

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular



**Estudio epidemiológico del virus de la hepatitis
E (VHE) en trabajadores de explotaciones
porcinas y en donantes voluntarios de la
Comunidad Valenciana**

Tesis Doctoral presentada por la Licenciada
D^a Carolina Galiana Roselló para optar al grado
de Doctor en Farmacia.

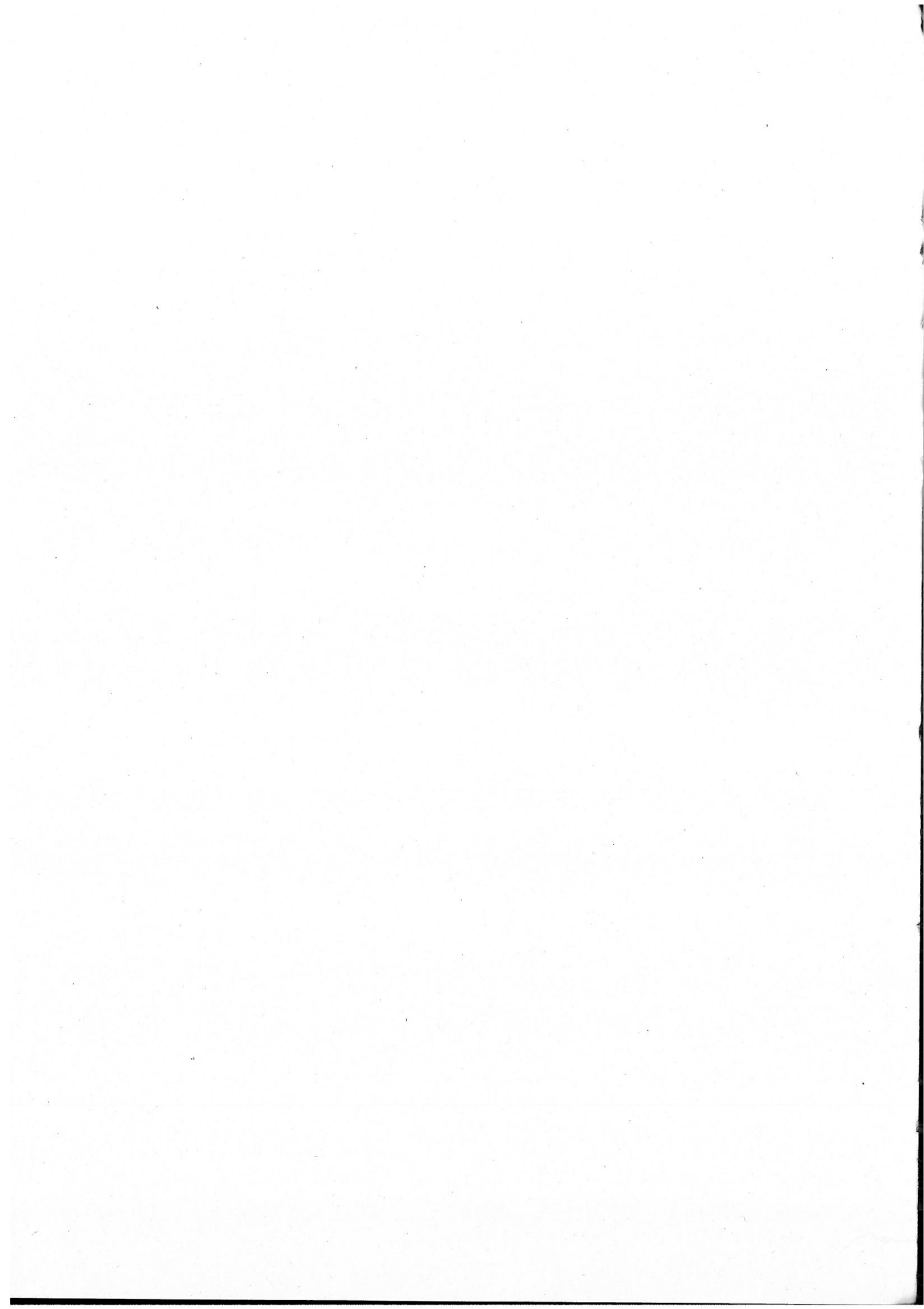
Dirigida por:

Dra. Dña. M^a Teresa Pérez Gracia

Dr. D. Ángel García Muñoz

VALENCIA

2008





CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

*Facultad de Ciencias
Experimentales y de la Salud*

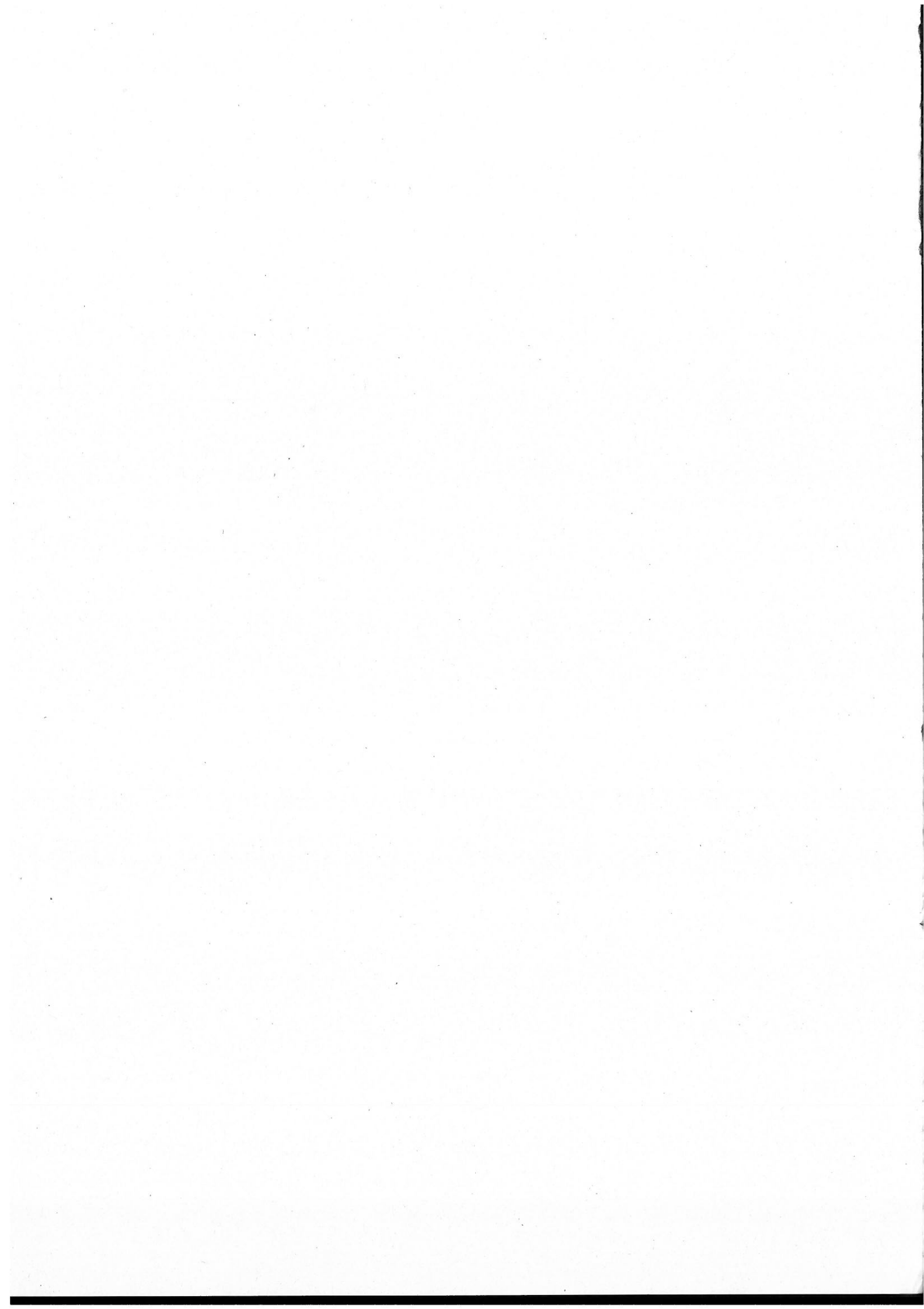
Dña. María Teresa Pérez Gracia, Profesora Titular de Microbiología del Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, de la Universidad CEU Cardenal Herrera,

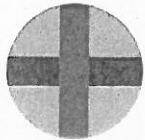
INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE) EN TRABAJADORES DE EXPLOTACIONES PORCINAS Y EN DONANTES VOLUNTARIOS DE LA COMUNIDAD VALENCIANA”** ha sido realizada por Dña. Carolina Galiana Roselló, bajo mi dirección y cumple los requisitos para su defensa.

Y para que así conste, firmo el presente en Moncada (Valencia) a 2 de julio de 2008.

Fdo.: Dra. María Teresa Pérez Gracia





CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

*Facultad de Ciencias
Experimentales y de la Salud*

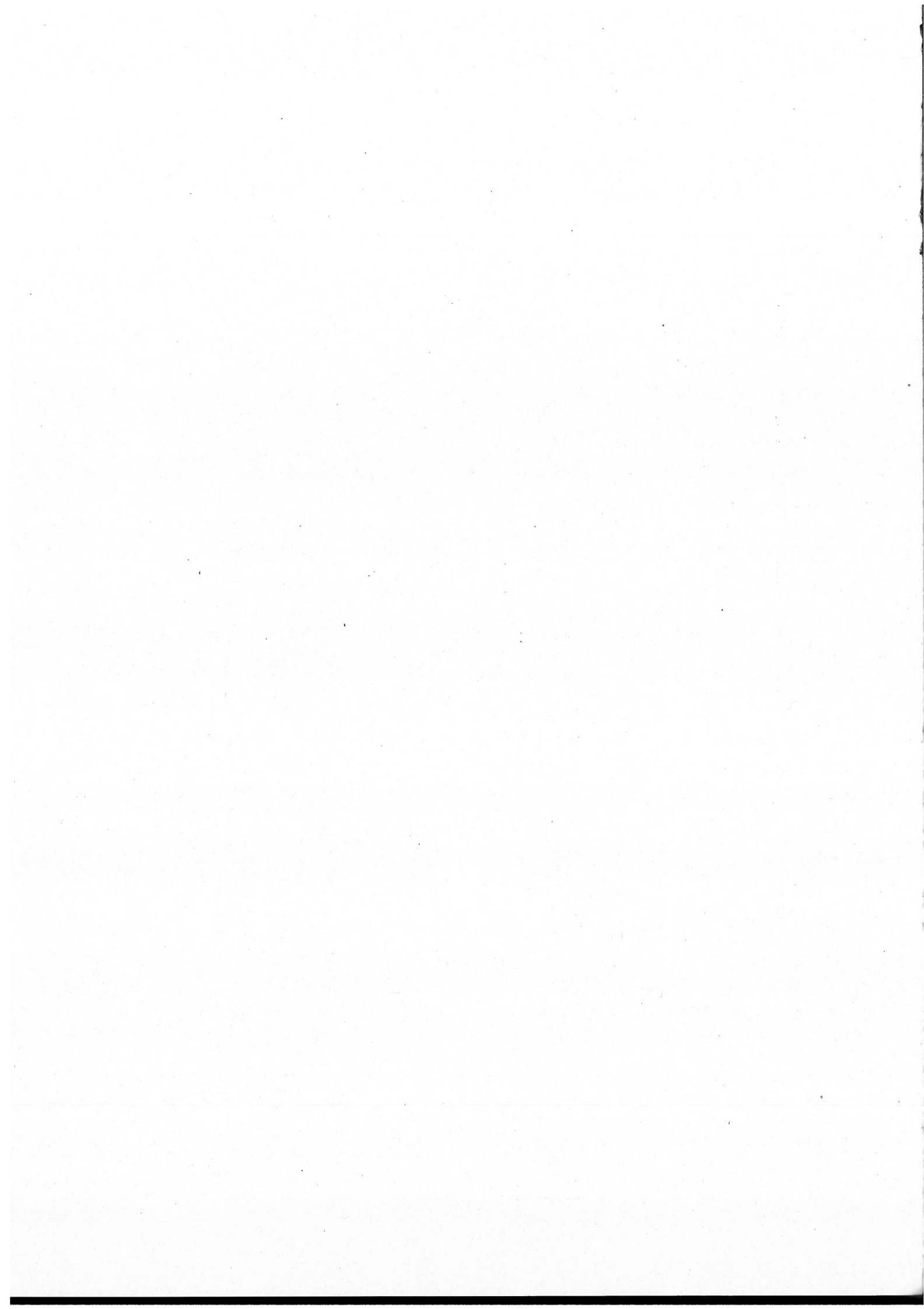
D. Ángel García Muñoz, Profesor Titular de Microbiología y Enfermedades Infecciosas del Departamento de Producción Animal, Sanidad Animal y Ciencia y tecnología de los Alimentos, de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, de la Universidad CEU Cardenal Herrera,

INFORMA:

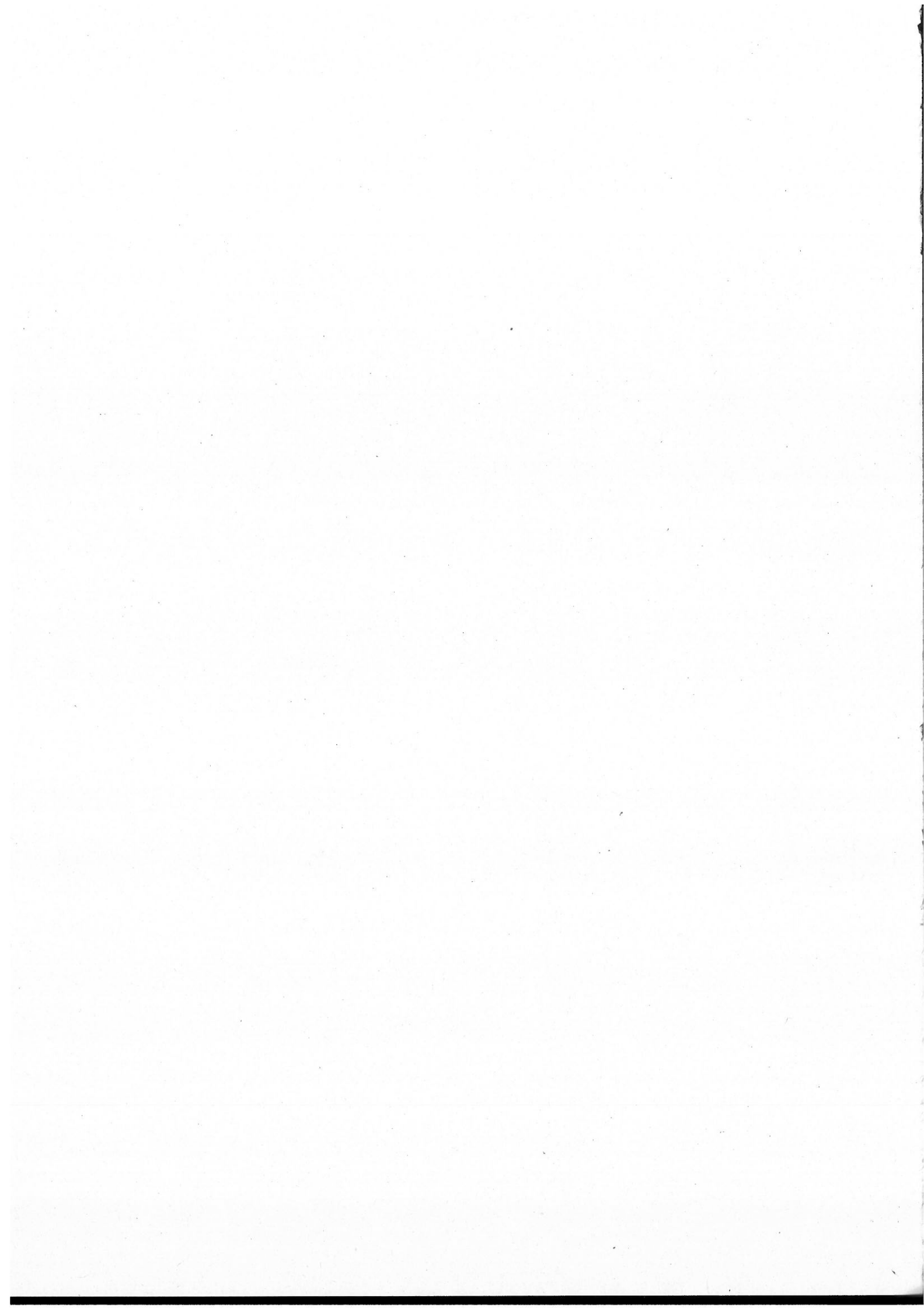
Que la Tesis Doctoral titulada **“ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE) EN TRABAJADORES DE EXPLOTACIONES PORCINAS Y EN DONANTES VOLUNTARIOS DE LA COMUNIDAD VALENCIANA”** ha sido realizada por Dña. Carolina Galiana Roselló, bajo mi dirección y cumple los requisitos para su defensa.

Y para que así conste, firmo el presente en Moncada (Valencia) a 2 de julio de 2008.

Fdo.: Dr. Ángel García Muñoz



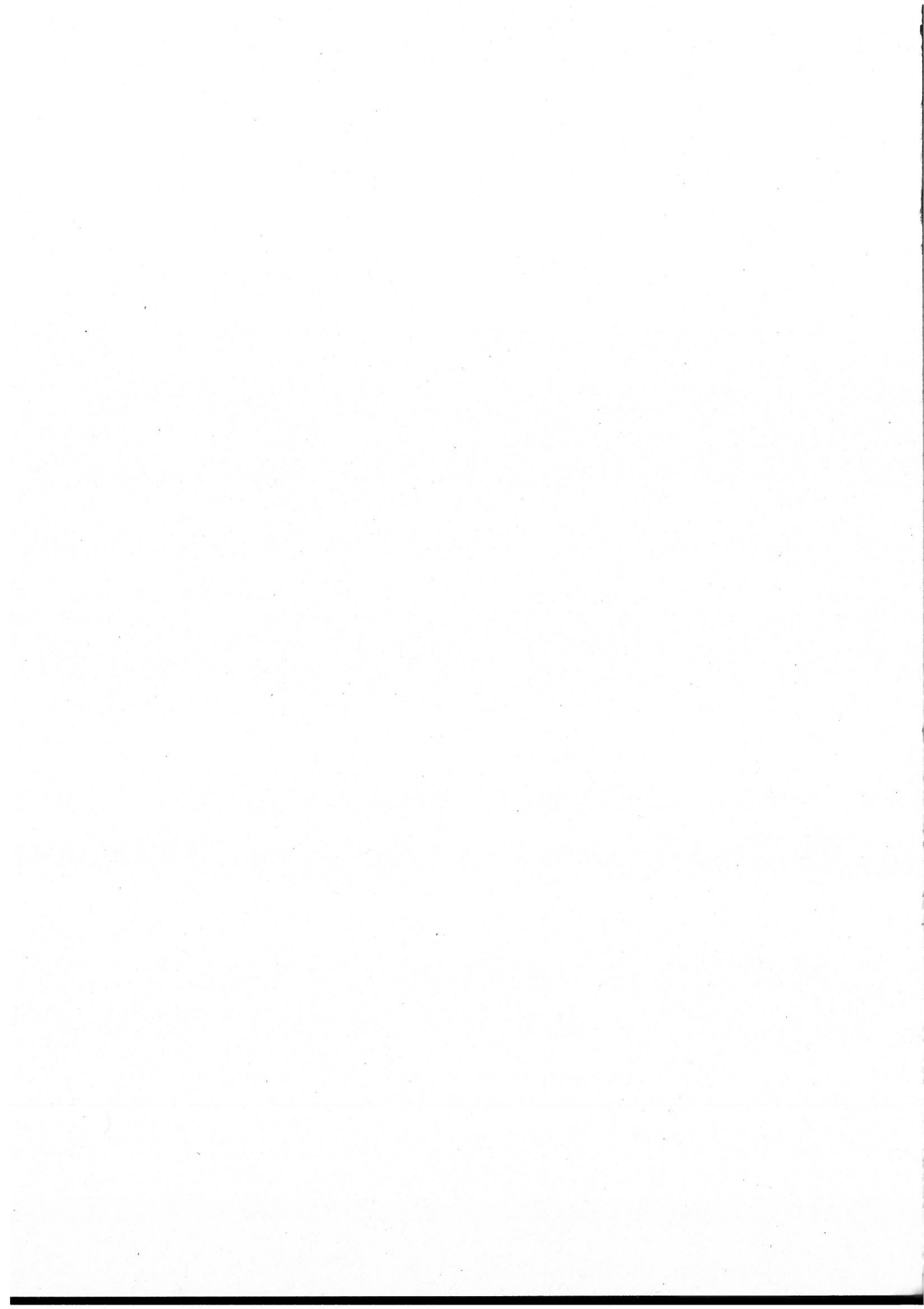
Este trabajo ha sido financiado por los proyectos UCH 02/26. 03/15, 04/08 y 06/21 de la Universidad Cardenal Herrera-CEU, así como por los proyectos de la Escuela Valenciana de Estudios de Salud (053/2005) y la Consellería de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana (GV05/132).



A mis padres

A mi familia

A Maria, Jùlia y Lola



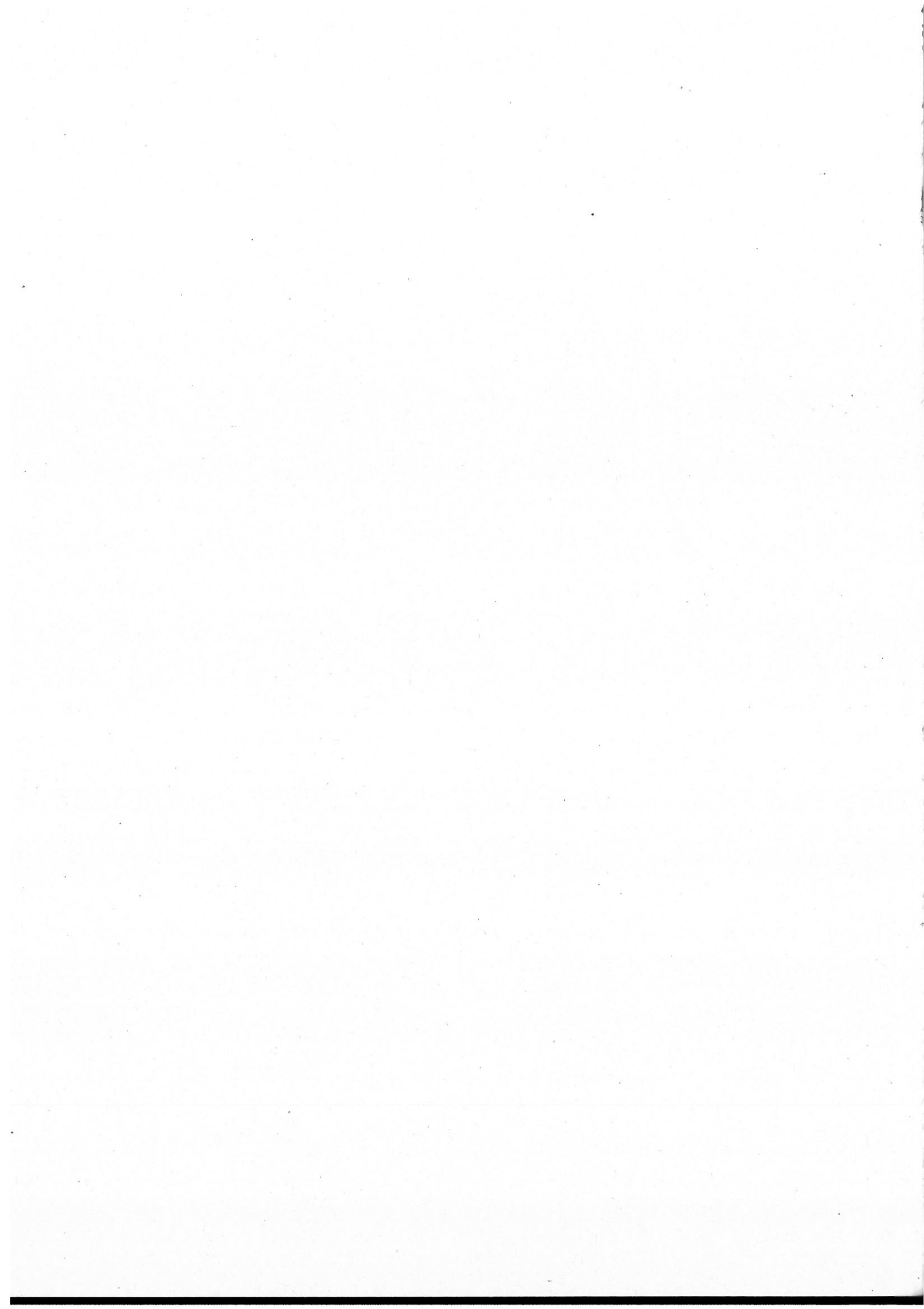
Me gustaría agradecer este trabajo de investigación aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Teresa Pérez Gracia la confianza que siempre me ha demostrado. En todo momento ha sabido orientarme y apoyarme tanto en el ámbito laboral como en el personal. Comenzó siendo mi profesora de Microbiología Clínica y continuó como mi tutora de tesis y ahora además nos une una gran amistad. Gracias por enseñarme tantas cosas, por tus consejos y por la confianza depositada en mí.

