human and swine hepatitis E virus from Western India belong to different genotypes. *J. Hepatol.* 36: 417-425.
- BALAYAN, M. S., R.-K. USMANOV, N. A. ZAMYATINA, D. I. DJUMALIEVA, F. R. KARAS. 1990. Brief report: Experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J. Med. Virol.* 32: 58-59.
- BRAHM, J., C. HURTADO, M. MORAGA, L. C. GIL, M. VELASCO, S. ALEGRÍA, B. PLAGERO. 1996. Infección con el virus de la hepatitis E en Chile. Comunicación preliminar. *Rev. Méd. Chile* 124: 947-949.
- CHANDLER, J. D., M. A. RIDDELL, F. LI, R. J. LOVE, D. A. ANDERSON. 1999. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet. Microbiol.* 68: 95-105.
- CLAYSON, E. T., B. L. INNIS, K. S. A. MYINT, S. NARUPITI, D. W. VAUGHN, S. GIRI, P. RANABHAT, M. P. SHRESTHA. 1995. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 228-232.
- FAVOROV, M. O., O. NAZAROVA, H. S. MARGOLIS. 1998. Is hepatitis E an emerging zoonotic disease? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 242.
- HSIEH, S. Y., P. Y. YANG, Y. P. HO, C. M. CHU, Y. F. LIAW. 1998. Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J. Med. Virol.* 55: 300-304.
- HUANG, R., N. NAKAZONO, K. ISHII, O. KAWAMATA, R. KAWAGUCHI, Y. TSUKADA. 1995. Existing variations on the gene structure of hepatitis E virus strains from some regions of China. *J. Med. Virol.* 47: 303-308.
- IBARRA, H., S. RIEDEMANN, F. SIEGEL, G. REINHARDT, C. TOLEDO, G. FROESNER. 1994. Hepatitis E virus in Chile. *Lancet* 344: 1501.
- IBARRA, H., S. RIEDEMANN, G. REINHARDT, P. FRICK, F. SIEGEL, C. TOLEDO, M. CALVO, G. FROESNER. 1997. Prevalencia de anticuerpos del virus hepatitis E en donantes de bancos de sangre y otros grupos de población. *Rev. Méd. Chile* 125: 275-278.
- IBARRA, H., S. RIEDEMANN, S. SIEGEL, C. TOLEDO, G. REINHARDT. 2001. Hepatitis aguda por virus A, E y no A-E en adultos chilenos a fines de los años 90. *Rev. Méd. Chile* 129: 523-530.
- KABRANE-LAZIZI, Y., J. B. FINE, J. ELM, J. F. GLASS, H. HIGA, A. DIWAN, C. J. GIBBS Jr., X. J. MENG, S. U. EMERSON, R. H. PURCELL. 1999. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 331-335.
- MANEERAT, Y., E. T. CLAYSON, K. S. A. MYINT, G. D. YOUNG, B. L. INNIS. 1996. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J. Med. Virol.*, 48: 121-128.
- MENG, X. J., R. H. PURCELL, P. G., HALBUR, J. R. LEHMAN, D. M. WEBB, T. S. TSAREVA, J. S. HAYNES, B. J. THACKER, S. U. EMERSON. 1997. A novel virus in swine closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Sci. USA.* 94: 9860-9865.
- MENG, X. J., P. G. ALBUR, J. S. HAYNES, T. S. TSAREVA, J. D. BRUNA, R. L. ROYER, R. H. PURCELL, S. U. EMERSON. 1998. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not human strains of HEV. *Arch. Virol.*, 143: 1405-1415.
- MENG, X. J., S. DEA, R. E. ENGLE, R. FRIENDSHIP, Y. S. LYON, T. SININARUMITR, K. URAIRONG, D. WANG, D. WONG, D. YOO, Y. ZHANG, R. H. PURCELL, S. U. EMERSON. 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.* 58: 297-302.
- MENG, X. J. 2000. Zoonotic and xenozoonotic risks of hepatitis E virus. *Infect. Dis. Rev.* 2: 35-41.
- REYES, G. R. 1997. Overview of the epidemiology and biology of the hepatitis E virus. In WILSON, R.A. Editor. *Viral Hepatitis*. N.Y. Ed. Marcel Dekker, pp: 239 - 258
- TSAREV, S. A., M. P. SHRESTHA, J. HE, R. M. SCOTT, D. W. VAUGHN, E. T. CLAYSON, S. GIGLIOTTI, C. F. LONGER, B. L. INNIS. 1998. Naturally acquired hepatitis E virus (HEV) infection in Nepalese rodents. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 242.
- WANG, Y., R. LING, J. C. ERKER, H. ZHANG, H. LI, S. DESAI, I. K. MUSHAHWAR, T. J. HARRISON. 1999. A divergent genotype of hepatitis E in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.*, 80: 169-177.