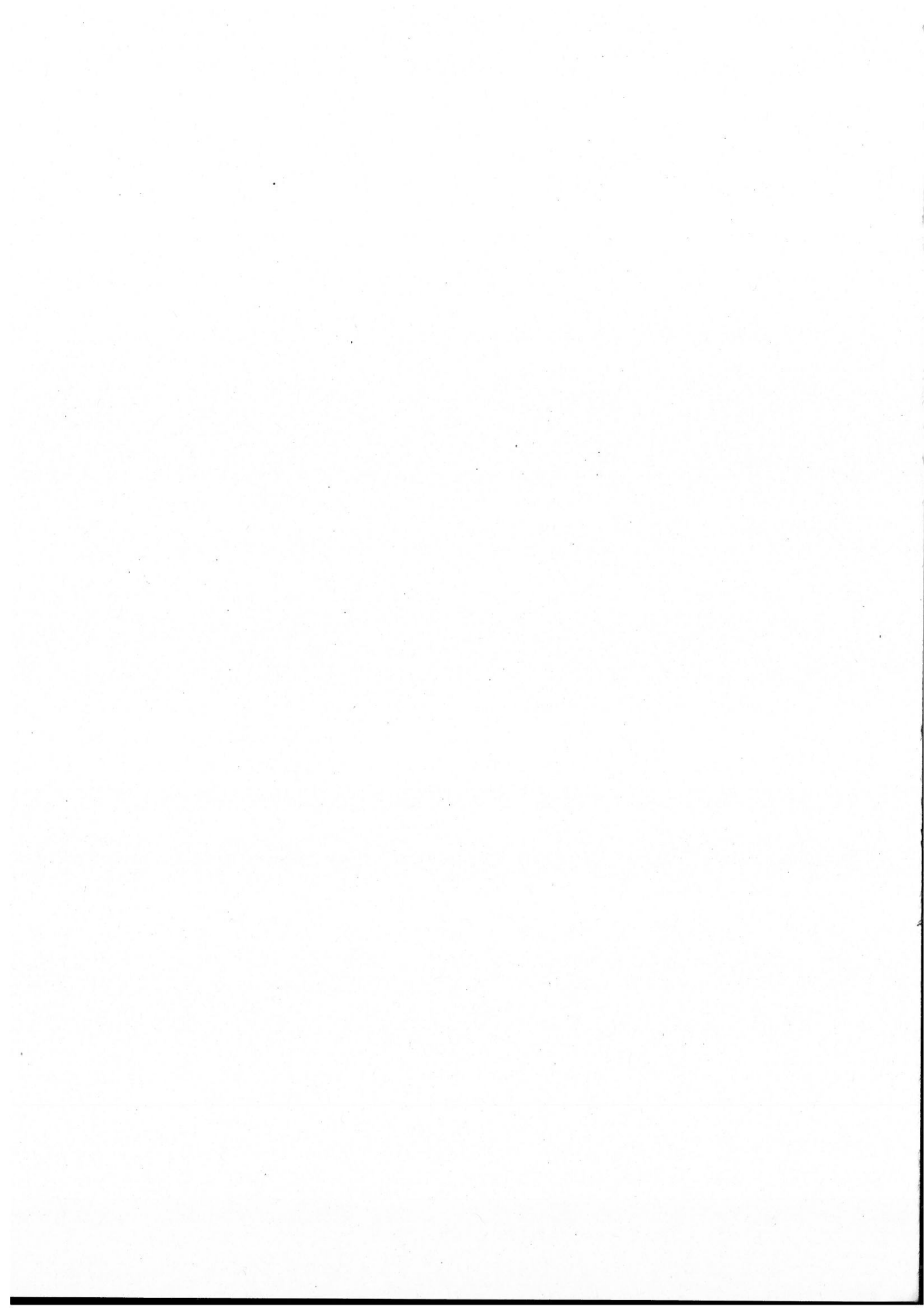
En segundo lugar, agradecer al Dr. Ángel García Muñoz toda la ayuda que me ha prestado y el esfuerzo que ha empleado como tutor y compañero. Destacar su sabiduría, su forma de redactar y sobretodo su lealtad.

A Salceda, mi fiel compañera de despacho. Agradecerte, las tardes que hemos pasado en los distintos despachos que hemos tenido. Gracias por acogerme con tanto cariño en el inicio de mi estancia aquí, por los maravillosos momentos de nuestros viajes cuando estuvimos de congreso, por enseñarme tantas cosas, por guiarme, por ayudarme siempre. Empezaste siendo mi compañera de trabajo y ahora eres una de mis mejores amigas.

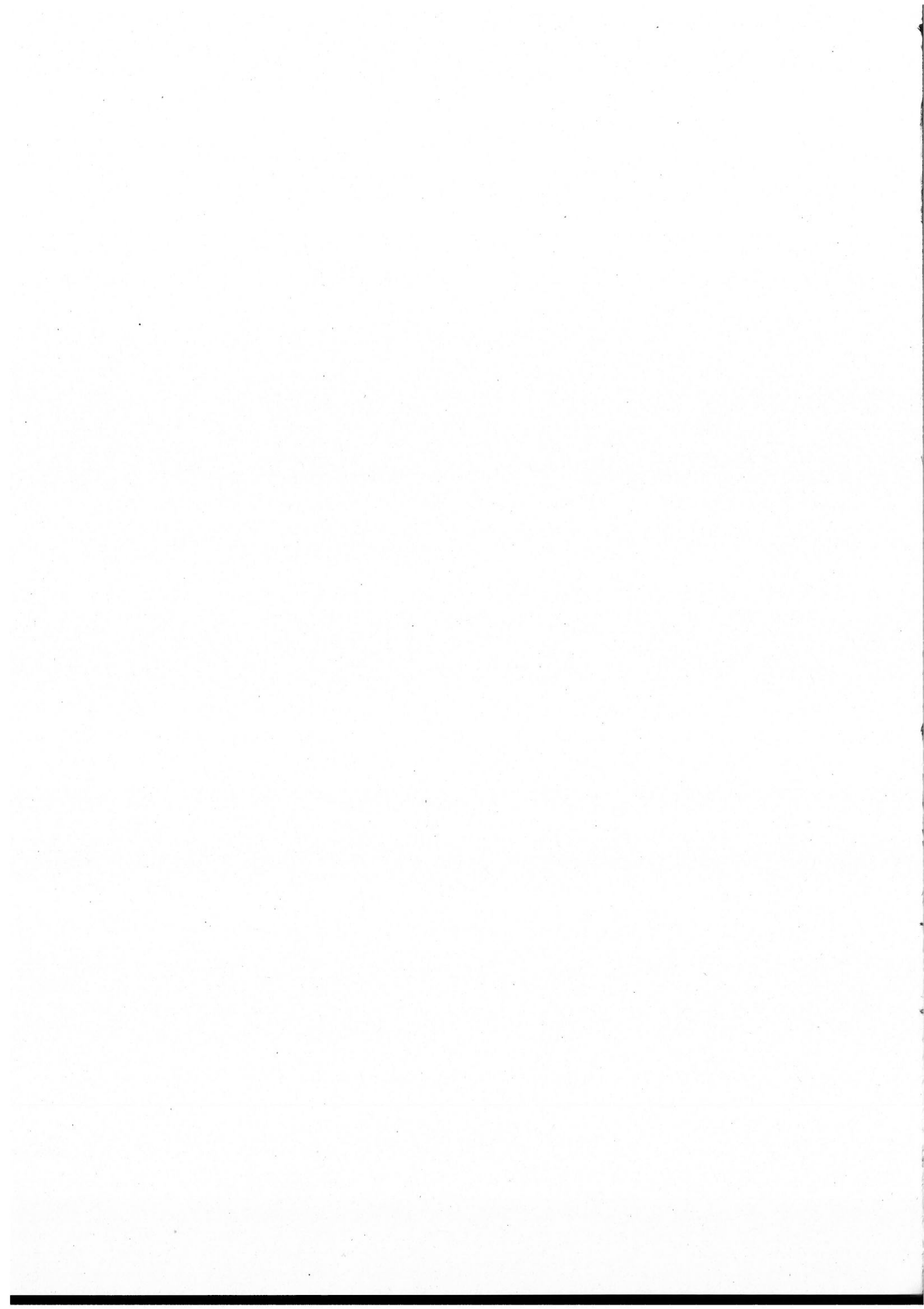
A todos mis compañeros y amigos de laboratorio, Teresa Gómez, José Sansano, Mario, Marilena, Cris, Carmen y Maruxi, que han hecho de esos días, momentos inolvidables. Y sin duda, a mí querido Pepito (Toni), que le echo mucho de menos.



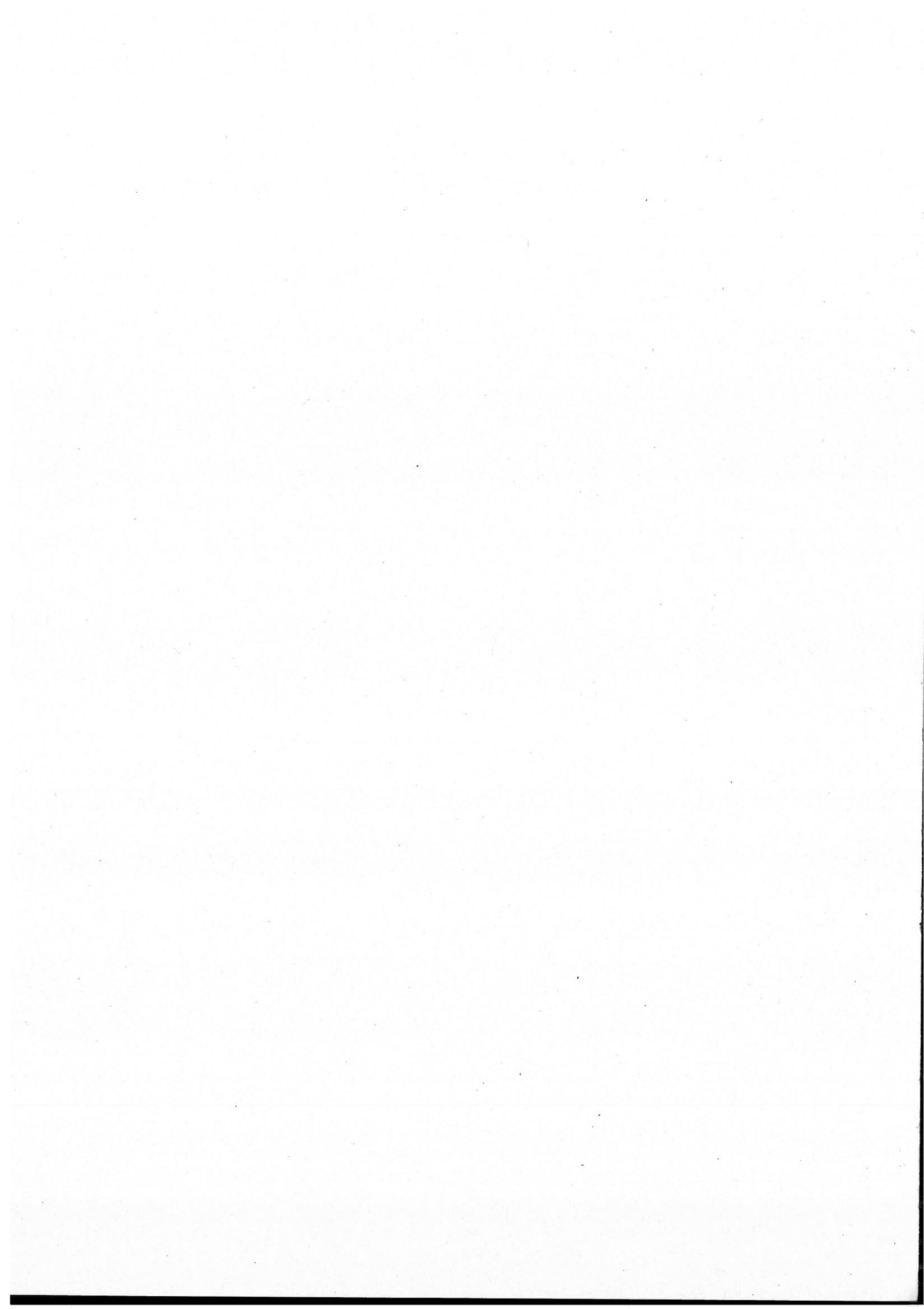
Por último, agradecer a toda mi familia el apoyo continuo que me han demostrado, gracias por confiar en mí y animarme en los malos momentos. Y no podría terminar estos agradecimientos sin nombrar a la persona que en este último tramo siempre ha estado a mi lado y ha significado tanto para mi, gracias Ximo.



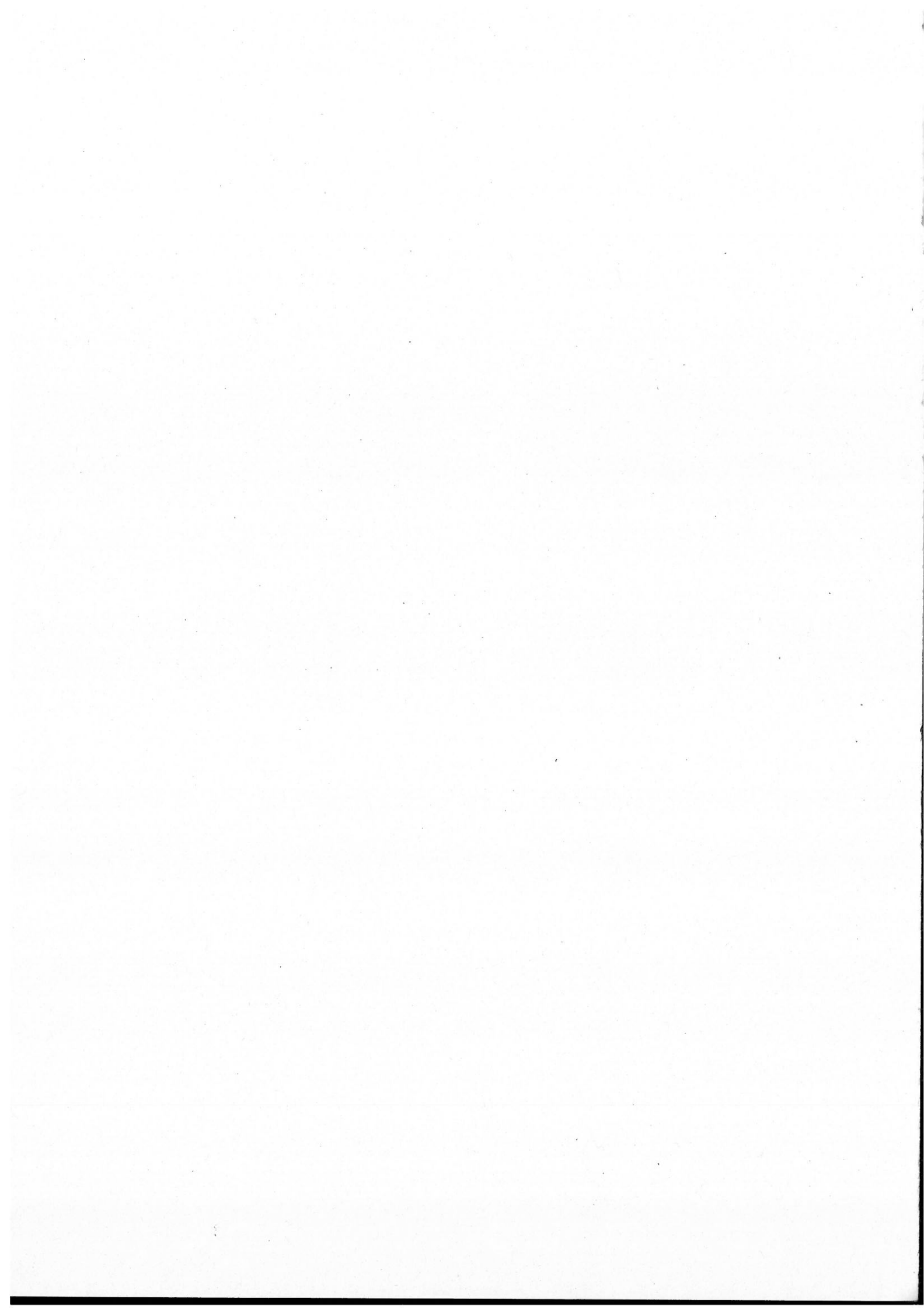
ÍNDICE



1.	Resumen	1
2.	Summary	9
3.	Justificación y objetivos	16
4.	Revisión bibliográfica	20
4.1	Partícula vírica	21
4.2	Clasificación y filogenia	23
4.3	Replicación	35
4.4	Epidemiología	36
4.4.1	Vías de transmisión	37
4.4.2	Formas de presentación	41
4.4.3	Aspectos zoonóticos	47
4.5.	Manifestaciones clínicas	51
4.6	Diagnóstico	53
4.7	Prevención	58
4.7.1	Vacunas	59
5.	Material y métodos	61
5.1	Diseño del estudio	62
5.2	Diseño epidemiológico y estadístico	62
5.3	Muestras	63
5.4	Procesamiento de las muestras	68
5.5	Determinación cuantitativa de transaminasas hepáticas	69
5.6	Detección del ARN-VHE	72
5.6.1.	Extracción de ARN-VHE	74
5.6.2.	Retrotranscripción o transcripción inversa del ARN vírico	76
5.6.3.	Nested-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa anidada)	77
5.6.4.	Electroforesis del producto amplificado	82
5.7	Determinación de anticuerpos anti-VHE de tipo IgG/IgM e IgA mediante el Enzimoimmunoensayo (ELISA)	85
5.8	Inmunoblot VHE IgG/IgM	91
6.	Resultados y Discusión	96
7.	Conclusiones	122



8.	Bibliografía	124
9.	Glosario de abreviaturas	165
10.	Publicaciones relacionadas con la tesis	169



1. RESUMEN

El virus de la hepatitis E (VHE) es un virus no envuelto, constituido por un ARN monocatenario de polaridad positiva (7,2Kb) (Reyes y col. 1990; Aye y col. 1992) y con tres regiones de lectura abierta (ORFs) (Tam y col. 1991). El ORF1 codifica la poliproteína no estructural (nsP) (Koonin y col. 1993). El ORF2 codifica la poliproteína mayor de la cápside vírica (Zafrullah y col. 1999). El ORF3 codifica una fosfoproteína inmunogénica asociada con el citoesqueleto celular de función desconocida (Zafrullah y col. 1997).

El VHE se ha clasificado en la familia *Hepeviridae*, como único integrante del género *Hepevirus* (Emerson y col. 2004). En base a las comparaciones filogenéticas y al análisis de las secuencias aisladas se han obtenido cepas de referencia (Wang y col. 2002) y se han identificado 4 genotipos y 24 subtipos diferentes (Lu y col. 2006).

La principal vía de transmisión del VHE es la transmisión fecal-oral, a través de aguas contaminadas con residuos fecales. Estas aguas contaminadas dan origen a epidemias y brotes, principalmente en países subdesarrollados. También, se han descrito diversas vías de transmisión como la vertical, parenteral, por contacto directo y transmisión alimentaria. Esta última vía de transmisión, debido a los casos documentados por la ingestión de carne cruda de animales como cerdo, ciervo y jabalí, parece ser cada vez más importante (Deest y col. 2007).

La infección por este virus es endémica en países que presentan condiciones higiénico-sanitarias deficientes, siendo las principales zonas endémicas Asia,

África y Méjico (Krawczynski 1993). El VHE tiene dos formas de presentación, la epidémica y la esporádica. La epidémica suele ser el resultado de una contaminación fecal de las aguas de abastecimiento público y es frecuente en países en vías de desarrollo. La forma de presentación esporádica suele estar relacionada con individuos que han viajado a zonas endémicas (Chapman y col. 1993; Skaug y col. 1994; Pham y col. 1994), aunque cada vez es más frecuente, que se den casos en los que no se han producido viajes a estas áreas endémicas. En este sentido, se han descrito casos autóctonos de hepatitis E en países industrializados entre los que se encuentra España. En estos países no endémicos, se ha detectado una prevalencia de anticuerpos anti-VHE en humanos y diferentes especies animales como cerdos, roedores, aves de corral, gatos, perros, ovejas, cabras y vacas. El ganado porcino ha mostrado la seroprevalencia más elevada y además se ha detectado una elevada homología genética entre aislados del VHE de origen porcino y humano en países como Estados Unidos, (Meng y col. 1997), Japón (Takahashi y col. 2003), Reino Unido (Ijaz y col. 2005), Taiwán (Hsieh y col. 1999), Corea (Ahn y col. 2005) y España (Pina y col. 2000). Estos datos confirmarían la hipótesis de que el virus de la hepatitis E es zoonótico.

Los principales objetivos de este estudio fueron detectar el ARN-VHE mediante RT-nested-PCR en personas expuestas al ganado porcino y en personas sin exposición (donantes voluntarios) de la Comunidad Valenciana. En segundo lugar, detectar la presencia de anticuerpos anti-VHE de clase IgG, IgM e IgA mediante enzimoimmunoensayo en los grupos citados anteriormente, confirmando la presencia de anticuerpos anti-VHE de clase IgM e IgG mediante

inmunoblot. El tercer objetivo fue determinar y valorar los factores de riesgo asociados a la presencia de marcadores del VHE (contacto con ganado porcino, viaje a zonas endémicas, ingesta de marisco crudo y verduras crudas e ingesta de agua no tratada) y por último, contribuir al conocimiento de la epidemiología del VHE, aportando datos que ayuden a esclarecer las posibles vías de transmisión.

Se incluyeron en este estudio un total de 212 individuos con edades comprendidas entre 20 y 60 años. Se clasificaron en dos grupos según la exposición a ganado porcino, 113 (53,3%) pertenecieron al grupo de expuestos y 99 (46,7%) al grupo sin exposición. A todos los individuos se les realizó una encuesta epidemiológica que recogía información general (nombre, edad, sexo, lugar de residencia, etc) y se obtuvieron datos sobre posibles factores de riesgo para contraer el VHE, como fueron exposición a ganado porcino y años de exposición, realización de viajes al extranjero y en su caso el país visitado, consumo de marisco crudo, verduras crudas y consumo de agua no tratada. Para la determinación del nivel de transaminasas hepáticas (ALT y AST) se utilizó un ensayo comercial. La detección del ARN-VHE se realizó mediante RT-nested-PCR. Para el análisis de anticuerpos anti-VHE de tipo IgG, IgM se utilizó un método inmunoenzimático comercial realizando modificaciones para la detección de anticuerpos tipo IgA. Las muestras positivas a anticuerpos anti-VHE IgG e IgM se confirmaron mediante una prueba de inmunoblot.

El análisis estadístico se realizó mediante regresión logística binaria, para ello se tomó en cada caso como variable dependiente la variable a estudiar y como covariables las demás variables del estudio. Esto nos permite estudiar el efecto

de cada variable sobre las demás. Para determinar la correlación entre variables, se calculó los OR (Odds ratio) con sus correspondientes intervalos de confianza del 95%. Se consideraron valores significativos aquellos que tuvieron un valor $p < 0,05$. La bondad de ajuste del modelo se realizó con la prueba de Hosmer-Lemeshow.

De un total de 212 individuos que componen este estudio, no se identificó el ARN-VHE en ninguno de ellos. Todas las personas presentaron niveles normales de transaminasas hepáticas. En lo que hace referencia a la detección de anticuerpos frente al VHE en los 212 individuos analizados, 25 personas (11,8%) presentaron anti-VHE de tipo IgG, mientras que 1 persona (0,4%) presentó anticuerpos anti-VHE de tipo IgM. Los anticuerpos anti-VHE IgA se detectaron en 3 individuos (1,4%).

En el análisis estadístico obtuvimos diferencias significativas entre la presencia de anti-VHE IgG en hombres y mujeres, exposición a ganado porcino y consumo de agua no tratada.

En primer lugar, la presencia de anti-VHE IgG en hombres y mujeres, resultó significativa ($p=0,01$) con un valor de OR de 7,73 (IC de 2,2-26,7) para los hombres. En nuestro estudio, aunque presente valor significativo, no lo hemos considerado como un factor de riesgo, debido a que en el grupo de expuestos la mayoría son hombres y en el grupo de no expuestos la mayoría son mujeres. No existe ningún estudio que confirme el género como factor de riesgo para contraer la infección.

En segundo lugar, la exposición a ganado porcino es un factor de riesgo para contraer la infección por el VHE ($p=0,004$), con una OR de 5,19 y un IC del 1,7-15,7, es decir, un individuo con contacto a ganado porcino puede llegar a tener una probabilidad de infectarse por el VHE, hasta 5,19 veces más que un individuo sin exposición. Existen pocos estudios en el mundo que analicen la exposición a ganado porcino y la seropositividad frente al VHE, aunque casi todos describen altas prevalencias entre las personas que tienen contacto con cerdos en comparación con los grupos control. Estos estudios realizados en países como Taiwán (Hsieh y col. 1999), Moldavia (Drobenuic y col. 2001), Estados Unidos (Meng y col. 2002; Withres y col. 2002), Suecia (Olsen y col. 2006), Italia (Vulcano y col. 2007) y Holanda (Bouwknegt y col. 2007) han obtenido unos valores de seroprevalencia en individuos expuestos del 26,7%, 51,1%, 23%, 10,9%, 13%, 3,3%, y 11%, respectivamente. La gran variedad entre las prevalencias descritas en los diferentes estudios citados, puede ser debida a la diversidad del tamaño muestral, al país donde se realiza el estudio y a la técnica de diagnóstico utilizada.

En último lugar, el consumo de agua no tratada supone un riesgo para contraer la infección por el VHE ($p=0,008$), ya que tiene un valor de OR de 5,24 y un IC de 2,2-12,6, es decir, un individuo que consume agua no tratada tiene 5,24 veces más riesgo de presentar anticuerpos frente a este virus. El consumo de agua no tratada es una práctica habitual en las distintas áreas rurales. En nuestra área de estudio (Comunidad Valenciana) existe un gran número de fuentes o pozos de agua no tratadas lo que facilita su consumo. Además, los agricultores suelen abonar los campos con fertilizantes compuestos por heces de diversos animales (generalmente de cerdo) y regarlos con agua de fosas de

purines de granjas de cerdo. Este hecho puede permitir que esta agua se filtre a través de la tierra, contaminando las aguas subterráneas o acuíferos y consecuentemente el agua de fuentes cercanas a estos campos.

Once (44%) de los 25 individuos positivos a anticuerpos anti-VHE IgG, presentaron ambos factores de riesgo (exposición a ganado porcino y consumo de agua no tratada).

En el presente estudio, de los 25 individuos que resultaron positivos a anti-VHE IgG, solamente 6 habían viajado al extranjero. Los países visitados fueron Francia, Alemania, Holanda y Reino Unido, zonas consideradas como no endémicas, pero en los que se han descrito casos autóctonos de hepatitis E. No obstante, en el presente estudio no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto al resto de variables del estudio analizadas, como son el consumo de marisco crudo y verduras crudas, tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas con la presencia de anticuerpos frente al VHE.

Para evaluar la corrección del modelo estadístico planteado en todas las variables se realizó la prueba de bondad de ajuste de Hosmer y Lemeshow, con un resultado próximo a 1 (0,92), lo que ratifica la validez del estudio.

En países industrializados de Europa y Norteamérica, entre el 2% y el 21% de la población general presenta anticuerpos anti-VHE. En nuestro estudio, hemos observado en individuos sin contacto con ganado porcino (grupo control) una

seropositividad del 4%. En España, los valores de seroprevalencia en población general descritos hasta el momento fueron del 2,8% y del 7,3% (Mateos y col. en 1998; Buti y col.2006).

En conclusión, este es el primer estudio en Europa que determina el consumo de agua no tratada como factor de riesgo para contraer la infección por el VHE. Además, es el primer estudio realizado en España, que analiza la presencia del VHE en personas que trabajan en contacto con el ganado sugiriendo que la infección por este virus podría tratarse como una enfermedad ocupacional en trabajadores del sector porcino y que deberían tomarse las medidas higiénico sanitarias correspondientes en este grupo para disminuir la exposición al VHE.

2. SUMMARY

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped single-stranded positive RNA virus of approximately 7.2 kb. This virus contains a short 5' untranslated region and three open reading frames (ORFs) (Tam et al. 1991). ORF1 encodes non-structural proteins (Koonin et al. 1993), ORF2 encodes the capsid protein (Zafrullah et al. 1999) and ORF3 encodes a cytoskeleton-associated phosphoprotein (Zafrullah et al. 1997).

HEV has been classified in a new family called *Hepeviridae*, as the sole member of the genus *Hepevirus*. HEV has been divided into 4 genotypes (Schlauder et al. 1998) and 24 subtypes, although only 1 serotype of HEV is recognized (Lu y col. 2006).

HEV is known to be primarily transmitted by the fecal-oral route through contaminated waters with fecal waste generating epidemics and outbreaks, mainly in developing countries. Other ways of transmission, such as vertical, direct contact, parenteral and food transmission, have been described.

The disease is self-limited but sometimes involves severe complications and a high case-fatality rate, particularly in pregnant women (approximately 25%). HEV infection is the main cause of epidemic and acute sporadic hepatitis in many areas of Asia, Africa, and Mexico (Khuroo et al. 1980; Bradley et al. 1990). Human HEV outbreaks in endemic regions have been associated with flooding and heavy rains and spread through the fecal-oral route of transmission (Corwin et al. 1999; Emerson et al. 2003). HEV has two ways of presentation: epidemically and sporadically. The first one is usually the outcome of a fecal pollution of the public water supply in developing countries. In India, long lasting

epidemics have been described affecting more than 29.000 people. During these epidemics, the percentage of affected population varied from 1% to 15%. The sporadic way or presentation is usually related to individuals who have travelled from non-endemic to endemic zones. And there is an increasing number of such cases. In this sense, hepatitis E autochthonous cases have been described in industrialized countries such as France, Spain, United Kingdom, Austria, Greece, Argentina, The Netherlands, Germany and Australia. In these non-endemic countries, unexpected high prevalences of anti-HEV antibodies in human beings and several species of animals (swine, rodents, poultry, cats, dogs, sheep, goats and cows) have been detected. Human strains of HEV in industrialized countries appear to be closely related to the swine HEV strain found in the same countries (Banks et al. 2004; Emerson et al 2003; Pina et al. 2000; Piper-Jenks et al. 2000; Schlauder et al. 2001). These data would confirm the hypothesis that the HEV is a zoonotic virus.

In the last years, several studies have founded differences in the prevalences among exposed and non-exposed people to swine, reporting that exposed individuals showed higher prevalences. Nowadays, some risk factors to acquire the virus, such as travel to endemic zones, consumption of shellfish, consumption of raw vegetables, consumption of untreated water and exposure to swine have been proposed. Additionally, there is a recent study considering HEV acquisition by means of the manipulation of polluted organs as a risk factor.

The aim of this work was to detect HEV-RNA through a RT-nested-PCR in a group of individuals exposed and non-exposed to swine of the Valencian

Community. The second aim of this study was to detect, the presence of IgG, IgM and IgA anti-HEV antibodies in these groups. The third objective was to determine and to evaluate the risk factors assessing the presence or absence of anti-HEV antibodies (exposure to swine and years of exposure to swine, travelling to foreign countries and to which country, consumption of shellfish and raw vegetables, and consumption of untreated water).

In the present study, there were 212 individuals, 113 (53.3%) of the individuals were men and 99 (46.7%) were women between 20 and 60 years old. Every individual filled an epidemiological survey with general information (name, age, sex, place of residence, etc.) and data about possible risk situations to contract the HEV such as, exposure and years of exposure to swine, traveling to foreign countries and to which country, consumption of shellfish and raw vegetables, consumption of untreated water. Informed approval was obtained from all participants. Liver function tests, including transaminase levels (ALT and AST) in serum were determined using a commercial kit following the manufacturer's instructions. Two pairs of degenerate oligonucleotide primers were used to amplify a 348-basepair (bp) fragment of open reading frame 2 (ORF-2) of HEV using an RT-nested PCR. The PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarosa and were detected by staining with ethidium bromide. Sera from all individuals were tested for the presence of HEV-antibodies (anti-HEV IgG and IgM) using a commercial ELISA according to manufacturer's instructions. Samples which become positive to the anti-HEV antibodies presence were confirmed by an immunoblot test (Recomblot HEV IgG/IgM, Mikrogen, Germany).

To determine the correlation between the data obtained from the questionnaire and the laboratory results, odds ratios (ORs) and their corresponding 95% confidence intervals (CIs) were calculated using binary logistic regression analysis by means of SPSS[®] version 15.0 statistical software. The values with a p value <0.05 were considered significant. The fit of the final model was realized by the Hosmer-Lemeshow test.

None of the 212 individuals tested positive to the presence of HEV-RNA. All of them presented normal levels of hepatic transaminases. The overall prevalence of anti-HEV IgG confirmed by immunoblotting was 11.8% (25/212). The seroprevalence of anti-HEV IgM was 0.47% (1/212). Anti-HEV IgA was detected in 3 individuals, obtaining a prevalence of 1.4% (3/212). We obtained the following results when considering the variable exposed to swine, 113 (54.2%) people were exposed and 99 (45.8%) were none exposed. Besides, most of 115 exposed had a very long exposition to swine, 20 years (1-30).

In our study, three factors have been revealed as significant: gender, consumption of non-treated water and the exposure to the swine.

The presence of antibodies in men and women turned out to be significant (p=0.01), with an OR value of 7.73 (IC of 2.2-26.7) for men. However, we have not considered it as a risk factor.

Regarding to the exposure to swine as a risk factor, it showed a value of OR 5.19 and IC of 1.7-15.7. In other words one individual is 5.2 times (p=0.004) more at risk of having IgG anti-HEV antibodies. The seroprevalence found in

this study is higher than the one described in United Kingdom (6.3%), Italy (2.6%), France (3.2 %) and Brazil (2.3%). This information suggests that HEV is flowing in Spain, especially in the Valencian Community, and the infection might be underdiagnosed. This fact is not surprising, taking into account the high number of farms (76%) and pigs (23%) witch tested positive for HEV RNA in the same area. In the last ten years, several studies which analyzed the presence of HEV in people exposed and non-exposed to swine have been published. All these studies concluded that people exposed to swine show higher prevalences of anti-HEV IgG antibodies than in non exposed people in these studies had been carried out in countries such Taiwan, Moldavia, United States and The Netherlands. In this context, several studies analyzed the variations in sensitivity of several serological assays in developing countries.

The consumption of untreated water is a habitual practice due to the high number of non-treated water fountains and dams that exist in that geographical area. Moreover, farmers usually fertilize fields with fertilizers comprised by pig manure and water them with water from swine's farm. It would be possible that the contaminated water leaked through the soil polluting subterranean waters and at the same fountains close to these fields. Eleven of the 25 positive people to IgG antibodies had both risk factors: consumption of non-treated water and exposure to swine.

In this study, 25 persons who tested positive for anti-HEV IgG, only six had travelled abroad. The countries visited were France, Germany, The Netherlands and United Kingdom, all of them non endemic countries. Nevertheless, no significant statistical differences were recorded.

The rest of the studied variables, such as consumption of shellfish and raw vegetables, didn't show statistical differences.

The Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test showed a good fit for the final model ($P=0.92$), these data would show that the model is good to predict in the future the infection by HEV.

In conclusion, this is the first epidemiological study in Spain which links travelling to foreign, raw shellfish consumption, raw vegetables consumption, untreated water consumption and the exposition to swine as possible risk factors. Moreover, this is the first study in Europe that determined consumption of untreated water as risk factor and contributes a high prevalence (anti-HEV IgG) in individuals exposed to swine, showing that it can be an occupational disease in people in contact with these animals. Hygienically measures should be put in practice in that group to reduce the rate of infection by HEV.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La hepatitis E es una infección vírica con un patrón epidemiológico de transmisión entérica, al igual que la hepatitis A. A nivel mundial, se estima que más del 50% de hepatitis agudas son debidas a este agente. La infección por el VHE está asociada a países en los que las condiciones higiénico sanitarias son deficientes, siendo las principales zonas endémicas Asia, África y Méjico (Krawczynski y col. 1993). La primera epidemia documentada de hepatitis E ocurrió durante 1955 en Nueva Delhi, donde se identificaron 29.300 casos de hepatitis icterica (Viswanathan y col. 1957). Esta epidemia fue atribuida inicialmente al virus de la hepatitis A (VHA), pero estudios serológicos posteriores revelaron que el agente causal era diferente a este virus, descubriendo una nueva forma de hepatitis no-A no-B de transmisión fecal-oral. A partir de este episodio se han seguido produciendo epidemias y brotes en áreas endémicas.

Existen claras evidencias que la hepatitis E es una infección zoonótica. En países desarrollados, cada vez más a menudo se han descrito casos de hepatitis agudas causadas por el VHE en individuos sin historia de viaje a zonas endémicas (McCrudden y col. 2000; Mansuy y col. 2004a; Mateos y col. 2006). En este sentido, se han documentado casos de hepatitis E autóctonos en países industrializados como Alemania (Preiss y col. 2006; Kaci y col. 2007), Francia (Peron y col. 2006; Deest y col. 2007; Mansuy y col. 2008), España (Sánchez y col. 2002; Clemente-Casares y col. 2003; Buti y col. 2004; Pérez-Gracia y col. 2004; Mateos y col. 2006; Pérez-Gracia y col. 2007), Inglaterra (Banks y col. 2004; Lewis y col. 2006), Italia (Zanetti y col. 1999; Grieco y col. 2001) y Estados Unidos (Meng y col. 1997; Amon y col. 2006) entre otros.

Además, el VHE se ha detectado en heces y suero de diferentes especies animales como roedores, aves de corral, ovejas, cabras, vacas, perros y cerdos. Este último, es la especie animal más importante epidemiológicamente por las altas prevalencias descritas. En este sentido, en estudios realizados en la Comunidad Valenciana se ha detectado una elevada prevalencia del VHE en granjas porcinas, pero no se ha estudiado la presencia del VHE en personas expuestas a estos animales.

Teniendo en cuenta todos estos datos, los objetivos de la presente tesis han sido los siguientes:

1. Detectar el ARN-VHE mediante RT-nested-PCR en personas expuestas al ganado porcino y en personas sin exposición (donantes voluntarios) de la Comunidad Valenciana.
2. Detectar la presencia de anticuerpos anti-VHE de clase IgG, IgM e IgA mediante enzimoimmunoensayo en los grupos citados anteriormente, confirmando la presencia de anticuerpos anti-VHE de clase IgM e IgG mediante inmunoblot.
3. Determinar y valorar los factores de riesgo asociados a la presencia de marcadores del VHE (contacto con ganado porcino, viaje a zonas endémicas, ingesta de verduras crudas y marisco crudo e ingesta de agua no tratada).
4. Contribuir al conocimiento de la epidemiología del VHE, aportando datos que ayuden a esclarecer las posibles vías de transmisión.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 PARTICULA VÍRICA

El VHE es un virus con simetría icosaédrica, no envuelto y aproximadamente de 27 a 34 nm de diámetro (Krawczynski y col. 1989). La partícula vírica tiene un coeficiente de sedimentación de 183S y una densidad de flotación de 1,29 g/ml.

El genoma está constituido por ARN monocatenario de polaridad positiva con un tamaño de aproximadamente 7,2 Kb (Reyes y col. 1990; Aye y col. 1992; Aye y col. 1993) y con tres regiones de lectura abierta (ORFs) (Tam y col. 1991): ORF1, ORF2 y ORF3 (Fig. 1).

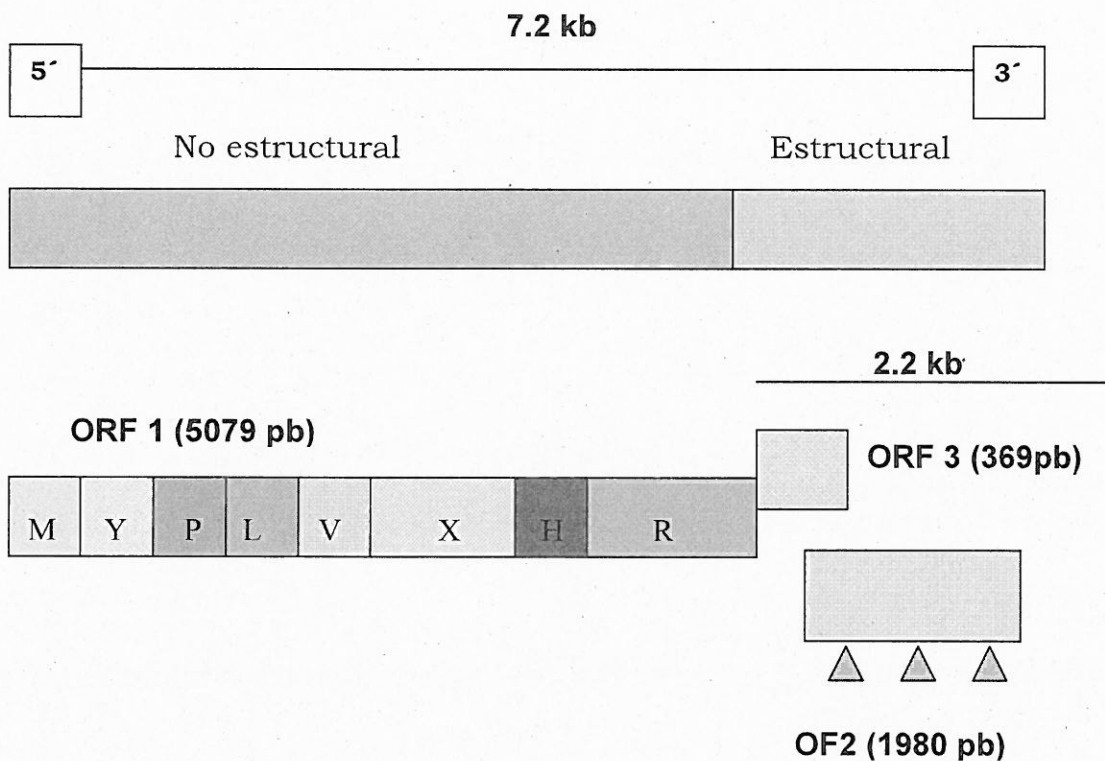
El ORF1 tiene un tamaño de 5 Kb (5079 pb), está localizado en la región 5' y codifica la poliproteína no estructural (nsP) que incluye una metiltransferasa localizada en el extremo amino-terminal de la poliproteína, una papain-like proteasa, una helicasa que interviene en los procesos de replicación y transcripción y una ARN polimerasa localizada en el extremo terminal del ORF1. Además tiene unas regiones denominadas dominios X e Y, que tienen una función desconocida hasta el momento (Koonin y col. 1993; Agrawal y col. 2001; Magden y col. 2001).

El ORF2 que se extiende desde el nucleótido 5147 hasta el 7127, presenta un tamaño de 2 kb (1980 pb), está localizado en el extremo 3' de la molécula de ARN y codifica la proteína mayor de la cápside vírica de 660 aminoácidos. Se han localizado puntos de glicosilación aunque la función de la proteína glicosilada se desconoce (Zafrullah y col. 1999).

Finalmente, el ORF3 es la región más pequeña, tiene un tamaño de 369 pb y está localizado entre los nucleótidos 5106 y 5475, solapándose con los ORF1 y ORF2 (Yarbough y col. 1991). Este fragmento codifica una fosfoproteína inmunogénica de 123 aminoácidos, asociada con el citoesqueleto celular de función desconocida (Zafrullah y col. 1997), pero capaz de formar dímeros y unirse a varios tipos de proteínas que contienen dominios SH₃. Además, posee dos regiones altamente hidrofóbicas en el extremo N-terminal de la molécula, que están relacionadas con el ensamblaje de partículas víricas, al igual que la proteína de la cápside vírica (Zafrullah y col. 1999). En esta región, al igual que en el ORF2, se producen mutaciones silenciosas que pueden afectar a la secuencia de aminoácidos sin generar variaciones en la secuencia del producto proteico (Graff y col. 2005).

El ARN también presenta dos regiones no codificantes, una en el extremo 5' de 26 nucleótidos y otra en el extremo 3' de 68 nucleótidos.

Fig. 1. Organización del genoma vírico del VHE. M: metiltransferasa; Y: dominio Y; P: papain-like proteasa; L: región hipervariable; V: dominio rico en prolina; X: dominio X; H: helicasa; R: ARN polimerasa ARN dependiente, Δ : sitios de glicosilación (Worm y col. 2002).



4.2 CLASIFICACIÓN Y FILOGENIA

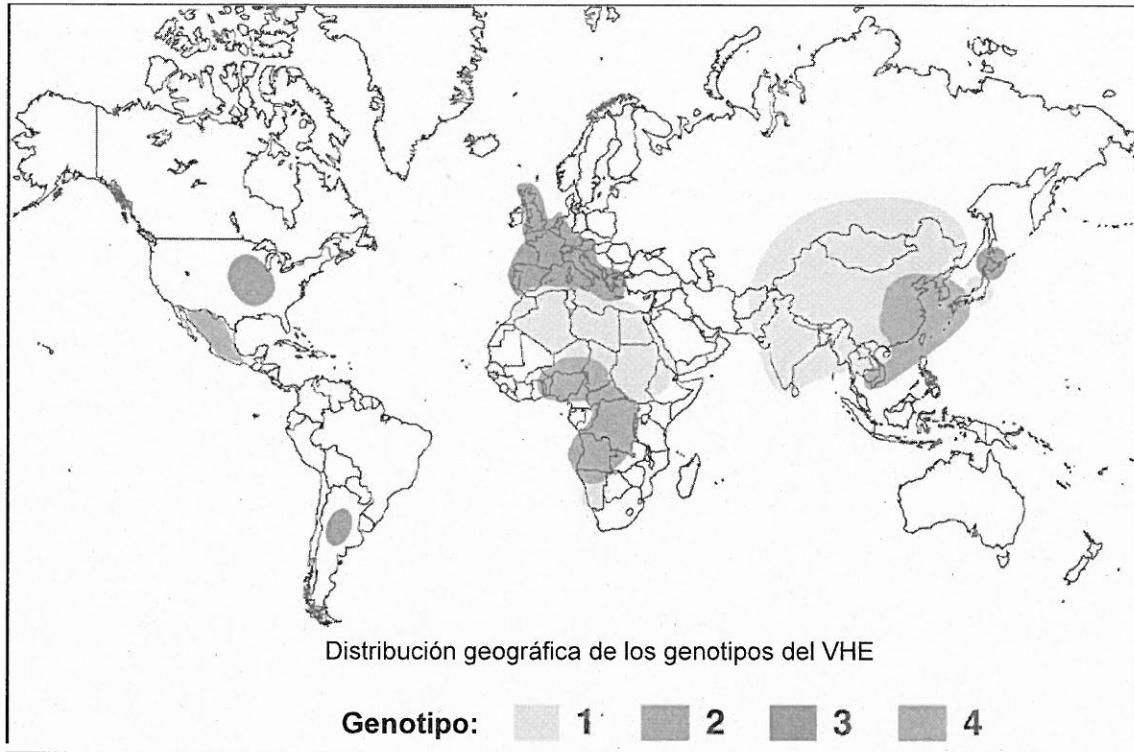
En un principio, el VHE se incluyó dentro de la familia *Picornaviridae*, al igual que el virus de la hepatitis A (VHA) (Balayan y col. 1983). En 1992, se realizó un trabajo que comparaba los genomas de distintos virus ARN de polaridad positiva, observando que el VHE tenía regiones diferentes a estos virus (Koonin y col. 1992). Estudios posteriores lo clasificaron dentro de la familia *Caliciviridae* de acuerdo a sus características morfológicas y a su organización genómica, semejantes al virus de Norwalk y a otros calicivirus (Berke y col. 1997). Posteriormente, los estudios moleculares en las regiones de la ARN

helicasa (Hel) y de la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) de otros virus ARN de polaridad positiva, demostraron un mayor parecido al virus de la rubéola, incluyéndolo temporalmente en la familia *Togaviridae* (Berke y col. 2000; Green y col. 2000). Actualmente y según recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía Vírica, el VHE se ha clasificado en una nueva familia denominada *Hepeviridae*, en el género *Hepevirus* siendo el único integrante de este género (Emerson y col. 2004).

El aislamiento de las cepas procedentes de Asia, África, Europa y América (Schlauder y col. 1999), y la posterior secuenciación parcial y/o total de las secuencias nucleotídicas de regiones estructurales y no estructurales, ha permitido realizar las comparaciones filogenéticas. Las primeras cepas aisladas fueron las de Burma (B1) y Méjico (M1), que solamente comparten entre si un 76% de la secuencia nucleotídica completa, aunque comparando la secuencia de aminoácidos, los porcentajes de homología llegan al 84% en el ORF1, 93% en el ORF2 y 87% en el ORF3 (Schlauder y col.2001).

En base a las comparaciones filogenéticas y al análisis de las secuencias aisladas se han obtenido cepas de referencia (Wang y col. 2002) y se han identificado 4 genotipos y diversos subtipos diferentes (Tabla 1). Los genotipos 1 y 2 han sido identificados en epidemias y brotes de hepatitis E en países tropicales y subtropicales por contaminación de las aguas de abastecimiento público (Emerson y col. 2003). Sin embargo los genotipos 3 y 4 se han identificado en casos esporádicos en Estados Unidos, Europa, China y Japón (Meng 2000; Okamoto y col. 2001; Smith y col. 2001). En la figura 2 se muestra la distribución geográfica de los 4 genotipos del VHE.

Fig. 2. Distribución geográfica de los 4 genotipos del VHE (Purcell y col. 2008).



Comparando distintos fragmentos del genoma de un gran número de aislados del VHE, Lu y col. han realizado la siguiente clasificación de genotipos y subtipos (Lu y col. 2006) (Fig. 3):

I. GENOTIPO 1

El genotipo 1 está representado por el prototipo aislado en Burma y las cepas relacionadas de Asia y África (Tsarev y col. 1999). Se han aislado en varios países como Bangladesh, Camboya, China, India, Kirgizstan, Myanmar, Nepal, Pakistán, Uzbekistán, Vietnam, Chad, Djibouti, Marruecos, Sudán, Túnez, Namibia y Egipto. Se divide en 5 subtipos:

▪ SUBTIPO 1a

Es el subtipo que engloba un mayor número de aislados dentro del genotipo 1 y se compone de secuencias de origen humano incluyendo una cepa aislada en España obtenida de aguas residuales (Pina y col. 1998). Este subtipo es el agente causal de epidemias en diferentes lugares de la India como en Pune, Talegaon (Arankalle y col. 1999b), Kolhapur, Meerut (Aggarwal y col. 1999), Hyderabad (Panda y col. 2000), Ahmedabad, Maharashtra, Karnal (Aggarwal y col. 1999), Yamunanagar (Arankalle y col. 2002), Nepal (Kathmandu) (Gouvea y col. 1998; Shrestha y col. 2003), Myanmar (cepa prototipo Burma) (Aye y col. 1993). También se han aislado cepas procedentes de Pakistán (Cuyck-Gandre y col. 2000), Vietnam y Japón (Takahashi y col. 2002).

▪ SUBTIPO 1b

Las primeras secuencias clasificadas en este subtipo, se identificaron en las epidemias sufridas en Xinjiang (China) en 1987-1988 (Aye y col. 1992). Además se han aislado cepas en Pakistán (Tsarev y col. 1992), Bangladesh y Haití siendo todas de origen humano (Drabick y col. 1997).

▪ SUBTIPO 1c

Este subtipo se compone de secuencias pertenecientes a casos esporádicos de pacientes con hepatitis aguda en India (Aggarwal y col. 1999), China y Nepal (Shrestha y col. 2003). Además, a este subtipo pertenecen los aislados procedentes de la epidemia ocurrida en 1987 en Kyrgyzstan (Usmanov y col. 1991; Chatterjee y col. 1997).

▪ SUBTIPO 1d

Todos los aislados pertenecientes a este subtipo se localizaron en África (Marruecos y Algeria) y son aislados humanos (Cuyck-Gandre y col. 1997).

▪ SUBTIPO 1e

En este subtipo se agrupan cepas humanas de distintas áreas del continente africano, cepas equinas halladas en Egipto (Tsarev y col. 1999; Saad y col, 2007) y una cepa aislada en España a partir de un paciente que había visitado Etiopía (Buti y col. 2004).

II. GENOTIPO 2

Todas las cepas pertenecientes a este genotipo son de origen humano. Está compuesto por la cepa prototipo mejicana (Huang y col. 1992a) y cepas productoras de casos esporádicos de hepatitis procedentes de pacientes de República Centroafricana, Chad, República Democrática del Congo, Egipto, Namibia y Nigeria (Buisson y col. 2000; Maila y col. 2004; Nicand y col. 2005).

III. GENOTIPO 3

Este genotipo está ampliamente distribuido y se ha encontrado en Alemania, Argentina, Australia, Austria, Camboya, Canadá, Corea, España, Estados Unidos, Francia, Grecia, Holanda, Hungría, Italia, Japón, Kirgizstan, Méjico, Nueva Zelanda, Rusia, Reino Unido, Tailandia y Taiwán. Está compuesto por

cepas de origen humano y animal. La mayoría de las cepas de origen humano, se han aislado de países no endémicos (Huang y col. 2002a; Clemente–Casares y col. 2003).

▪ SUBTIPO 3a

Está formado por cepas de origen humano y porcino procedentes de Estados Unidos (Iowa y Missouri) (Huang y col. 2002a), Japón (Mizuo y col. 2002; Yazaki y col. 2003), Corea (Ahn y col. 2005), Camboya (Caron y col. 2006) y Holanda (van der Poel y col. 2001). Además, forman parte de este subtipo aislados procedentes de aguas residuales urbanas de Barcelona y Washington (Clemente–Casares y col. 2003).

▪ SUBTIPO 3b

Está formado por cepas de origen humano y animal, todas ellas procedentes de Japón (Mizuo y col. 2002; Takahashi y col. 2003). Entre las cepas de origen animal se encuentran los aislados obtenidos en hígado de jabalí y en carne de ciervo (Sonoda y col. 2004; Takahashi y col. 2004).

▪ SUBTIPO 3c

Las cepas que componen este subtipo son porcinas y humanas. Las cepas porcinas fueron aisladas en Holanda (van der Poel y col. 2001). Recientemente, se ha aislado una cepa francesa, de un paciente sin historia de viaje a zonas endémicas (Colson y col. 2007a).

▪ SUBTIPO 3d

Es uno de los subtipos que menos aislados engloba, dentro del genotipo 3. Las cepas identificadas en este subtipo son de origen porcino (Wu y col. 2002) y se aislaron en Taiwán.

▪ SUBTIPO 3e

Este subtipo está formado por cepas de origen humano, animal y de aguas residuales. Se han identificado en su mayoría cepas humanas autóctonas y porcinas en países europeos como Reino Unido (Banks y col. 2004), Holanda (van der Poel y col. 2001), Italia (Zanetti y col. 1999), Grecia (Schlauder y col. 1999). En España, una cepa de origen porcino hallada en Cataluña pertenece a este subtipo (Clemente-Casares y col. 2003).

▪ SUBTIPO 3f

A este subtipo pertenecen la mayoría de cepas españolas y holandesas (van der Poel y col. 2001). También a este subtipo pertenecen cepas francesas (Colson y col. 2007a), griegas (Tsarev y col. 1999) e inglesas (Ijaz y col. 2005). El subtipo 3f engloba aislados de hepatitis E humanos en España (Pérez-Gracia y col. 2004; Buti y col. 2004; Pérez-Gracia y col. 2007) y aislados de origen porcino (Fernández-Barredo y col. 2007). Asimismo, pertenecen a este subtipo las cepas identificadas en aguas residuales urbanas (Clemente-Casares y col. 2003) y en aguas residuales de matadero porcino en Barcelona (Pina y col. 2000).

- SUBTIPO 3g

Este subtipo solamente está compuesto por una cepa de origen porcino aislada en Kyrgyzstan (Lu y col. 2004).

- SUBTIPO 3h

A este subtipo pertenecen cepas de origen humano y porcino procedentes de Italia (Schlauder y col. 1999) y Nueva Zelanda (Garkavenko y col. 2001).

- SUBTIPO 3i

En este subtipo se clasifican cepas de origen humano y porcino procedentes de Argentina (Schlauder y col. 2000b) y Austria (Worm y col. 2002).

- SUBTIPO 3j

Está constituido por cepas porcinas procedentes de Canadá, Australia y Méjico (Pei y col. 2002).

IV. GENOTIPO 4

Todos los aislados de origen humano y porcino pertenecientes a este genotipo proceden del continente asiático (China, India, Indonesia, Japón, Taiwán y Vietnam). Se divide en 7 subtipos:

▪ SUBTIPO 4a

Comprende cepas humanas aisladas en China (Wang y col. 2002) y Taiwán (Hsieh y col. 1999; Wu y col. 2002).

▪ SUBTIPO 4b

En este subtipo se ha clasificado una cepa porcina de Bali (Wibawa y col. 2004), así como cepas porcinas y humanas japonesas (Nishizawa y col. 2003).

▪ SUBTIPO 4c

Dentro del genotipo 4, es el subtipo más numeroso. Las cepas humanas y porcinas de este subtipo se han detectado en Japón (Hokkaido, Sendai, Tochigi y Saitama), excepto un aislado porcino de China. Algunos de estos aislados se han obtenido de pacientes, infectados por transmisión alimentaria al consumir hígado de cerdo crudo (Nishizawa y col. 2003; Yazaki y col. 2003).

▪ SUBTIPO 4d

Este subtipo incluye tres subgrupos. El primer subgrupo está compuesto por cepas porcinas. El segundo subgrupo lo forman aislados procedentes del Este de China (Xuar), zona endémica en la que solamente se había detectado el genotipo 1. El tercer subgrupo contiene aislados humanos y porcinos procedentes de China (Beijing) (Schlauder y col. 2001).

▪ SUBTIPO 4e

Las cepas que se incluyen en este subtipo son exclusivamente porcinas y se han aislado en la India (Arankalle y col. 2002; Arankalle y col. 2003).

▪ SUBTIPO 4f

Comprende aislados humanos de Vietnam y Japon (Mizuo y col. 2002; Hijikata y col. 2002).

▪ SUBTIPO 4g

Este subtipo, dentro del genotipo 4, es el menos numeroso. Está formado por cepas de origen humano aisladas en China (Liu y col. 2003).

Tabla 1. Clasificación de los genotipos del virus de la hepatitis E, así como su origen y lugares de aislamiento (a: humano, b: aguas residuales, c: porcino, d: otros animales.)

GENOTIPO	SUBTIPO	ORIGEN	LUGARES DE AISLAMIENTO
1	a	a, b	India, Pakistan, Vietnam, Japón, España
	b	a	China, Bangladesh, Pakistán, Haití
	c	a	China, Japón, India, Kyrgyzstan, Uzbekistán
	d	a	Argelia, Marruecos
	e	a	Namibia, Egipto, Sudán, Chad, Djibouti, España
2	a	a	Méjico
	b	a	Nigeria, Chad, República Centroafricana, Republica Democrática del Congo, Egipto, Namibia y Nigeria
3	a	a,c,b	Estados Unidos, España, Japón, Corea, Holanda
	b	a,c,d	Japón
	c	c	Holanda, Francia
	d	c	Taiwán
	e	a,c	Grecia, Francia, España, Inglaterra, Japón
	f	a,c,b	España, Japón, Grecia, Holanda, Francia, Reino Unido
	g	a	Kyrgyzstan
	h	a,c	Italia, Nueva Zelanda
	i	a,c	Argentina, Austria
	j	a	Canadá, Australia, Méjico
4	a	a	China, Taiwán
	b	a,c	China, Japón, Indonesia, Vietnam, Taiwán
	c	a,c	Japón, China
	d	a,c	China
	e	c	India
	f	a	Japón, Vietnam
	g	a	China

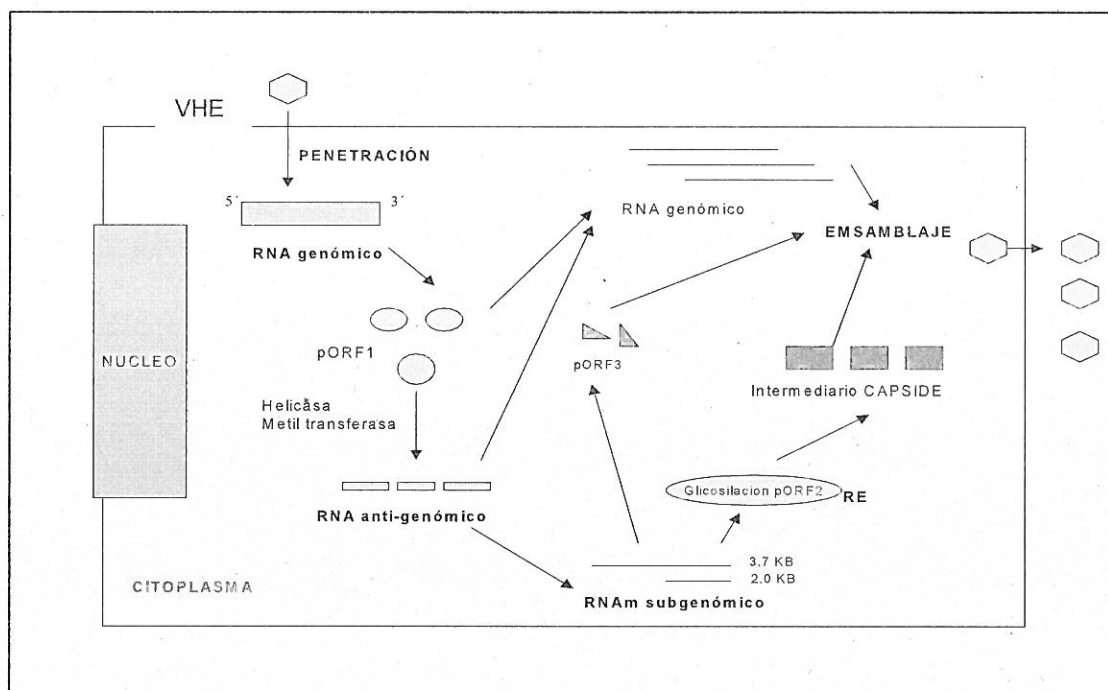
4.3 REPLICACIÓN

El mecanismo de replicación no ha sido bien identificado hasta la fecha, pero se considera que sigue el modelo general de replicación y expresión génica de otros virus ARN de polaridad positiva (Reyes y col. 1993). El principal sitio de replicación son los hepatocitos, aunque la replicación extrahepática ha sido documentada en monos rhesus (Kawai y col. 1999). En estos animales, se detectó ARN-VHE en hígado, suero y bilis (Nanda y col. 1994). Recientemente, un estudio sobre la localización de la replicasa vírica sugiere que la membrana del retículo endoplasmático podría ser un posible sitio de replicación para el VHE (Rehman y col. 2007).

El modelo de replicación es el siguiente (Fig. 4):

1. El virus se adhiere a la célula.
2. El ARN vírico se traduce en el citoplasma de las células infectadas, produciendo la poliproteína no estructural (nsP), codificada por el ORF1.
3. Esta poliproteína contiene la replicasa vírica, que está implicada en la síntesis de intermediarios replicativos de polaridad negativa a partir de la cadena genómica positiva.
4. Estos intermediarios actúan como molde para la síntesis de las cadenas genómicas y subgenómicas de polaridad positiva.
5. Las cadenas subgenómicas serán traducidas en proteínas estructurales en las fases tardías de la replicación vírica.
6. Las proteínas estructurales que forman parte de la cápside vírica engloban una copia del genoma vírico para formar una partícula vírica.

Fig. 4. Esquema de la replicación y expresión del genoma del VHE (Mast y col. 1996).



4.4 EPIDEMIOLOGÍA

El virus de la hepatitis E es el agente causal más importante de las hepatitis víricas agudas en países tropicales y subtropicales (Smith 2001). La forma de presentación varía desde brotes a epidemias que pueden afectar de cientos a miles de personas y que se pueden prolongar a periodos de hasta más de un año (Naik y col. 1992; Li y col. 1997).

4.4.1 VÍAS DE TRANSMISIÓN

-Transmisión fecal-oral: esta vía es la principal (Viswanathan y col. 1957). El agua contaminada con residuos fecales da origen a epidemias y brotes, fundamentalmente en países subdesarrollados (Arankalle y col. 1994). En estos países, en los que la infección es endémica, los brotes se reproducen con mayor frecuencia durante las estaciones lluviosas, cuando las inundaciones conducen a la contaminación de las aguas de abastecimiento público. En este sentido, se documentó una epidemia en Somalia que afectó a 142 pueblos que estaban situados cerca del río, infectando a 245.312 individuos. De estos individuos 11.413 presentaron hepatitis icterica y murieron 146 personas. De las personas fallecidas, un 13,8% fueron mujeres embarazadas (Mushahwar y col. 1993; Bile y col. 1994).

Se han descrito brotes de hepatitis E en países como Vietnam e Indonesia, donde existen comunidades situadas al lado de ríos o tienen infraestructuras sanitarias inadecuadas (Corwin y col. 1996). En estas comunidades se observó que la seroprevalencia de anticuerpos anti-VHE IgG era mayor en aquellos núcleos de población que no hervían el agua antes de utilizarla como bebida o para cocinar, que tenían una higiene personal deficiente y que eliminaban excrementos humanos al río (Corwin y col. 1999).

- Transmisión a través del consumo de alimentos: se han descrito casos de transmisión del VHE a partir de la ingestión de alimentos crudos, tales como hígado de cerdo (Yazaki y col. 2003; Melenhorst y col. 2007; Deest y col. 2007),

hígado de jabalí (Matsuda y col. 2003) y carne de ciervo (Tei y col. 2003; Li y col. 2005). En este último caso se secuenciaron las cepas procedentes del ciervo y del paciente que sufrió una hepatitis aguda resultando ser idénticas. Recientemente, en Hungría se ha descrito un caso de transmisión de VHE a partir de la ingestión de embutido fresco de cerdo. Este aislado, tenía una similitud nucleotídica del 95% con las cepas europeas humanas y porcinas (Reuter y col. 2006). En Japón, en este mismo año, un estudio reveló otro caso de transmisión del VHE mediante ingestión de carne cruda de cerdo, pollo y ternera afectando a un total de 27 personas (Ishida y col. 2006). En 2007, en Francia se detectaron dos casos de hepatitis E aguda en dos individuos que habían comido hígado de cerdo poco cocinado (Deest y col. 2007). Todos estos estudios demuestran que esta vía de transmisión parece ser cada vez más importante.

- Transmisión vertical: diversos estudios demuestran la infección *in útero* por el VHE en la especie humana (Menendez y col. 1999; Kumar y col. 2001; Singh y col. 2003), siendo común los abortos, muertes intrauterinas y muertes neonatales en mujeres embarazadas con hepatitis E (Khuroo y col. 1995a). Diferentes estudios describen tasas de transmisión madre-hijo que varían entre el 23,3 y el 50% (Kumar y col. 2001; Kumar y col. 2004). Además aportan una tasa de mortalidad materna del 27% producida por fallo hepático y hepatitis fulminante durante el último trimestre de gestación (Dahiya y col. 2005; Banait y col. 2007). Los neonatos, infectados durante el embarazo, presentan hipoglucemia y elevación de los niveles de transaminasas (Khuroo y col. 1995b). Hasta el momento, no ha sido posible reproducir la transmisión vertical en animales (Kasorndorkbua y col. 2003; Guo y col. 2007).

- Transmisión parenteral: varios estudios epidemiológicos han sugerido que el VHE puede ser transmitido por transfusión sanguínea (Arankalle y col. 1999; Arankalle y col. 2000b). Se ha demostrado la posibilidad de inducir una hepatitis aguda por el VHE en monos Rhesus a través de una transfusión de 10 ml de sangre de un donante humano (Xia y col. 2004). En este estudio, se seleccionó como donante a un paciente virémico y con unos niveles elevados de alanina aminotransferasa. Algunos estudios incluyen como posible riesgo de contraer la infección los tratamientos de hemodiálisis (Psichogiou y col. 1996; Mateos y col. 1997; Fukuda y col. 2004; Mitsui y col. 2004; Taremi y col. 2005; Kheradpezhohu y col. 2007). En un estudio, realizado en Taiwán, se refleja una mayor seroprevalencia frente al VHE en pacientes hemodializados en comparación con personas sanas (Lee y col. 2005). En esta publicación, se realizó el análisis sobre una población de 400 pacientes hemodializados, 400 individuos sanos y 400 pacientes hospitalizados por otras causas, siendo las seroprevalencias de 31%, 8,9% y 16% respectivamente. En España, existe un estudio realizado en 2002, en el que detectan anticuerpos anti-VHE en el 2,8% de donantes de sangre y en el 6,3% de pacientes hemodializados (Sánchez y col. 2002). Existen estudios sobre la prevalencia de anti-VHE IgG en donantes de sangre en países tales como Nueva Zelanda (4%) (Dalton y col. 2007), Francia (3,2%) (Boutrouille y col. 2007), Brasil (2,3%) (Bortoliero y col. 2006), Holanda (2%) (Bouwknegt y col. 2007a), Japón (3,9%) (Fukuda y col. 2004), Irán (7,8%) (Taremi y col. 2007), Albania (12,1%) (Kondili y col. 2006), Arabia Saudi (16,9%) (Abdelaal y col. 1998), China (20%) (Wibawa y col. 2004) y Egipto (45,2%) (Abdel Hady y col. 1998). Recientemente, en Francia se ha detectado un caso de hepatitis E aguda en un niño de 7 años, que recibía

transfusiones de sangre desde Junio de 2006. Se analizó el suero del donante y resultó positivo a anticuerpos anti-VHE IgG (Colson y col. 2007b).

-Transmisión por contacto directo: la transmisión persona-persona es poco común en esta infección (Arankalle y col. 2000). Se ha observado que cuando se han producido epidemias, la prevalencia de casos de hepatitis E en miembros de una misma familia varía del 0,7% al 2,2%, a diferencia del patron que presentan las infecciones intrafamiliares por el VHA donde las prevalencias oscilan entre el 50 y el 75% (Kumar y col. 2001). En un estudio que analizó a 86 familiares de personas afectadas de hepatitis E, se detectaron tan sólo 2 casos de transmisión intrafamiliar (Somani y col. 2003). Recientemente, en Francia, se ha publicado un estudio de hepatitis E intrafamiliar. Este trabajo reveló la presencia de anticuerpos anti-VHE y ARN-VHE en una familia. Además, todos presentaron síntomas de hepatitis como ictericia, astenia y fiebre intermitente (Ducancelle y col. 2007). La razón de la baja frecuencia de transmisión intrafamiliar no está clara, pero podría indicar la necesidad de una mayor dosis infecciosa.

4.4.2 FORMAS DE PRESENTACIÓN

Desde el punto de vista epidemiológico, se distinguen dos formas de presentación, la epidémica y la esporádica, que pueden ocurrir simultáneamente en un área determinada.

Epidémica

Este patrón epidemiológico suele ser el resultado de una contaminación fecal de las aguas de abastecimiento público. Esta grave situación, bajo el punto de vista de la Salud Pública, es frecuente en muchos países en vías de desarrollo. En la mayoría de los casos, resulta determinante para la difusión del virus, circunstancias tales como las inundaciones o las lluvias torrenciales.

En 1994, Arankalle y col. realizaron un estudio retrospectivo en el que revisaron los sueros conservados de las personas afectadas por la extensa epidemia sufrida en Nueva Delhi (India) en 1955. Esta grave epidemia que causó una mortalidad superior a las 29.000 personas fue seguida de otras como las de Ahmedabad (1976, 1982, 1984, 1986, 1987), Surat (1985), Beed (1990), Karad (1993) y Kolhapur (1991) (Fig. 5). En un primer momento se creyó que estas epidemias fueron causadas por el virus de la hepatitis A, debido a las similitudes en la epidemiología y en las manifestaciones clínicas. En 2006, Acharya y col. realizaron un estudio completo recogiendo todos los datos de las epidemias causadas por el VHE en la India (Acharya y col. 2006) (Tabla 2).

Fig. 5. Distribución geográfica y año en el que se produjeron las epidemias por el virus de la Hepatitis E (Worm y col. 2002).

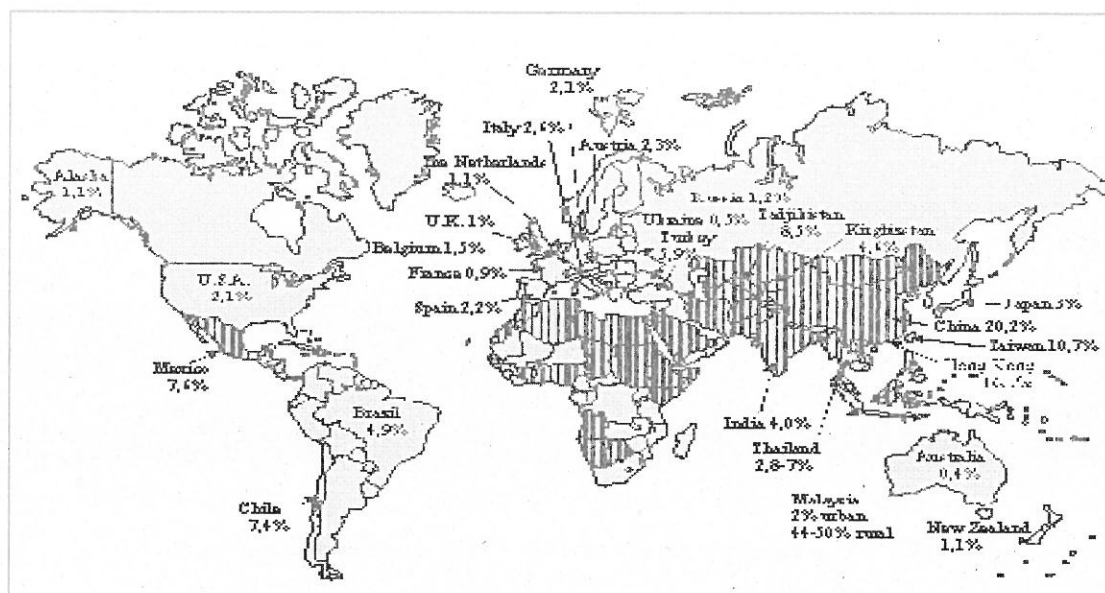


Tabla 2. Epidemias causadas por contaminación fecal del agua de abastecimiento público descritas en la India (periodo 1955-1993) (Arankalle y col. 1994; Acharya y col. 2006).

LUGAR	AÑO	Nº PERSONAS AFECTADAS
Delhi	1955-56	29.300
Kharagpur	1960	65
Aurangabad	1961	865
Ahmedabad	1975-76	2.572
Kashmir	1978-82	52.000
Azamgarh	1979-80	152
Kolhapur	1981	1.169
Ahmedabad	1982	1.072
Ahmedabad	1984	118
Baroda	1984	3.005
Surat	1985	1.395
Ahmedabad	1986	1.015
Ahmedabad	1987	2.215
Karnal	1987	1.273
Andaman Islands	1987	307
Khadakwasla	1989	276
Kanpur	1990-1991	79.091
Akluj	1990	139
Beed	1990	>3.000
Rewa	1990	517
Bijapur	1990	132
Karnal	1991	79.000
Kolhapur	1991	1.442
Karad	1993	2.427

- Epidemia con brotes de repetición
- Epidemia con mayor número de personas afectadas en un sólo brote

En los últimos años, se han descrito grandes epidemias de hepatitis en diversas partes del mundo (Wkly Epidemiol Rec. 2004) (Tabla 3), destacando la última epidemia producida en Darfur, la cual afectó a más de 11.000 personas siendo un 24,1% de los afectados, mujeres embarazadas (Boccia y col. 2006).

Tabla 3. Principales brotes epidémicos de hepatitis E.

LUGAR	AÑO	Nº PERSONAS AFECTADAS
Kirgizia (Rusia)	1955-56	10.800
Valle de Katmandu (Nepal)	1973-74	10.000
Mandalay (Birmania)	1976-77	20.000
Argelia	1980-81	780
Tortiya (Costa de Marfil)	1983-84	800
Etiopia	1985-86	2.000
Xinjiang (China)	1986-88	120.000
Somalia	1988	11.400
Xinjiang (China)	1992-97	300.000
Islamabad (Pakistan)	1993-94	3.827
Darfur (Sudan)	2004	11.277
Chad	2004	1.442
Bagdad (Irak)	2004	60



Epidemia con brotes de repetición



Epidemia con mayor número de personas afectadas en un sólo brote

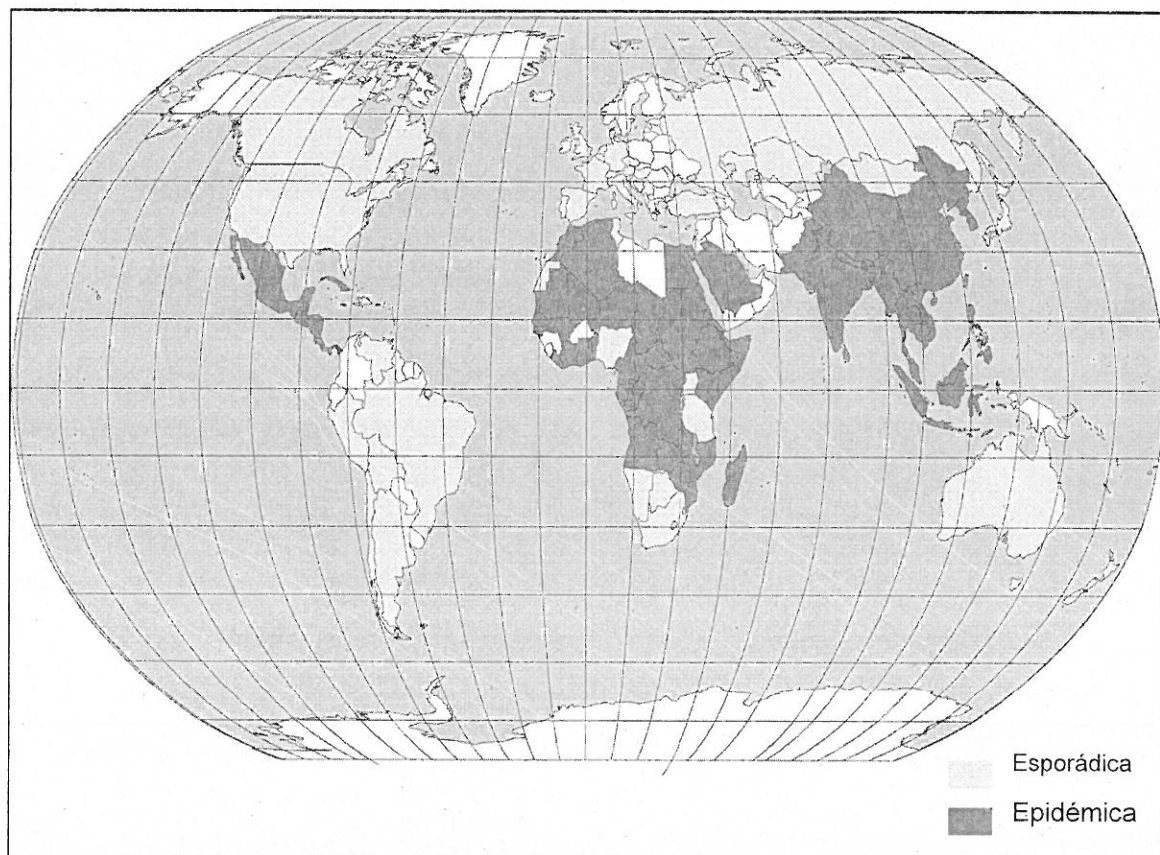
Esporádica

Los casos esporádicos, habitualmente se describen en países donde la hepatitis E no es epidémica, siendo los responsables del 1% de las hepatitis víricas agudas. En zonas endémicas, como la India, el VHE es el responsable del 50 al 70% de todos los casos de transmisión vírica esporádica (Panda y col. 1998). La forma de presentación esporádica suele estar relacionada con individuos que han viajado a zonas endémicas (Chapman y col. 1993; Skaug y col. 1994; Pham y col. 1994) o con la inmigración desde estos países (Tarragó y col. 2000), aunque cada vez es más frecuente que se den casos en los que no se han descrito un historial de viaje a estos países (Fig. 6). En España se han descrito varios casos esporádicos de hepatitis E (Sánchez y col. 2002). En 2004, un estudio realizado en Barcelona (Cataluña), reveló 10 casos esporádicos de hepatitis E sin historia de viaje a zonas endémicas, detectándose también cepas del VHE en aguas residuales de la misma zona geográfica. Todos los pacientes presentaban síntomas de hepatitis aguda. En este trabajo se consiguió aislar tres cepas, dos pertenecientes al genotipo 3 y una al genotipo 1 (Buti y col. 2004). Dos años más tarde, en Madrid se describieron 18 casos de hepatitis autóctonas, 12 fueron hepatitis esporádicas y 6 hepatitis importadas de países endémicos. Todos los pacientes vivían en el área norte de Madrid y tenían una edad media de 51 años (Mateos y col. 2006).

Además de España, también se han descrito casos autóctonos de hepatitis E en países desarrollados como Francia (Mansuy y col. 2004; Peron y col. 2006; Deest y col. 2007), Reino Unido (Banks y col. 2004), Austria (Hofmann y col. 1995), Nueva Zelanda (Zaaijer y col. 1993), Grecia (Schlauder y col. 1999),

Italia (Zanetti y col. 1999), Argentina (Schlauder y col. 2000a), Corea (Ahn y col. 2005), Holanda (Widdowson y col. 2003), Alemania (Preiss y col. 2006) y Australia (Cowie y col. 2005).

Fig. 6. Distribución geográfica del VHE (Word y col. 2002)



4.4.3 ASPECTOS ZONÓMICOS

Hay diversas hipótesis que sugieren que la hepatitis E es una zoonosis, cuyo reservorio principal es el cerdo (Meng y col. 1997; Banks y col. 2004; Emerson y col. 2007). En este sentido, se han detectado anticuerpos anti-VHE en cerdos procedentes de países en vías de desarrollo como Nepal (Clayson y col. 1995), Tailandia (Cooper y col. 2005) y países industrializados como EEUU (Meng y col. 1997), Corea, Taiwán (Wu y col. 2000), España (Fernández-Barredo y col. 2006), Italia (Tolari y col. 2006), Australia (Chandler y col. 1999) y Japón (Takahashi y col. 2003; Takahashi y col. 2005). Además, diversos estudios realizados en estos países detectaron una elevada homología genética entre aislados del VHE de origen porcino y humano. Así, en Estados Unidos, (Meng y col. 1997) detectaron una homología nucleotídica del 90-92% entre cepas de origen humano y porcino. En estudios posteriores también se demostró una elevada homología genética del VHE en países como Japón (Takahashi y col. 2003), Reino Unido (Ijaz y col. 2005), Taiwán (Hsieh y col. 1999) y Corea (Ahn y col. 2005) . En España, Pina y col. realizaron la identificación genética de aislados del VHE en sueros de pacientes y aguas residuales procedentes de mataderos, encontrando un elevado grado de homología en la secuencia nucleotídica entre ambas cepas, y detectando anticuerpos anti-VHE en el 25% de los sueros porcinos (Pina y col. 2000). Recientemente, se ha descrito un caso en Francia, de un hombre de 41 años que presentó síntomas de hepatitis E aguda. Se analizó el suero de este individuo, detectándose ARN-VHE y anticuerpos anti-VHE IgM. Los datos de la encuesta epidemiológica revelaron que este individuo no había viajado en el último año y no consumía alcohol ni

alimentos crudos, pero tenía como mascota un cerdo vietnamita. Se analizó la sangre del animal y se detectó ARN-VHE. Tras el análisis filogenético, se observó que las cepas aisladas del individuo y del cerdo compartían una identidad nucleotídica del 92% con las cepas humanas y porcinas europeas y pertenecían al genotipo 3, subtipo 3f (Renou y col. 2007).

Otro dato de relevancia es la demostración experimental de que el VHE puede atravesar la barrera interespecie. El curso de la infección en animales de experimentación es muy similar al de los humanos (Krawczynski y col. 1989; Tsarev y col. 1993). Balayan y col. demostraron la posibilidad de inducir una hepatitis aguda por el VHE en monos rhesus a través de una transfusión de 10 ml de sangre infectada de un donante humano (Balayan y col. 1983). Años más tarde, Meng y col. en 1998 demostraron la infección de primates con un aislado del VHE porcino, detectando el virus en heces y sangre. En este estudio se observó que la dosis infectante era 10.000 veces menor cuando se administraba por vía parenteral que por vía oral. Además, ha sido posible la infección de cerdos, corderos y ratas con una cepa de VHE aislada en humano (Usmanov y col. 1994; Maneerat y col. 1996). En estos estudios, se administró por vía parenteral a los animales una suspensión del virus procedente de las heces de un paciente con hepatitis E aguda a los animales. El virus fue detectado en sangre a partir del tercer día post-infección en sangre y en heces al séptimo día post-infección.

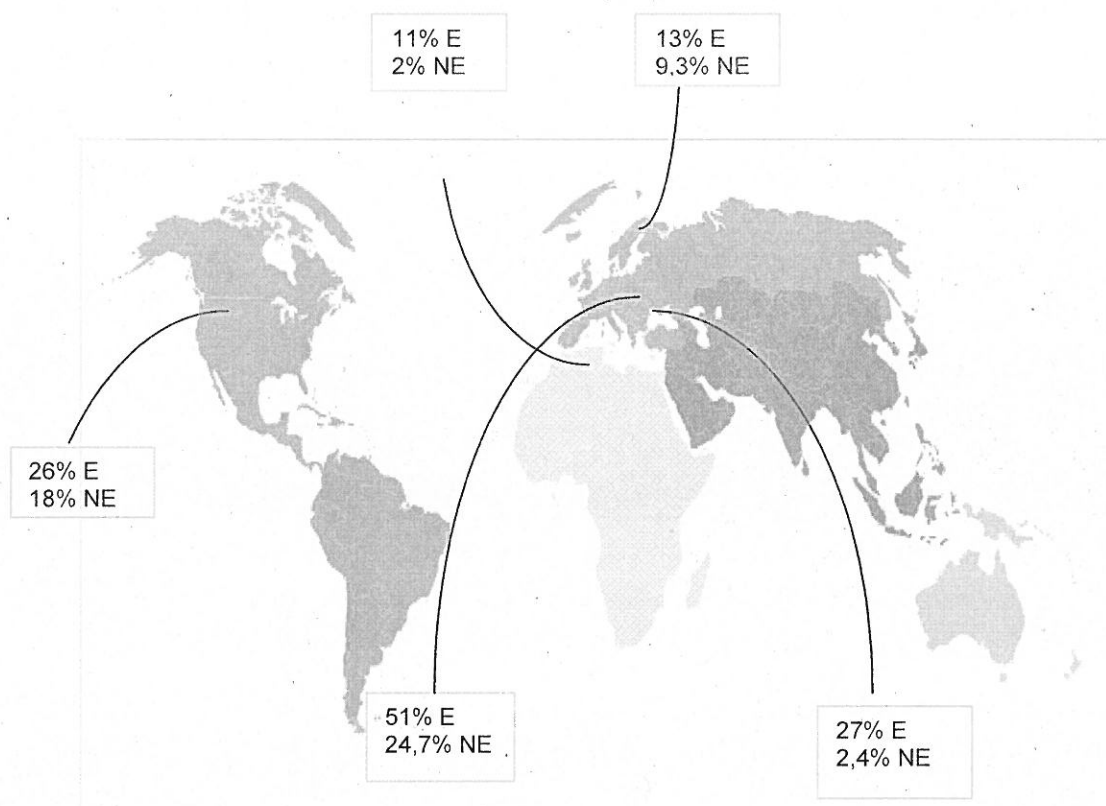
Además del cerdo, se han detectado anticuerpos anti-VHE en otras especies animales como roedores (Kabrane-Lazizi y col. 1999; Favorov y col. 2000;

Hirano y col. 2003), aves de corral (Sun y col. 2004), perros (Arankalle y col. 2001b), gatos (Okamoto y col. 2004; Mochizuki y col. 2006) ciervos (Sonoda y col. 2004), ovejas, cabras y vacas (Arankalle y col. 2001a; Vitral y col. 2005). También, se ha detectado el genoma del VHE en diversas especies animales como aves de corral (pollos, gallinas, etc) (Haqshenas y col. 2001), cerdos (Meng y col. 1997; de Deus y col. 2007), ciervos y jabalíes (Sonoda y col. 2004; Nishizawa y col. 2005).

Todos estos datos parecen indicar que la circulación del VHE es posible en diferentes especies animales, principalmente en el cerdo.

Algunos estudios realizados en Estados Unidos demuestran una elevada prevalencia de anticuerpos anti-VHE en personas que tenían contacto con cerdos (Drobeniuc y col. 2001; Meng y col. 2002; Withers y col. 2002). Posteriores estudios europeos revelaron también un aumento de anticuerpos anti-VHE en personas con exposición al ganado porcino cuando se comparaban con personas sin exposición (Olsen y col. 2006; Bouwknegt y col. 2007b). (Fig. 7)

Fig. 7. Prevalencia de anticuerpos anti-VHE en personas con exposición al ganado porcino (E) y sin exposición (NE).



También, se han detectado anticuerpos anti-VHE en personas que trabajan en mataderos y carnicerías (Jary y col. 2005). Recientemente, en España se ha documentado un caso autóctono de hepatitis E en un hombre de 62 años que trabajaba en un matadero (Pérez-Gracia y col. 2007). Este individuo mostraba una hepatitis aguda. Además, consumía habitualmente alcohol, no había viajado a zonas endémicas en el último año y no consumía carne cruda. En este estudio se consiguió aislar una cepa y gracias al análisis filogenético de un fragmento de 260 pb perteneciente a la región ORF2, se observó que este aislado tenía un elevado porcentaje de homología (87,3%-97,3%) con cepas porcinas españolas, seguido de otras cepas españolas de origen humano (91,5%-96,9%). Comparándolo con cepas europeas porcinas, tuvo una

homología del 87,3-97,3% con cepas holandesas. El aislado identificado en este trabajo mostró un 100% de homología en la secuencia nucleotídica comparado con otras cepas porcinas y humanas del genotipo 3, subtipo 3f.

Todos los trabajos publicados hasta la fecha, revelan que las cepas con capacidad zoonótica pertenecen al genotipo 3 y 4 (Meng y col. 1997; Pina y col. 2000; Yazaki y col. 2003; Clemente-Casares y col. 2003; Yamamoto y col. 2004; Pérez-Gracia y col. 2007).

4.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El período de incubación de la infección por el VHE es de 2 a 10 semanas (Balayan y col. 1983; Chauhan y col. 1993). Después de este período se produce un incremento de las enzimas hepáticas: alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina, así como de la bilirrubina (BR), bilirrubina serica y γ -glutamyl-transferasa (GGT).

Las manifestaciones clínicas de la hepatitis E no se diferencian del resto de hepatitis agudas. La ictericia es el síntoma más común y suele ir precedida de dolor abdominal, fiebre, resfriado, anorexia, artralgia, vómitos, dolor de cabeza o mialgia (Viswanathan y col. 1957). Esta enfermedad es normalmente autolimitada, teniendo una duración de 1 a 4 semanas y finalizando con la completa recuperación del enfermo. Hasta el momento, no se habían descrito casos en los que esta hepatitis aguda evolucionara hacia formas crónicas (Dalton y col. 2007). Recientemente en Francia, se han publicado diversos

trabajos que estudian la cronicidad de este virus en pacientes transplantados de hígado, páncreas y riñón (Kamar y col. 2008; Gerolami y col. 2008). En estos estudios se observó que el ARN-VHE y anticuerpos anti-VHE IgM en el suero de un paciente permaneció elevado durante 1 año.

En mujeres embarazadas, la enfermedad es más severa, produciendo un 20-25% de mortalidad durante el 2º y 3º trimestre de gestación (Khuroo y col. 2003).

La hepatitis E puede presentarse con los siguientes cuadros clínicos:

- Hepatitis anictérica: cursa con ausencia de ictericia y presencia de síntomas inespecíficos como fiebre.
- Hepatitis icterica: es el cuadro clínico más común, caracterizado por la presencia de ictericia precedida de vómitos, náuseas, diarrea y anorexia.
- Hepatitis fulminante: es una seria complicación de la hepatitis icterica aguda que se caracteriza por una necrosis masiva hepatocelular. Este cuadro clínico de hepatitis fulminante suele producirse en zonas endémicas (Margulies y col. 1987; Sheikh y col. 2002; Yajima y col. 2003). El índice de mortalidad por hepatitis fulminante oscila entre el 0,07% y el 6% de los enfermos (Sheikh y col. 2002) y puede alcanzar hasta un 25% en mujeres embarazadas durante el tercer trimestre de gestación (Aggarwal y col.

2000a). Se desconoce el mecanismo exacto por el cual se produce la hepatitis fulminante en un porcentaje tan elevado, pero se sugiere que podría deberse a un descenso de la inmunidad durante este trimestre, aunque esta hipótesis no está demostrada (Aggarwal 2007).

4.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la infección por el VHE puede realizarse mediante inmunomicroscopía electrónica y técnicas moleculares que detectan el virus en heces y/o suero. Asimismo, también se puede realizar el diagnóstico empleando pruebas serológicas para la identificación de anticuerpos anti-VHE de la clase IgG, IgM e IgA.

En 1983, Mikhail Balayan, consiguió identificar el virus en heces mediante inmunomicroscopía electrónica. Esta técnica es poco sensible y difícil de aplicar a muestras clínicas que no suelen contener suficiente cantidad de partículas víricas para ser visualizadas, por estos motivos no se utiliza habitualmente en el diagnóstico (Humphrey y col. 1990; Krawczynski y col. 2000) (Fig. 8).

Fig. 8 Micrografía electrónica de partículas del virus de hepatitis E.
(<http://www.hepatitis.cl/hev.htm>).



El ARN-VHE se puede detectar mediante RT-PCR y PCR a tiempo real en heces, desde la primera semana de inicio de la enfermedad hasta dos semanas más tarde. En el suero es posible detectar el virus en las 2 primeras semanas post-infección (Chauhan y col. 1993; Nanda y col. 1995; Clayson y col. 1995). Recientes estudios indican que la técnica de PCR a tiempo real es más sensible que la RT-PCR para la detección del VHE en suero. En este sentido, Ahn y col, concluyeron en su estudio que la PCR a tiempo real era capaz de detectar el virus en pacientes con hepatitis aguda que eran negativos mediante la RT-PCR convencional, detectando así falsos negativos (Ahn y col. 2006). Estas PCRs a tiempo real utilizan una sonda Taqman y diversos primers según el genotipo de la cepa (Enouf y col. 2006; Inoue y col. 2006; Jothikumar y col. 2006; Peron y col. 2006; Zhao y col. 2007; Gyarmati y col. 2007).

En 1990, Reyes y col., consiguieron clonar y caracterizar genéticamente el VHE a partir de bilis de un primate infectado experimentalmente con heces de un individuo infectado en un brote epidémico en Birmania. Posteriormente, se

secuenció un segundo aislado procedente de un brote epidémico en Méjico (Huang y col. 1992). Los dos aislados compartían un 76% de identidad de nucleótidos cuando se comparaba el genoma completo. Los citados estudios han permitido el desarrollo de pruebas ELISA y Western-blot para detectar anticuerpos anti-VHE, (Saeed y col. 1992; Tsarev y col. 1993; Anderson y col. 1999; Zhou y col. 2004). Los antígenos que se utilizan son proteínas recombinantes o péptidos sintéticos que se corresponden con epítomos inmunodominantes de proteínas estructurales del VHE (de las regiones ORF2 y ORF3) pertenecientes a las cepas Burma y Méjico (cepas del genotipo 1 y 2).

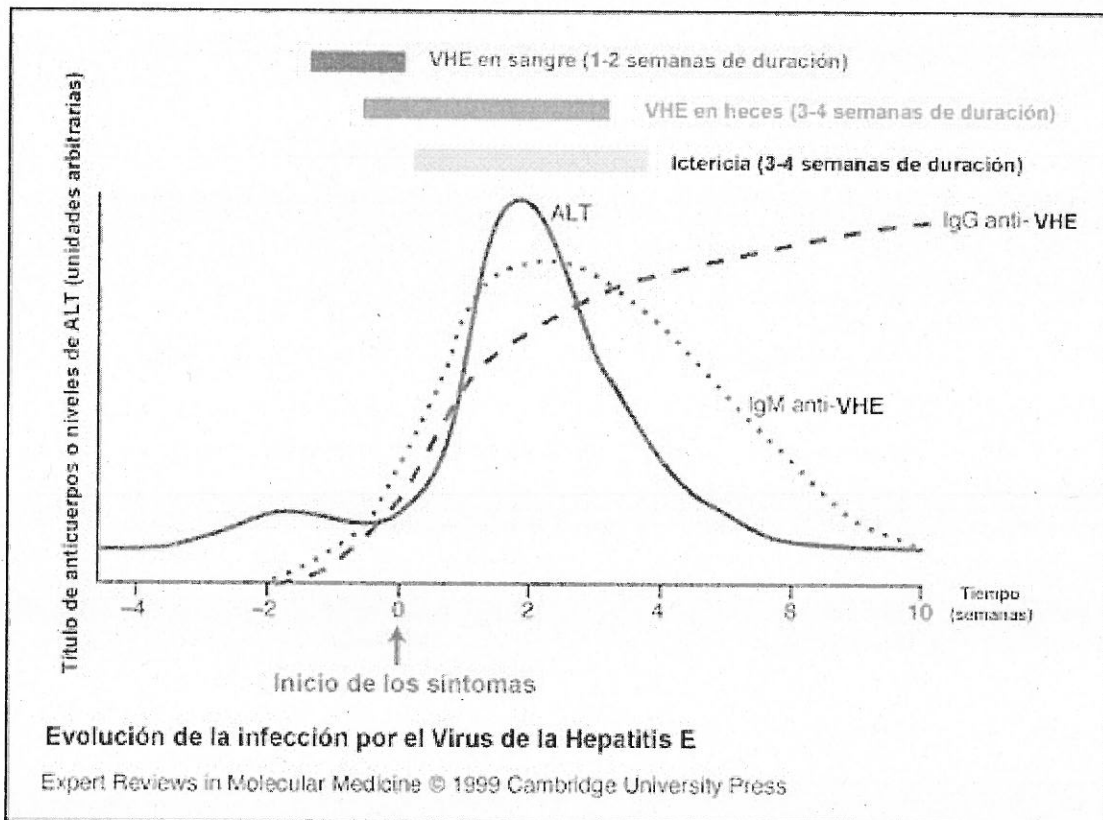
La aparición del antígeno en el hígado se produce al mismo tiempo que la viremia y la excreción en heces. La respuesta inmune aparece en la fase final del periodo de incubación y se caracteriza por la aparición de forma rápida de anticuerpos anti-VHE IgM e IgG (Fig. 9).

Las IgM aparecen tempranamente, antes de la sintomatología clínica pero desaparecen en 6-12 semanas (Pérez-Gracia y col. 2004). La detección de estos anticuerpos tiene una utilidad limitada debido a que solamente son detectables en la fase aguda de la enfermedad (Seriwatana y col. 2002) y sus niveles disminuyen rápidamente al finalizar la viremia. Este hecho explicaría la ausencia de anticuerpos IgM en muestras que presentan el virus en suero. No obstante, en 2005, se desarrolló un método rápido de detección de anticuerpos anti-VHE IgM en suero, útil en epidemias, debido a que puede ser realizado por personal no sanitario y solamente requiere 15 minutos para su desarrollo. Este método está basado en una técnica de inmunocromatografía usando un

anticuerpo monoclonal de una cepa china de genotipo 1, adherido a una membrana (Chen y col. 2005).

La respuesta IgG aparece después de las IgM y su título va incrementando desde la fase aguda hasta la fase de convalecencia, pudiendo permanecer elevadas hasta 8 años después de la fase aguda de la enfermedad (Dawson y col. 1992; Aggarwal y col. 2000b).

Fig. 9 Marcadores diagnósticos del VHE tras una infección. (Panda y col. 2007).



Asimismo, hay estudios que analizaron la especificidad de las pruebas serológicas para la identificación de anticuerpos anti-VHE IgG e IgM. Estos estudios obtuvieron valores de especificidad próximos al 86% para anti-VHE IgG y del 53,3% para anti-VHE IgM (Mast y col. 1998; Lin y col. 2000). Esta variación en la especificidad, podría ser debida a la utilización de proteínas recombinantes del genotipo 1 y 2 para determinar cepas del genotipo 3 y 4.

La primera descripción de un ELISA para la detección de anticuerpos de clase IgA fue en 1993 (Chau y col. 1993). En este primer estudio se analizaron 145 sueros procedentes de un brote de hepatitis E en Somalia y obtuvieron una prevalencia de anti-VHE IgA del 52,4%. Estudios recientes sugieren que la determinación de los anticuerpos de clase IgA son un buen parámetro para determinar la fase aguda de la enfermedad, ya que su duración en suero es más prolongada que los anticuerpos de clase IgM (Nagasaki y col. 2005; Takahashi y col. 2005; Mitsui y col. 200; Tian y col. 2006; Elkady y col. 2007). Un estudio realizado en Holanda, probó que la sensibilidad de las pruebas serológicas utilizadas actualmente para detectar anticuerpos anti-VHE IgA era del 100% en cepas del genotipo 1 y de un 57%-67% en cepas del genotipo 3 (Herremans y col. 2007c).

Debido a la falta de especificidad de estas pruebas serológicas, es necesaria la confirmación del diagnóstico de hepatitis E mediante pruebas de inmunoblot.

En España, se realizó un estudio con 14 muestras de pacientes procedentes de zonas endémicas hepatitis aguda, donde las muestras que resultaban positivas a la presencia de anticuerpos anti-VHE IgG/IgM eran confirmadas por

inmunoblot, resultando 8 positivos a anti-VHE IgG y 5 positivos a IgM (Echevarria-Mayo 2006). En 2007, Herremans y col. también estudian la sensibilidad del inmunoblot y concluyen que esta técnica es más específica para cepas del genotipo 1 que para el genotipo 3. Esto puede explicarse por el uso de antígenos homólogos del genotipo 1 en los ensayos utilizados.

Por todos estos motivos, es necesario el desarrollo de técnicas serológicas más específicas para la detección de anticuerpos frente al VHE.

4.7 PREVENCIÓN

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

4.7.1 VACUNAS

En la actualidad, todavía no ha sido posible el desarrollo de una vacuna efectiva de este tipo debido a que no existe un sistema eficiente de cultivo del virus. No obstante, se están realizando considerables progresos en el desarrollo de la vacuna frente a la hepatitis E.

De las tres regiones de lectura abierta (ORFs) del VHE, el ORF2 es la zona diana de los anticuerpos neutralizantes (Tam y col. 1991). El antígeno de la cápside vírica fue expresado en *Escherichia coli* como una proteína completa y en forma truncada. Se han realizado estudios con la forma truncada de la proteína en monos Rhesus, mostrando capacidad protectora (Purcell y col. 2003a). Estudios posteriores revelaron la existencia de las "VLPs" (Virus-Like Particles), partículas formadas a partir de un ORF2 truncado en su extremo N-terminal en el aminoácido 111, que inducen la formación de inmunoglobulinas de tipo IgG, IgM e IgA (Li y col. 2005).

El sistema de expresión de proteínas más utilizado para la obtención de antígenos del VHE es la infección de líneas celulares de insecto con *Baculovirus* (Yarborough 1999). En las células de insecto, las proteasas endógenas producen una rotura de la proteína de la cápside vírica, dando como resultado proteínas con un tamaño de 63, 62, 56 y 53 kDa. En este sentido, se desarrollaron vacunas con las proteínas de 62 y 56 kDa de tamaño, comprobando que proporcionaban un alto grado de protección frente a la infección y que las proteínas debían estar en su estructura nativa manteniendo su conformación natural (Meng y col. 2001; Zhou y col. 2004). En la actualidad

se encuentra en estudio la multiplicación de cepas del genotipo 3 en una línea celular de hepatocarcinoma PLC/PRF/5 (Tanaka y col. 2007).

GlaxoSmithKline (GSK) desarrolló una vacuna con la proteína de 56 kDa de tamaño. En la evaluación preclínica de la vacuna probada en monos Rhesus, se obtuvo una prevención de la infección en un 83% y aumentaba su eficacia a 100% cuando los monos eran infectados con cepas del genotipo 1, 2 y 3 (Purcell y col. 2003b). Años más tarde, la vacuna fue testada para saber la eficacia y la inmunogenicidad en 2000 voluntarios de Estados Unidos y 1.800 soldados de Nepal (Shrestha y col. 2007). Esta vacuna se administró en 3 dosis (0-1-6 meses). No se observaron síntomas clínicos ni efectos adversos en los individuos vacunados. La eficacia de la vacuna después de las 3 dosis fue del 95,5% y tras 2 dosis del 87%.

En 2007, Dong y col. realizaron el primer estudio experimental con una vacuna con componentes antigénicos del VHA y VHE, demostrando que podría ser un primer paso, para la obtención de una vacuna efectiva frente a la hepatitis E. Esta vacuna combinada induce la neutralización de anticuerpos frente al VHA y al VHE en ratones (Dong y col. 2007). Esta vacuna sería de gran interés en zonas endémicas, donde el porcentaje de infección por ambos virus es elevado.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio retrospectivo en el que se determinó, en muestras de suero de personas relacionadas con la producción porcina (veterinarios, ganaderos, controladores y estudiantes de Veterinaria) y de voluntarios del ámbito universitario (estudiantes y profesores) pertenecientes a la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad Cardenal Herrera-CEU, la detección del ARN-VHE y presencia de anticuerpos frente al VHE de tipo IgG, IgM e IgA mediante técnicas moleculares e inmunoserológicas, respectivamente.

5.2 DISEÑO EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO

Para establecer el tamaño muestral, se tuvo en cuenta los datos del censo de trabajadores de explotaciones porcinas de la Comunidad Valenciana estimado aproximadamente en 2.350 personas según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y el censo de alumnos de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad Cardenal Herrera-CEU cifrado en 2.350 alumnos.

De acuerdo con los estudios disponibles, se consideró una prevalencia esperada de un 2,8% (Mateos y col. 1998). Con estos datos y utilizando el programa Win Episcopo[®] 2.0 se obtuvo un tamaño muestral mínimo de 168

personas, estableciendo un nivel de confianza del 95% y una precisión del 2,5%.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el modelo de regresión logística binaria, al disponer de una variable que describe una respuesta en forma de dos posibles eventos y que nos permite estudiar el efecto que otras variables tienen sobre ella. El programa estadístico utilizado para el estudio de regresión logística binaria fue el SPSS 15.0. Las variables analizadas en este estudio fueron presencia de ARN-VHE, presencia de anticuerpos anti-VHE IgG, IgM e IgA, exposición a ganado porcino, viaje al extranjero, frecuencia de consumo marisco crudo, verduras crudas y agua sin tratar. Para medir la asociación entre variables se aplicó la prueba de Odds Ratio (OR). Además la bondad de ajuste del modelo se realizó con la prueba de Hosmer-Lemeshow. Este parámetro estadístico permite corroborar que el modelo calculado se ajusta a los datos usados para estimarlo.

5.3 MUESTRAS

Durante el periodo comprendido entre Octubre de 2004 y Diciembre de 2007, se recogió suero de 212 individuos, de los que 113 (53,3%) eran hombres y 99 (46,7%) mujeres con edades comprendidas entre 20 y 60 años.

En todos los casos, en el momento de la extracción de sangre, se procedió a realizar una encuesta epidemiológica. En este cuestionario se solicitaba información general del donante y se recogían datos sobre posibles situaciones

de riesgo para contraer el VHE, como son exposición a ganado porcino, tiempo de exposición, consumo y frecuencia de agua no tratada, marisco y verduras crudas así como la realización de viajes al extranjero y en su caso, el país visitado (Fig.10).

Fig. 10. Encuesta epidemiológica para el estudio del virus de la hepatitis E (VHE).

DATOS DE FILIACIÓN

Identificación (apellidos y nombre/o clave) _____							
Fecha de Nacimiento	___/___/___	Edad (años)	___	Sexo: Hombre	<input type="checkbox"/>	Mujer	<input type="checkbox"/>
Domicilio _____							
Localidad	_____	Tfno	_____	Ocupación	_____		

DATOS ANALÍTICOS

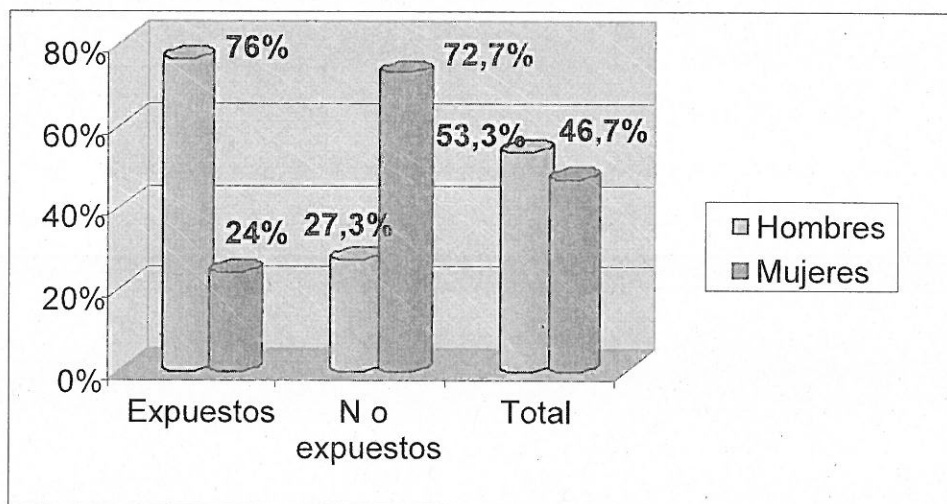
ALT	_____	AST	_____	GGT	_____	Fecha	_____	
determinación	___/___/___							
anti-VHE(IgM)	_____	ARN-VHE	_____	Fecha determinación	___/___/___			
anti-VHE(IgG)	_____							

DATOS EPIDEMIOLOGICOS

1. ¿Ha viajado en el último año al extranjero?
SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo indicar el país:
2. ¿Ha comido marisco crudo en los 2 últimos meses?
Nunca <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez/semana <input type="checkbox"/> 1 vez/semana <input type="checkbox"/>
2 veces/semana <input type="checkbox"/> 3 veces/semana <input type="checkbox"/>
3. ¿Ha comido verduras crudas en los 2 últimos meses?
Nunca <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez/semana <input type="checkbox"/> 1 vez/semana <input type="checkbox"/>
2 veces/semana <input type="checkbox"/> 3 veces/semana <input type="checkbox"/>
4. ¿Ha consumido agua no tratada o agua de la red pública que ha sufrido averías u otras incidencias en los 2 últimos meses?
Nunca <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez/semana <input type="checkbox"/> 1 vez/semana <input type="checkbox"/>
2 veces/semana <input type="checkbox"/> 3 veces/semana <input type="checkbox"/>
5. Grado de exposición que tiene con cerdos (0-4) (siendo 0 ausencia y 4 contacto continuo) :
6. ¿Cuánto tiempo hace que tiene contacto con cerdos? (en semanas) (1año=52 semanas):

Estos 212 individuos se clasificaron en dos grupos según la exposición al ganado porcino. El grupo de expuestos estaba compuesto por 113 (53,3%) personas, entre las cuales se incluyen veterinarios, controladores de granjas, profesores y estudiantes que han tenido contacto con cerdos. El grupo de no expuestos estaba formado por 99 (46,7%) personas voluntarias de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad Cardenal Herrera-CEU. De los 113 individuos que tenían contacto con cerdos, 86 (76%) eran hombres y 27 (24%) eran mujeres; mientras que de los 99 individuos sin exposición a estos animales, 27 (27,3%) eran hombres y 72 (72,7%) eran mujeres (Fig. 11).

Fig. 11. Distribución de los individuos del estudio según el sexo y la exposición al ganado porcino.



Dentro de la variable exposición a ganado porcino se tuvo en cuenta el tiempo de exposición que habían tenido las personas expuestas, obteniendo que un 62% de los individuos expuestos tenían una exposición a ganado porcino muy prolongada (más de 30 años). En cuanto a la variable viaje al extranjero, 149 (70,3%) individuos no viajaron al extranjero en el último año y 63 (29,7%) individuos habían viajado. Los países visitados fueron Francia, Alemania, Italia, Australia, Holanda, Reino Unido, Cuba y Túnez. En las variables consumo de marisco, verduras crudas y agua no tratada se tuvo en cuenta la frecuencia en la que consumían estos alimentos y se clasificaron en habitualmente o esporádicamente. Solamente 3 personas (1,4%) consumieron marisco crudo habitualmente, en cambio 209 personas (98,6%) lo hacían esporádicamente. El consumo de verduras fue habitual en 183 individuos (86,3%) y esporádico en 29 individuos (13,7%). Por último, se analizó la variable consumo de agua no tratada y obtuvimos que 40 individuos (18,9%) consumían agua no tratada habitualmente y 172 individuos (81,1%) esporádicamente.

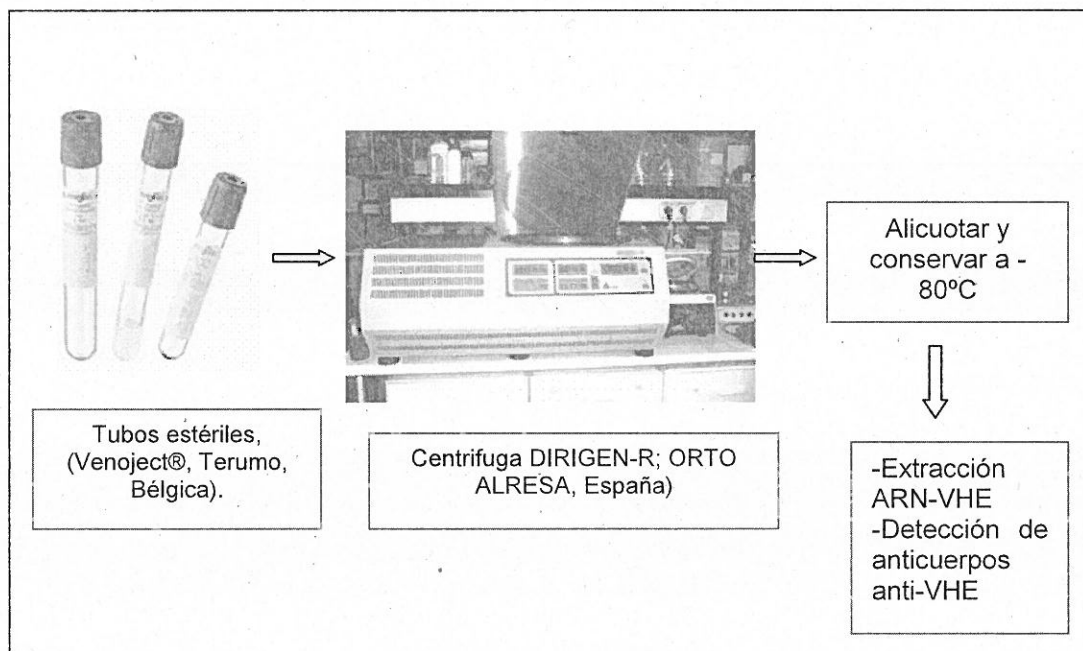
A los participantes en el estudio se les pidió consentimiento informado, en los términos que recoge la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la Autonomía del Paciente y de Derechos y Obligaciones en materia de Información y Documentación clínica. Por otra parte, el tratamiento de los datos de los sujetos participantes se ha ajustado en todo caso a lo establecido en la Ley Orgánica 15/99, de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal (BOE núm.298 del 14/12/99).

5.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron extraídas por personal sanitario de Enfermería, empleando material desechable y cumpliendo todas las medidas de bioseguridad.

Los recipientes para la extracción fueron tubos estériles de un volumen de 5 ml (Venoject®, Terumo, Bélgica). Pasados 30 minutos tras la extracción para permitir la coagulación, se procedió a la centrifugación durante 10 minutos a temperatura ambiente, a una velocidad de 1500g para separar el suero. Este suero obtenido se alicuotó en tubos de 1,5 ml y se conservó a -80°C hasta su procesamiento (Fig. 12).

Fig. 12. Procesamiento de las muestras.



5.5 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TRANSAMINASAS HEPÁTICAS

Para la determinación del nivel de transaminasas hepáticas se utilizó un ensayo comercial (SPINREACT, Barcelona), el cual nos permite determinar la concentración catalítica de AST y ALT en las muestras. Medimos la velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Hexios, Barcelona).

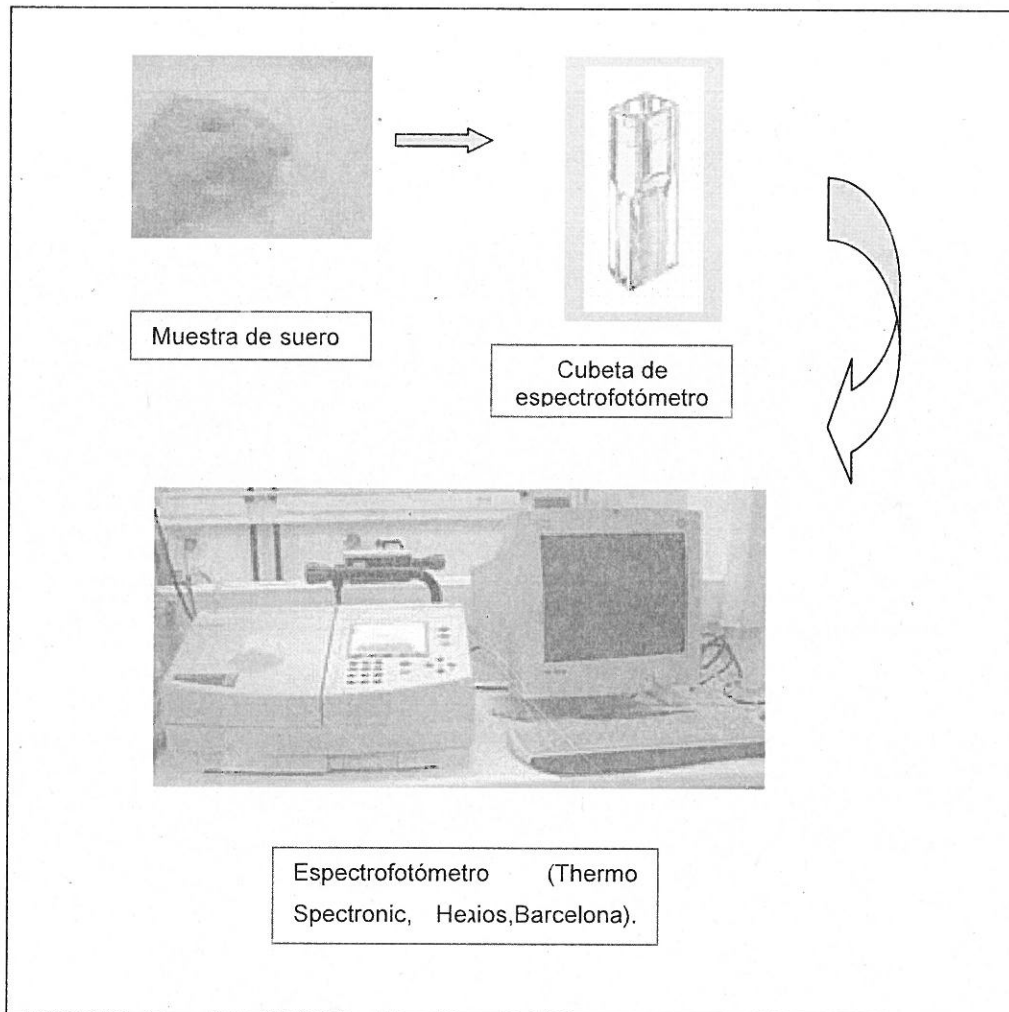
El procedimiento de la determinación es el siguiente (Fig. 13):

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda.....340 nm.
 - Cubeta.....1 cm. paso de luz.
 - Temperatura constante.....37°C.

- Se ajustó el espectrofotómetro a cero frente agua destilada o aire. La temperatura se mantuvo constante a 37°C mediante un baño termostático (Bunsen, España).

- Se pipeteó en una cubeta:
 - Reactivo de trabajo (ml) : 1,0 ml
 - Muestra (µl): 100 µl

Fig. 13. Determinación cuantitativa de las transaminasas hepáticas.



Preparación del reactivo de trabajo:

- Se disolvió una tableta de R2 substrato en 15 ml de R1, mezclando e incubando 1 minuto (Tabla 4).

Tabla 4. Reactivos para la preparación del reactivo de trabajo.

R1 Tampón	TRIA pH 7,8	80 mmol/L
	L-Aspartato	200 mmol/L
R2 Substrato	NADH	0,18 mmol/L
	Lactato deshidrogenasa (LDH)	800 mmol/L
	Malato deshidrogenasa (MDH)	600 mmol/L
	α -Cetoglutarato	12 mmol/L

- Se leyó la absorbancia (A) inicial de la muestra, leyendo la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
- El cálculo de la concentración AST/ALT se consiguió a partir de la formula U/L de $AST/ALT = \Delta A/min \times 1750$ donde UI es unidad internacional y $\Delta A/min$ es incremento de absorbancia por minuto.

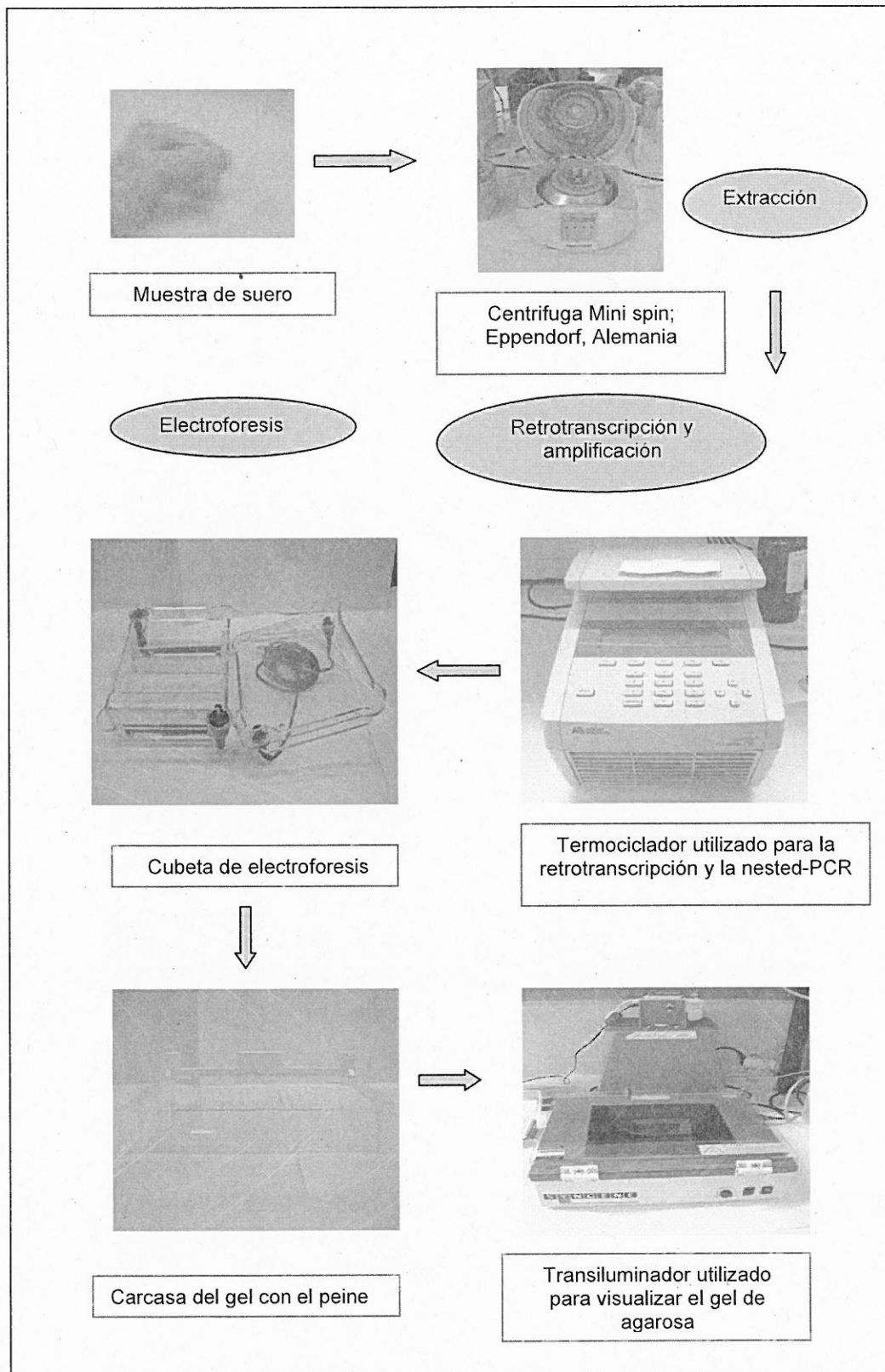
Valores fisiológicos de referencia

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. En este caso, los valores normales a 37°C son ALT: 10-45 UI/L en hombres y 5-31 UI/L en mujeres y AST: 10-43 UI/L en hombres y 5-36 UI/L en mujeres.

5.6 DETECCIÓN DEL ARN-VHE

La detección del ARN del VHE se realizó mediante tres procesos, que fueron, extracción, retrotranscripción (RT) o transcripción inversa (TI) y por último, amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa anidada (nested-PCR) (Fig. 14).

Fig. 14. Procesos realizados para la extracción del ARN-VHE.



5.6.1 EXTRACCIÓN DE ARN-VHE

Para la extracción del ARN-VHE se utilizó un método comercial (QIAamp® Viral Mini Kit; Qiagen, USA) cuyo principio se basa en la adhesión del ARN a una membrana de sílica gel ubicada en una mini columna para posteriormente será eluído con un tampón especial.

Durante todo el proceso se cumplieron estrictamente todas las medidas de seguridad necesarias para evitar la contaminación cruzada de las muestras (uso de guantes, pipetas con filtro, espacio de trabajo descontaminado de una extracción a otra). Además la realización de los pasos para elaborar dichas mezclas se realizaron en una campana de flujo laminar.

El procedimiento realizado fue el siguiente:

1. Se añadieron 140 μ l de suero a 560 μ l de tampón de lisis con objeto de crear unas condiciones desnaturalizantes que inactivaran las ARNasas y degradasen todo lo que no fuera ARN (células, envoltura vírica). La composición de dicho tampón optimiza la unión del ARN a la membrana de la columna. La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex (MS2 minishaker; IKA®, Dinamarca) durante 15 segundos y se dejó actuar el tampón de lisis durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. A continuación se realizó una centrifugación a 6000g durante 30 segundos en una centrífuga (Mini spin; Eppendorf, Alemania) para tubos

- de 1,5 ml, con objeto de hacer descender las gotas de muestra desde la tapa del tubo y evitar contaminaciones de un tubo a otro al pipetear.
3. Se añadieron 560 μ l de etanol absoluto (Panreac, España) y se agitó en el vórtex durante 15 segundos. De este modo se consigue la precipitación del ARN.
 4. Se añadió la mezcla anterior a una mini columna compuesta de una membrana de sílica gel; el ARN y todos los componentes precipitados quedaron así adheridos a dicha membrana.
 5. Se centrifugó la mini columna durante 1 minuto a 6000g para poder eliminar el líquido y mantener solamente el filtro y su contenido adherido.
 6. Seguidamente, se hicieron pasar por el filtro 2 tipos de tampón de lavado con unas características especiales de pH y concentración de sales, que eliminan los restos de enzimas que pudieran permanecer en la membrana, mediante centrifugaciones sucesivas a 6000g durante un minuto para el tampón de lavado nº 1 y a máxima velocidad (100500g) durante 3 minutos para el tampón de lavado nº 2.
 7. Finalmente, se añadió un tampón de elución que despegó el ARN de la membrana mediante una centrifugación a 6000g durante un minuto.
 8. El ARN obtenido se procesó inmediatamente para evitar su degradación por RNAsas. El ARN restante, después de ser usado, se almacenó a -80°C.

5.6.2 RETROTRANSCRIPCIÓN O TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL ARN

VÍRICO

El ARN extraído de la muestra de suero, tiene que transformarse previamente en ADN complementario (ADNc). Este proceso es denominado retrotranscripción o transcripción inversa.

El protocolo realizado fue el siguiente:

1. Se mezclaron 10 μ l del ARN extraído (1ng-5ng), 1 μ l de una mezcla de dinucleótidos (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), (Geneamp® Applied Biosystems, USA) a una concentración de 10 mM y 1 μ l del iniciador 3157N (Tabla7) en un tubo de 0,2 ml de capacidad.
2. Se colocaron los tubos con la mezcla en el termociclador (GeneAmp® PCR System 2700, Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA), y se incubó a 65°C durante 5 minutos para permitir que el cebador se uniera a la secuencia de nucleótidos diana.
3. Inmediatamente tras la incubación, se dispusieron los tubos sobre hielo picado para evitar plegamientos de la hebra de ARN sobre sí misma y detener la reacción.
4. Se centrifugaron brevemente los tubos para asegurarnos una mezcla adecuada de todos los reactivos.
5. Se añadieron 4 μ l de tampón 5X (Invitrogen, USA), 2 μ l de una disolución 0,1 M de ditioneitol (DTT) (Invitrogen, USA) que estabiliza la mezcla favoreciendo la unión del cebador a la secuencia diana y 1 μ l

de un inhibidor recombinante de ribonucleasas (RNAseOUT®, Invitrogen, USA) a una concentración de 40 U/μl.

6. Se incubaron durante 2 minutos a 42°C para estabilizar la reacción y eliminar las ribonucleasas.
7. Se añadieron 1 μl (200 U) de retrotranscriptasa perteneciente al virus de la leucemia murina (Superscript® II RT, Invitrogen, USA).
8. Se incubaron a 42 °C durante 50 minutos para permitir la formación del ADNc de la hebra de ARN.
9. Tras este tiempo, se elevó la temperatura a 70°C durante 15 minutos para inactivar la polimerasa y detener la reacción. El ADNc obtenido mediante este proceso se almacenó a -80°C hasta su procesamiento, o se sometió a su amplificación.

5.6.3 NESTED-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa anidada)

El ADNc obtenido durante la retrotranscripción se amplificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa anidada (nested-PCR). Para ello; se utilizaron dos parejas de cebadores degenerados (Operon®, USA) que amplificaban un fragmento de la región ORF2, unos externos que amplifican un fragmento de 730 pares de bases durante una primera PCR, y otros internos que amplifican un fragmento de 348 pares de bases en una segunda PCR (Tabla 5).

Tabla.5.Cebadores utilizados en la nested-PCR para la amplificación del VHE.

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

Los cebadores utilizados fueron diseñados por Huang y col. con el objeto de ser universales, es decir, para amplificar cualquier genotipo del VHE. En la obtención de estos cebadores se tuvieron en cuenta las secuencias de 18 cepas humanas diferentes de VHE y la cepa prototipo porcina aislada en Estados Unidos.

Para llevar a cabo estas reacciones, se utilizaron 5 µl de ADNc en la 1ª PCR y 5 µl de producto amplificado de la 1ª PCR, para la 2ª PCR, en un volumen total de 50 µl. La composición de dichas mezclas se describe en las tablas 6 y 7. Todos los pasos para elaborar dicha mezcla se realizaron en una campana de flujo laminar con el objeto de evitar contaminaciones.

Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción para la primera PCR.

REACTIVO	C_i	VOLUMEN	C_f
Agua bidestilada estéril	-	30 μ l	-
Tampón de reacción sin Cloruro de Magnesio (MgCl ₂) (Applied Biosystems, USA)	10X	5 μ l	1X
Mezcla de dinucleótidos: dTTP, dATP, dCTP, dGTP (Applied Biosystems, USA)	10 mM	4 μ l	0,2 mM
MgCl ₂ (Applied Biosystems, USA)	25 mM	3 μ l	1,5 mM
Taq polimerasa (Amplitaq gold®, Applied Biosystems, USA)	5 U/ μ l	0,5 μ l	2,5 U / 50 μ l de reacción
Cebador 3156N (Operon®, USA)	20 μ M	1,25 μ l	0,5 μ M
Cebador 3157N (Operon®, USA)	20 μ M	1,25 μ l	0,5 μ M
Muestra de ADNc	-	5 μ l	-
Volumen total de reacción		50 μ l	
<i>C_i = Concentración inicial; C_f = Concentración final</i>			

Tabla 7. Composición de la mezcla de reacción para la segunda PCR.

REACTIVO	C_i	VOLUMEN	C_f
Agua bidestilada estéril	-	30 μ l	-
Tampón de reacción sin (Applied Biosystems, USA)	10X	5 μ l	1X
Mezcla de dinucleótidos: dTTP, dATP, dCTP, dGTP (Applied Biosystems, USA)	10 mM	4 μ l	0,2 mM
MgCl ₂ (Applied Biosystems, USA)	25 mM	3 μ l	1,5 mM
Taq polimerasa (Amplitaq gold®, Applied Biosystems, USA)	5 U/ μ l	0,5 μ l	2,5 U/50 μ l de reacción
Cebador 3158N (Operon®, USA)	20 μ M	1,25 μ l	0,5 μ M
Cebador 3159N (Operon®, USA)	20 μ M	1,25 μ l	0,5 μ M
Muestra de producto de la primera PCR	-	5 μ l	-
Volumen total de reacción		50 μ l	
<i>C_i = Concentración inicial; C_f = Concentración final</i>			

En la tabla 8 se describe el protocolo de amplificación, común tanto para la primera como para la segunda PCR.

Tabla 8- Protocolo de amplificación del ADNc y del producto de la 1ª PCR.

DESNATURALIZACIÓN (HOT START)	95°C / 9 MINUTOS	40 CICLOS
DESNATURALIZACIÓN	94°C / 1 MINUTO	
HIBRIDACIÓN	55°C / 30 SEGUNDOS	
POLIMERIZACIÓN	72°C / 1 MINUTO	
POLIMERIZACIÓN RESIDUAL	72°C / 7 MINUTOS	

La temperatura de hibridación (T_a) se ajustó teniendo en cuenta la temperatura melting (T_m) proporcionada por el fabricante de los oligonucleótidos, teniendo en cuenta el porcentaje de guanina-citosina de los cebadores utilizados, según las siguientes fórmulas:

$$T_m = 81,5 - 16,6 (\log_{10} \{Na^+\} + 0,41 (\%G+C) - (600/L))$$

$$T_a = T_m - 5^\circ C$$

T_m : temperatura melting. Temperatura a la cual el 50% de las cadenas de ADN se encuentran desnaturalizadas

$\{Na^+\}$: concentración de sodio

L: número de bases que tiene el oligonucleótido

T_a : temperatura de hibridación

Previamente a la amplificación, se realizó un proceso denominado "hot start" a una temperatura de 95°C durante 9 minutos, cuya función es evitar amplificaciones inespecíficas y activar la Taq polimerasa.

A continuación se realizaron 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y polimerización, para concluir con un ciclo de 7 minutos a 72°C con el objeto de permitir que las cadenas de ADN que se han producido en el último ciclo se elongaran hasta el tamaño deseado (polimerización residual).

El producto de la primera PCR, de 730 pares de bases de longitud, se utilizó como molde para la segunda PCR. Se realizó el mismo protocolo de amplificación que para la primera PCR. En aquellas ocasiones en las que no fue posible realizar inmediatamente la segunda PCR, el producto de PCR se congeló a -80°C hasta su procesamiento.

El producto de la segunda PCR con una longitud de 348 pares de bases, fue sometido a electroforesis y después se guardó congelado a -80°C.

5.6.4 ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

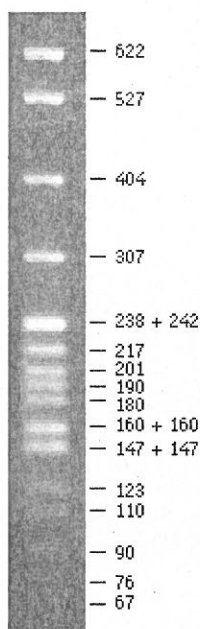
El producto en la 2ª PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% (P/V) en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA).

El proceso realizado fue el siguiente:

1. Se pesaron 2 gramos de agarosa y se disolvieron en 100 ml de tampón TAE para elaborar un gel de 10 x 15 cm con capacidad para 20 muestras.
2. Se llevó a ebullición en microondas, hasta que se disolvió completamente la agarosa.
3. Se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml para teñir el ADN.
4. Se vertió sobre un molde en el que previamente se había colocado un peine para que cuando solidifique el gel dejase unos pocillos en los que cargar las muestras.
5. Una vez solidificado el gel, se colocó dentro de la cubeta de electroforesis bañado en tampón TAE y se retiró el peine.
6. A continuación, se mezclaron 5 µl de tampón de carga con 15 µl de producto final de PCR y se depositaron en el pocillo del gel.

En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular (pBR322 DNA-Msp I Digest; Biolabs, USA), que comprende 26 fragmentos, desde 622 hasta 67 pares de bases (Fig. 15). Se añadieron al pocillo 3 µl del marcador de peso molecular más 5 µl de tampón de carga.

Fig. 15. Marcador de peso molecular



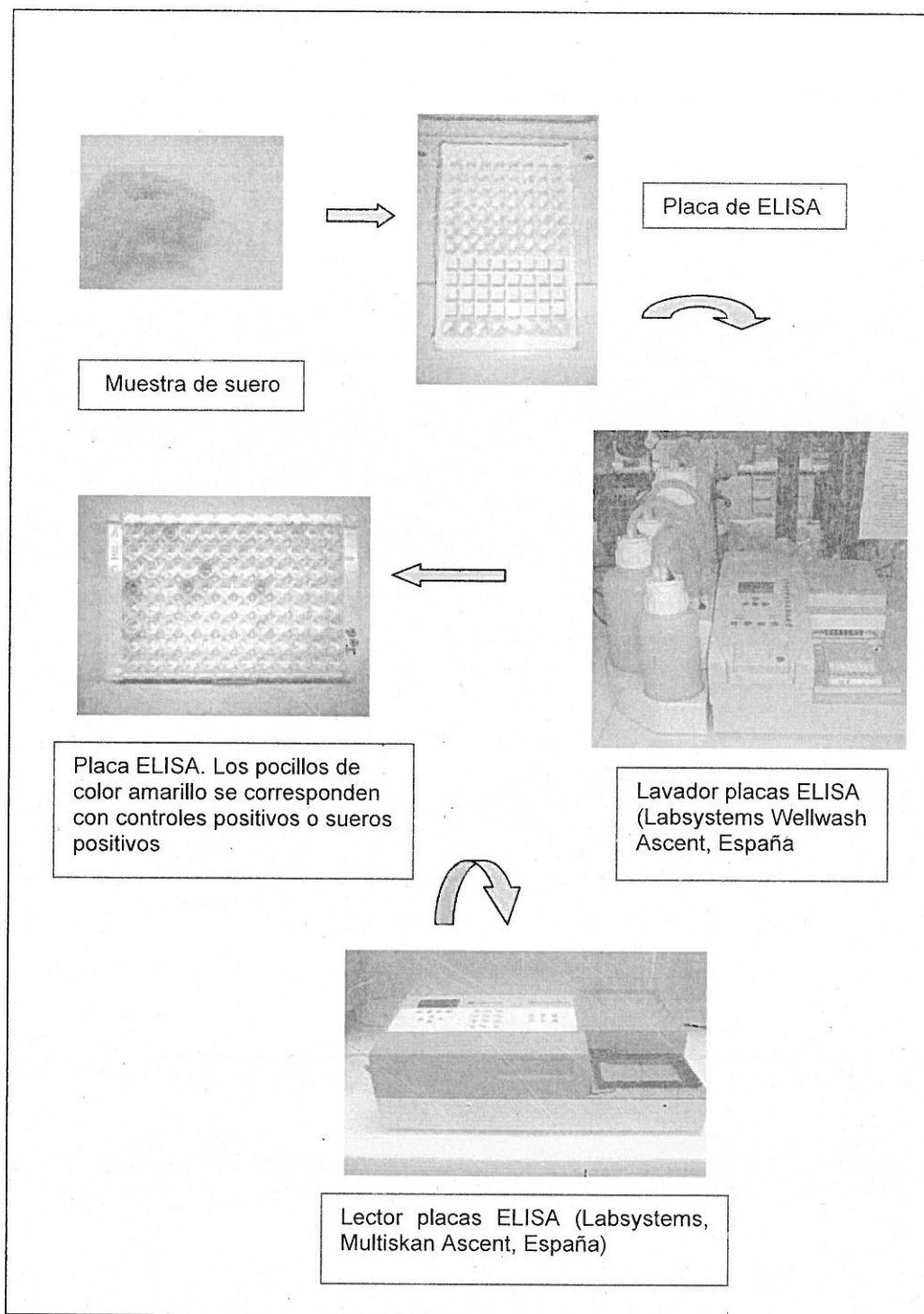
Además, en todas las determinaciones se incluyeron los controles positivo y negativo que se habían introducido desde el comienzo del proceso. Como control positivo utilizamos una cepa de origen porcino, registrada en el GenBank con el número de acceso AY323506 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi>). Esta cepa se obtuvo de un estudio realizado en 36 muestras fecales de cerdos con edades comprendidas entre 3 y 24 meses, pertenecientes a 8 granjas de la Comunidad Valenciana.

Mediante una fuente de electroforesis (Power Pack 300Biorad®, USA), que genera un campo eléctrico responsable de la migración del ADN hasta una distancia proporcional a su peso molecular, se aplicó al gel una corriente de 80mV durante 1 hora.

5.7 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VHE DE TIPO IgG, IgM E IgA MEDIANTE ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA).

Para la detección de anticuerpos anti-VHE de tipo IgG, IgM e IgA se ha utilizado un método inmunoenzimático comercial (Fortress Diagnostics Limited, Reino Unido). Este ELISA tiene tapizados los pocillos de la microplaca con antígenos recombinantes del VHE, que se corresponden con la región estructural del virus ORF2 de genotipo 1 y 2 (Fig. 16).

Fig. 16. Realización del Enzimoimmunoensayo.



El protocolo que se ha realizado ha sido el siguiente:

1. Se mantuvieron las placas a temperatura ambiente durante 15-20 minutos antes de su utilización. Se reservaron 6 pocillos para blanco y controles (tres pocillos para el control negativo, dos para el control positivo y un pocillo para el blanco del sustrato). Se transfirieron 100 μ l de diluyente a todos los pocillos.
2. Se añadieron 10 μ l de cada control y de cada muestra a los pocillos correspondientes.
3. Se cubrió la microplaca con una lámina adhesiva y se incubó durante 30 minutos a 37°C.
4. Se quitó y desechó la lámina adhesiva, aspirando el contenido de los pocillos y llenándolos completamente (aproximadamente 300 μ l) con solución de lavado diluida. Se repitió el proceso de aspiración y lavado 5 veces más.
5. Después del último lavado se eliminó el exceso de líquido de los pocillos. Los lavados se realizaron empleando el lavador de placas de ELISA (Labsystems, Wellwash Ascent, España).
6. Se transfirieron 100 μ l de conjugado diluido a cada pocillo, a excepción del destinado al blanco, evitando la formación de burbujas. Para la detección de anticuerpos de clase IgG e IgM se utilizó el conjugado del ensayo diluido 1/1.000. En cambio para la detección de IgA se utilizó el conjugado anti-human IgA HRP conjugate (Caltag Laboratorios, Burlingame, CA) a varias concentraciones (1/1.000, 1/5.000, 1/10.000). una vez realizados los estudios, utilizamos una dilución para el conjugado de IgA de 1/1.000.

7. Se cubrió la placa con una lámina adhesiva y se incubó durante 30 minutos a 37°C.
8. Se quitó la lámina adhesiva y se procedió con el aspirado y lavado como en el paso 5.
9. Se añadieron 50 µl de cromógeno A (solución de peróxido de urea) y 50 µl de cromógeno B (solución de TMB) a todos los pocillos, incluido el blanco.
10. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) protegiéndolo de la luz.
11. Se añadieron 50 µl de solución de parada a cada pocillo, siguiendo la misma secuencia de distribución y con los mismos intervalos observados en la adición del sustrato.
12. Se leyó la absorbancia a 450 nm de cada uno de los pocillos en el tiempo máximo de 10 minutos (Labsystems, Multiskan Ascent, España).

Interpretación de los resultados

Para anticuerpos anti-VHE IgM

Para interpretar los resultados, en primer lugar, es necesario calcular el valor de punto de corte o cut-off. Este valor se calculó sumando 0,26 (valor establecido por el ensayo) a la absorbancia promedio del control negativo.

$$\text{Cut-off} = \text{CN}_x + 0,26$$

Una vez obtenido el cut-off, se divide la absorbancia de la muestra por este valor y consideramos el valor como positivo, dudoso o negativo cuando:

- Positivo: valor de absorbancia de la muestra/cut-off $\geq 1,0$
- Negativo: valor de absorbancia de la muestra /cut-off $< 0,9$
- Dudoso: valor de absorbancia de la muestra /cut-off $\geq 0,9 < 1,0$

Para anticuerpos anti-VHE IgG

La media de absorbancia de los blancos debe de ser restada de la absorbancia de los controles y las muestras antes de la interpretación de la técnica. La presencia o ausencia de anticuerpos específicos de VHE se determina relacionando la absorbancia de la muestra con el valor de punto de corte (cut-off). El valor del cut-off, en este caso, se calculó sumando 0,16 (valor establecido por el ensayo) a la absorbancia promedio del control negativo (CN_x):

$$\text{Cut-off} = \text{CN}_x + 0,16$$

De acuerdo a las instrucciones del fabricante, las muestras con valores de absorbancia menor que el cut-off se consideraron como no reactivas, mientras que los valores de absorbancia igual o superior al valor de punto de corte se consideraron como inicialmente reactivas, debiendo repetirse por duplicado antes de su interpretación.

En el caso de que las muestras fueran positivas en varios ensayos se interpretaron como positivas a la presencia de IgG frente al VHE, mientras que las muestras inicialmente reactivas que fueron no reactivas en ensayos sucesivos se consideraron como negativas.

Para anticuerpos anti-VHE IgA

El valor del cut-off, en este caso, se calculó sumando 0,2 a la absorbancia promedio del control negativo:

$$\text{Cut-off} = \text{CN}_x + 0,2$$

El valor de 0,2 se calculó de la siguiente forma: la suma de la media de absorbancia de los controles negativos más el valor de absorbancia del menor de los controles positivos, obteniendo un valor de 0,2.

5.8 INMUNOBLOT VHE IgG/IgM

Para la confirmación de las muestras positivas a la detección de anticuerpos anti-VHE de tipo IgG e IgM mediante ELISA se utilizó un inmunoblot comercial compuesto por antígenos recombinantes que son separados por electroforesis y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (RECOMBLOT HEV IgG/IgM, Mikrogen, Alemania). Este inmonoblot utiliza antígenos procedentes de la región N-terminal (O2N, una banda), C-terminal de la cápside (O2C, tres bandas), región intermedia de la cápside (O2M, una banda) y de la proteína del ORF3 (O3, una banda) de cepas del genotipo 1 y 2.

El protocolo realizado fue el siguiente (Fig. 17):

1. Se atemperaron los reactivos a temperatura ambiente durante 15-30 minutos. Se reservó cada pocillo para cada tira. A continuación se transfirieron 2 ml de tampón de lavado diluido en cada pocillo. Nos aseguramos que cada tira quedo completamente inmersa en el tampón de lavado diluido.
2. Se añadieron 33µl de suero problema (diluido 1:60) en cada pocillo.
3. Se cubrió la placa con una bandeja de plástico y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.
4. A continuación se procedió al aspirado del contenido de los pocillos.
5. Se añadieron 2 ml de tampón de lavado y se agitó cuidadosamente durante cinco minutos en el agitador de rotación circular de placas (Meldoph, Rotamax 120).
6. Se repitió el proceso de aspirado y lavado 4 veces más.

7. Se transfirieron 2 ml de solución del conjugado diluida (1/1000) según en cada pocillo y cubrimos la placa con la bandeja e incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
8. Se repitió el proceso de aspirado y lavado 4 veces más.
9. Se añadieron 1,5 ml de sustrato a todos los pocillos y se incubó incubamos a temperatura ambiente durante 15 minutos en agitación, protegiéndolo de la luz.
10. Se lavaron las tiras con mucho cuidado como mínimo 3 veces con agua bidestilada y se secaron durante 2 horas entre dos capas de papel absorbente.
11. Se leyeron las tiras comparándolas con el patrón (Fig.19) y según las tablas 9,10 y 11 se obtuvo el valor final en la hoja de resultados (Fig. 18).

Fig. 17. Procedimiento del Inmunoblot.

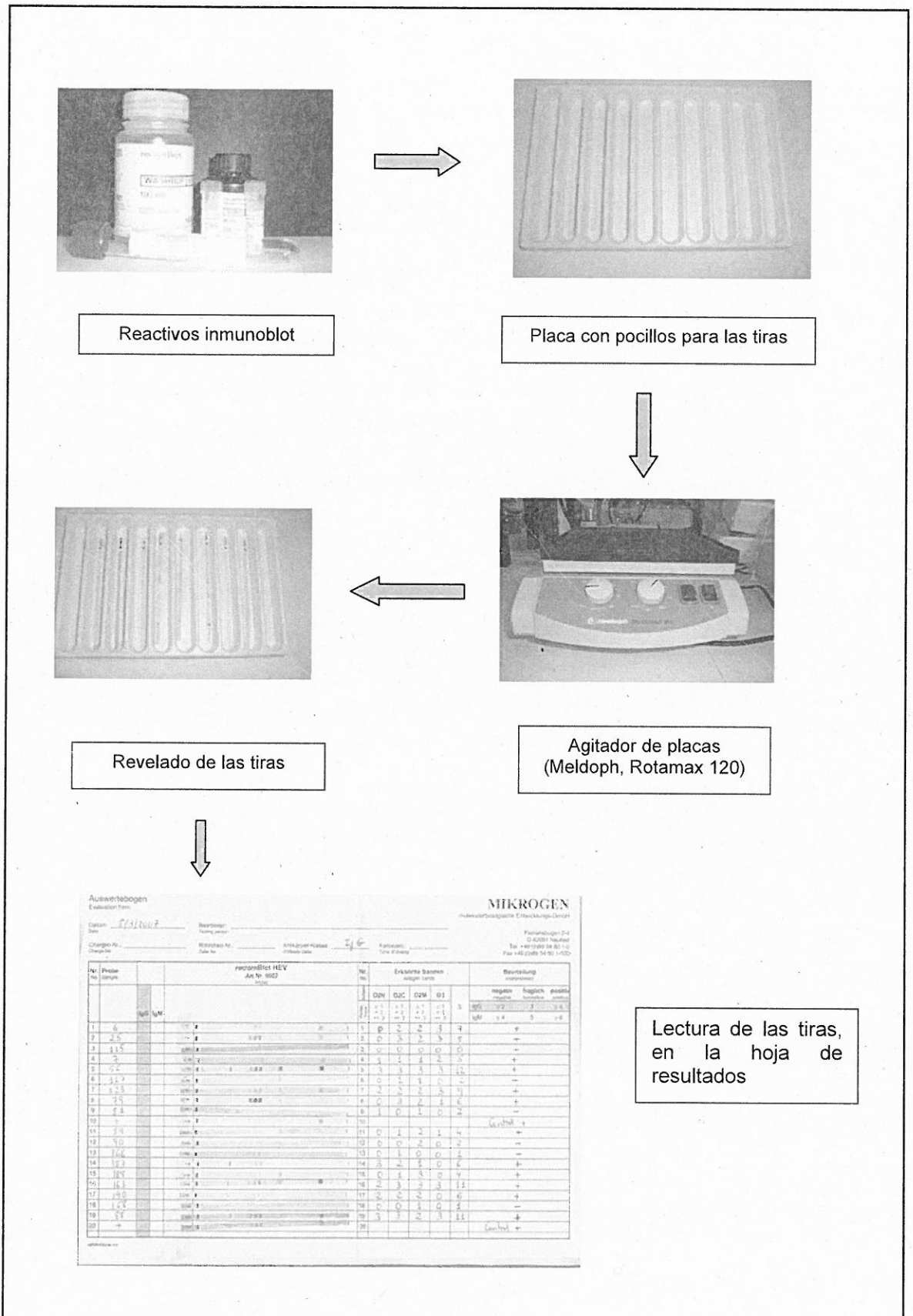


Fig. 18. Hoja de lectura del inmunoblot.

Auswertebogen
Evaluation form

Datum: _____
Date

Charakter-Nr.: _____
Charge No.

Beobachter: _____
Testing person

Röhrchen-Nr.: _____
Tube No.

Antikörper-Klasse: _____
Antibody class

Farbezeit: _____
Time of dyeing

MIKROGEN
molekularbiologische Entwicklungs-GmbH

Floriansbogen 2-4
D-82061 Nouried
Tel. +49 (0)89 54 80 1-0
Fax +49 (0)89 54 80 1-100

Nr. No.	Probe Sample	recomBiot HEV Art.Nr. 5002 Art No.	Erkannte Banden Antigen bands				Beurteilung Interpretation	
			O2N	O2C	O2M	O3	negativ negative	fraglich borderline
			±1 +2 ++3	±1 +2 ++3	±1 +2 ++3	±1 +2 ++3	IgG IgM	≥ 4 ≥ 6
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								

A5RBHEID003A.D02

Fig. 19. Patrón de lectura.

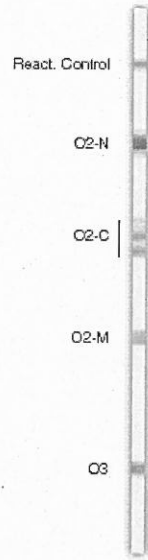


Tabla 9. Tabla de lectura.

Bandas	Intensidad	Puntos
No reaccionan	-	0
Intensidad muy débil	+/-	1
Intensidad Débil	+	2
Intensidad elevada	++	3

Tabla 10. Tabla de evaluación para anticuerpos Anti-VHE IgG.

Suma de intensidad de las bandas	Valoración
0-2	Negativo
3	Dudoso
4-12	Positivo

Tabla 11. Tabla de evaluación para anticuerpos Anti-VHE IgM.

Suma de intensidad de las bandas	Valoración
0-4	negativo
5	dudoso
6-12	positivo

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 212 individuos que componen este estudio, no se identificó el ARN-VHE en ninguno de ellos (tabla 12). Esto puede ser debido a que el ARN-VHE sólo se detecta en las 2 primeras semanas post-infección (Chauhan y col. 1993; Clayson y col. 1995; Nanda y col. 1995) y ningún individuo refería haber padecido una hepatitis E aguda sintomática. Todas las personas presentaron niveles normales de transaminasas hepáticas. En lo que hace referencia a la detección de anticuerpos frente al VHE en los 212 individuos analizados, 25 personas (11,8%) presentaron anti-VHE de tipo IgG. Los anticuerpos anti-VHE de tipo IgM solamente fueron detectados en 1 persona (0,4%). Por último, 3 personas (1,4%) resultaron positivas frente a anticuerpos de clase IgA (tabla 12). Ninguno de los 25 seropositivos a anti-VHE IgG resultó positivo a anticuerpos anti-VHE IgM. Los anticuerpos anti-VHE de tipo IgA fueron detectados en 2 (8%) de estos 25 individuos.

De los 25 individuos que resultaron positivos a anticuerpos anti-VHE IgG, 22 (88%) fueron hombres y 3 (12%) fueron mujeres. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,01$) entre la presencia de anti-VHE IgG en hombres y mujeres, con un valor de OR de 7,73 (IC de 2,2-26,7) para los hombres. En nuestro estudio, aunque presente valor significativo, no lo hemos considerado como un factor de riesgo, debido a que en el grupo de expuestos la mayoría son hombres y en el grupo de no expuestos la mayoría son mujeres. No existe ningún estudio que confirme el género como factor de riesgo para contraer la infección, por lo que serían necesarios más estudios para poder corroborar este hecho.

Tabla 12. Características, factores de riesgo y marcadores del VHE de los individuos que componen el estudio.

[ID: número de identificación, H: hombre, M: mujer, ALT: alanina aminotransferasa (niveles fisiológicos: 10-45 UI/L en hombres y 5-31 UI/L en mujeres), AST: aspartato aminotransferasa (niveles fisiológicos: 10-43 UI/L en hombres y 5-36 UI/L en mujeres), -: negativo, +: positivo, VIAJE: viaje al extranjero, MAR: consumo de marisco crudo, VERD: consumo de verduras crudas, AGUA: consumo de agua no tratada, EXP: exposición a ganado porcino, HAB: habitualmente y ESP: esporádicamente). Individuos anti-VHE IgG positivo, Individuos anti-VHE IgM positivo, Individuos anti-VHE IgA positivo, Individuos anti-VHE IgG e IgA positivos].

ID	EDAD	SEXO	ALT	AST	ANTI-VHE IgG	ANTI-VHE IgM	ANTI-VHE IgA	EXP	VIAJE	MAR	VERD	AGUA
1	27	H	10	15	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
2	25	M	15	8	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
3	25	M	15	18	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
4	21	H	15	19	-	-	-	NO	NO	ESP	ESP	ESP
5	25	M	11	9	-	-	-	NO	NO	ESP	ESP	ESP
6	41	H	32	19	+	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
7	22	M	13	9	+	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
8	21	M	8	8	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
9	32	M	11	22	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
10	43	M	20	24	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
11	41	M	7	8	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	HAB
12	37	M	17	13	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
13	25	H	1	15	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
14	26	M	12	13	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
15	21	M	19	10	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
16	26	M	18	6	-	-	-	NO	NO	ESP	ESP	ESP
17	21	H	16	17	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
18	21	M	12	9	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
19	21	M	22	16	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
20	22	H	11	22	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	HAB
21	27	H	29	29	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
22	29	M	9	6	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
23	29	M	12	8	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
24	21	M	15	15	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
25	23	M	13	4	+	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
26	23	M	12	13	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
27	21	M	12	7	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
28	21	M	10	7	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
29	25	M	23	3	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
30	37	M	16	5	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
31	32	M	9	2	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
32	40	H	18	15	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
33	27	H	15	13	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
34	21	M	13	11	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
35	28	M	12	7	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
36	21	M	7	5	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	HAB

ID	EDAD	SEXO	ALT	AST	ANTI-VHE IgG	ANTI-VHE IgM	ANTI-VHE IgA	EXP	VIAJE	MAR	VERD	AGUA
37	24	M	11	9	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
38	21	M	3	32	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
39	32	M	14	4	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
40	35	M	21	14	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
41	21	M	17	7	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
42	21	M	13	4	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
43	26	M	7	1	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
44	23	M	9	4	-	-	-	NO	NO	ESP	ESP	ESP
45	32	M	11	5	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
46	28	M	16	14	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	HAB
47	30	M	11	9	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
48	36	M	8	16	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
49	24	M	12	5	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
50	22	H	15	8	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
51	22	M	13	6	-	-	-	NO	SI	ESP	ESP	ESP
52	26	M	13	9	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
53	52	H	9	11	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
54	22	M	17	9	-	-	-	NO	SI	ESP	ESP	ESP
55	23	M	13	5	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
56	28	H	24	28	+	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
57	52	M	30	12	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
58	25	H	25	30	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
59	24	H	45	26	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
60	23	H	16	4	-	-	-	SI	SI	ESP	ESP	ESP
61	23	M	14	5	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
62	27	H	12	14	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
63	23	M	12	10	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
64	25	M	11	13	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	HAB
65	29	M	16	9	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	ESP
66	30	M	15	5	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
67	33	M	11	6	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
68	26	H	27	19	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
69	35	H	13	12	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
70	32	M	8	2	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
71	36	M	15	10	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
72	28	H	28	19	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
73	30	M	21	7	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
74	29	H	22	6	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
75	28	M	15	8	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
76	46	H	6	18	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP

ID	EDAD	SEXO	ALT	AST	ANTI-VHE IgG	ANTI-VHE IgM	ANTI-VHE IgA	EXP	VIAJE	MAR	VERD	AGUA
77	34	M	9	6	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
78	37	H	14	8	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
79	43	H	26	19	+	-	-	SI	SI	ESP	HAB	HAB
80	31	H	16	16	-	-	-	SI	SI	ESP	ESP	ESP
81	40	H	14	13	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
82	31	M	11	5	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
83	44	H	18	15	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
84	35	H	26	16	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
85	44	H	11	7	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
86	31	H	13	11	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
87	35	H	26	13	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
88	47	H	19	17	+	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
89	58	H	16	7	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
90	59	H	15	8	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
91	31	H	30	5	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
92	27	H	40	25	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	ESP
93	32	H	14	8	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
94	26	M	15	10	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
95	33	H	12	3	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
96	26	H	81	28	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
97	32	H	9	19	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
98	38	H	17	20	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
99	23	H	17	17	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	HAB
100	29	M	13	4	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
101	30	M	9	7	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
102	37	H	11	9	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
103	40	H	19	19	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	HAB
104	22	M	6	19	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
105	22	M	35	14	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
106	18	M	20	20	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
107	18	M	21	15	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
108	18	M	11	13	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
109	18	M	9	20	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
110	18	M	14	11	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
111	18	M	10	14	-	+	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
112	19	M	6	7	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
113	23	M	11	18	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	HAB
114	23	M	10	15	-	-	-	NO	NO	ESP	ESP	HAB
115	18	M	19	4	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
116	18	M	30	14	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP

ID	EDAD	SEXO	ALT	AST	ANTI-VHE IgG	ANTI-VHE IgM	ANTI-VHE IgA	EXP	VIAJE	MAR	VERD	AGUA
117	23	M	20	4	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
118	25	M	20	18	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
119	21	H	24	5	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	HAB
120	24	M	13	11	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
121	23	M	13	11	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
122	29	M	16	12	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
123	25	M	16	4	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
124	23	M	23	9	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
125	21	H	21	7	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
127	19	M	14	4	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
128	26	H	27	11	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
129	25	H	37	10	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
130	18	M	7	11	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
131	18	H	14	12	-	-	-	NO	SI	ESP	ESP	ESP
132	31	H	30	16	-	-	-	NO	SI	ESP	ESP	ESP
133	22	M	22	7	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	ESP
134	25	M	19	7	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
135	10	H	26	17	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
136	18	M	11	21	-	-	-	NO	NO	ESP	ESP	ESP
137	19	H	64	40	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
138	19	H	34	12	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
139	21	M	48	16	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
140	18	M	28	23	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
141	33	H	76	46	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
142	25	M	40	27	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
143	25	M	19	13	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
144	25	M	12	8	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
145	31	2	18	7	-	-	+	NO	NO	ESP	HAB	ESP
146	22	H	29	22	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
147	26	M	29	36	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
148	23	M	24	17	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
149	24	H	27	16	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP
150	37	H	24	11	+	-	-	SI	NO	ESP	ESP	HAB
151	39	H	28	12	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
152	19	H	36	16	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	HAB
153	58	H	30	23	-	-	-	SI	SI	ESP	ESP	ESP
154	42	H	46	39	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
155	20	H	13	5	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
156	20	H	10	14	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
157	18	H	10	4	-	-	-	NO	NO	ESP	HAB	ESP

ID	EDAD	SEXO	ALT	AST	ANTI-VHE IgG	ANTI-VHE IgM	ANTI-VHE IgA	EXP	VIAJE	MAR	VERD	AGUA
158	40	H	19	5	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
159	30	H	25	12	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	ESP
160	27	H	13	3	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
161	23	H	23	47	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
162	35	H	6	1	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
163	45	H	8	1	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
164	32	H	6	3	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
165	37	H	8	4	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
166	37	H	8	4	+	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
167	45	H	39	23	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
168	40	H	17	3	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	ESP
169	28	H	15	9	-	-	-	SI	SI	ESP	ESP	ESP
170	21	H	9	6	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
171	31	H	14	14	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
172	26	H	12	14	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	HAB
173	22	H	23	10	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
174	42	H	12	15	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
175	27	H	58	17	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
176	30	H	8	9	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
177	33	H	22	10	-	-	-	SI	SI	ESP	ESP	HAB
178	33	H	37	15	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
179	30	H	10	20	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
180	22	M	12	6	-	-	-	NO	SI	ESP	HAB	ESP
181	30	M	9	4	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
182	39	H	48	17	+	-	-	SI	SI	ESP	HAB	HAB
183	58	H	32	16	+	-	+	SI	NO	ESP	HAB	ESP
184	40	H	36	16	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	ESP
185	60	H	26	3	+	-	-	SI	NO	ESP	ESP	ESP
186	30	H	40	9	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	ESP
187	43	H	43	7	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
188	35	H	18	12	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
189	35	H	35	12	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
190	32	H	46	9	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
191	46	H	48	17	-	-	-	SI	SI	ESP	HAB	ESP
192	50	H	31	16	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
193	60	H	19	8	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
194	39	M	27	7	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
195	56	M	15	2	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
196	29	H	10	15	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
197	39	H	57	27	+	-	+	SI	NO	ESP	HAB	HAB

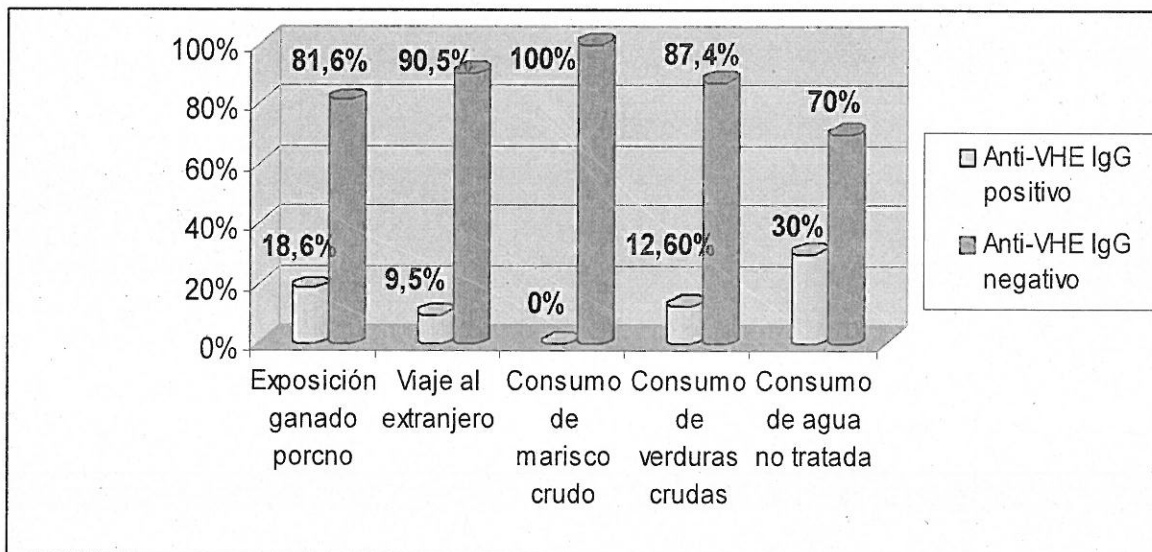
ID	EDAD	SEXO	ALT	AST	ANTI-VHE IgG	ANTI-VHE IgM	ANTI-VHE IgA	EXP	VIAJE	MAR	VERD	AGUA
198	40	H	31	15	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
199	59	H	30	11	-	-	-	SI	NO	ESP	ESP	ESP
200	47	H	16	8	-	-	-	SI	NO	HAB	ESP	ESP
201	41	H	5	11	-	-	-	SI	NO	HAB	HAB	HAB
202	48	H	24	1	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
203	53	H	12	4	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
204	48	M	16	5	+	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
205	61	H	13	1	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
206	60	H	12	5	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
207	49	H	3	4	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
208	52	H	14	2	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB
209	42	H	8	4	+	-	-	SI	SI	ESP	HAB	HAB
210	51	M	7	9	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	ESP
211	54	H	19	6	-	-	-	SI	NO	HAB	HAB	HAB
212	38	H	24	4	-	-	-	SI	NO	ESP	HAB	HAB

En cuanto a la presencia de anticuerpos anti-VHE IgG y los factores de riesgo estudiados (exposición a ganado porcino, viaje al extranjero, consumo de marisco crudo, verduras crudas y agua no tratada), se obtuvieron los siguientes resultados (Fig. 20):

- Exposición a ganado porcino: 21 individuos (18,6%) de los 113 que tenían exposición a ganado porcino y 4 individuos (4%) de los 99 sin exposición, fueron positivos frente anticuerpos anti-VHE IgG.
- Viaje al extranjero: 6 individuos (9,5%) de los 63 habían realizado un viaje al extranjero en el último año y 19 individuos (12,8%) de los 149 que no viajaron al extranjero en el último año, resultaron seropositivos. Los países visitados fueron Francia, Holanda, Alemania y Reino Unido.
- Consumo de marisco crudo: ninguno de los individuos seropositivos declaró haberlo consumido.

- Consumo de verduras crudas: 23 individuos (12,6%) de los 183 que consumían verduras crudas habitualmente y 2 personas (6,9%) de las 29 que consumían este alimento esporádicamente, fueron seropositivas.
- Consumo de agua no tratada: 12 personas (30%) de las 40 que consumían agua no tratada habitualmente y 13 individuos (7,6%) de los 172 que lo hacían esporádicamente, presentaron anticuerpos anti-VHE IgG

Fig. 20. Presencia de anticuerpos anti-VHE IgG y factores de riesgo.



El análisis estadístico de las variables estudiadas muestra que la exposición a ganado porcino es un factor de riesgo para contraer la infección por el VHE ($p=0,004$), con una OR de 5,19 y un IC entre 1,7-15,7 (tabla 13). Un individuo con contacto a ganado porcino puede llegar a tener una probabilidad de infectarse por el VHE, hasta 5,2 veces más que un individuo sin exposición.

Tabla 13. Características y factores de riesgo en la población estudiada, según la presencia o ausencia de anticuerpos anti-VHE IgG.

[OR: Odds Ratio. IC: intervalo de confianza. p: nivel de significación ($p < 0,05$: significativo)].

	Anti-VHE IgG positivo	Anti-VHE IgG negativo	p	OR	IC 95%
Sexo					
Hombre	22 (19,5%)	91 (80,5%)	0,01	7,73	2,2-26,7
Mujer	3 (3%)	96 (97%)			
Edad (años)	25 ± 7	35 ± 11			
ALT(UI/L)	21,2 ± 13,8	18,9 ± 12,1			
AST(UI/L)	11,4 ± 7,5	11,9 ± 8,1			
Exposición a ganado porcino					
No	4 (4%)	95 (96%)	0,004	5,19	1,7-15,7
Si	21 (18,6%)	92 (81,4%)			
Viaje al extranjero					
No	19 (12,8%)	130 (87,2%)	0,507	0,72	0,2-1,8
Si	6 (9,5%)	57 (90,5%)			
Consumo de Marisco crudo					
Esporádicamente	25 (12%)	184 (88%)	0,999	0	0
Habitualmente	0 (0%)	3 (100%)			
Consumo de verduras crudas					
Esporádicamente	2 (6,9%)	27 (93,1%)	0,387	1,94	0,4-8,7
Habitualmente	23 (12,6%)	160 (87,4%)			
Consumo de agua no tratada					
Esporádicamente	13 (7,6%)	159 (92,4%)	*0,008	5,24	2,2-12,6
Habitualmente	12 (30%)	28 (70%)			

La elevada tasa de individuos seropositivos (anti-VHE IgG) en el grupo de individuos expuestos a ganado porcino detectada en este estudio (18,6%), junto a la ausencia de viremia, puede sugerir que el VHE sea el responsable de infecciones subclínicas, ya que ningún individuo declaró en la encuesta epidemiológica el padecimiento de una hepatitis aguda en algún momento de su vida. En los países industrializados, los factores para que se produzca una hepatitis E aguda o una hepatitis E subclínica todavía no han sido determinados, aunque existen publicaciones en las que se apuntan como posibles factores la edad (Amon y col. 2006), una patología hepática ya existente en el momento de la infección (Pérez-Gracia y col. 2007) y/o el genotipo de la cepa (Mizuo y col. 2005).

Existen pocos estudios en el mundo que analicen la exposición a ganado porcino y la seropositividad frente al VHE, aunque casi todos describen altas prevalencias entre las personas que tienen contacto con estos animales en comparación con los grupos control (tabla 14). Así, en Taiwán, donde el VHE no está considerado como endémico, Hsieh y col. en 1999, demostraron que un 26,7% de trabajadores y veterinarios de granjas porcinas, presentaban anticuerpos anti-VHE, frente a un 8% que mostraban los individuos no expuestos a ganado porcino ($p=0,048$). En otro estudio, realizado por Drobeniuc y col, durante el año 2001 en Moldavia, se analizó la prevalencia de anticuerpos anti-VHE IgG en un grupo de 264 veterinarios del sector porcino y 255 individuos sin contacto con este ganado. Estos investigadores obtuvieron unos datos de seroprevalencia del 51,1% en el grupo de expuestos y del 24,7% en el grupo sin exposición ($p=0,035$). Los autores de estos trabajos sugieren la

hipótesis de que la ausencia de adecuadas medidas higiénico sanitarias puede favorecer la infección por el VHE en la población en contacto con cerdos.

De igual forma, en EE.UU., se han realizado dos estudios sobre la presencia del VHE en la población que tenía contacto con cerdos. En uno de ellos, Meng y col. en 2002, estudiaron en 468 veterinarios de ganado porcino y 400 donantes voluntarios, obteniendo una seroprevalencia de anti-VHE IgG del 23% en veterinarios, mientras que en los individuos no expuestos fue del 18% ($p=0,03$). En el segundo estudio, realizado por Withers y col. en ese mismo año, se detectó una seroprevalencia del 10,9% en expuestos y del 2,4% en población no expuesta ($p=0,016$).

En el ámbito europeo, también se han llevado a cabo diversos estudios. En Suecia, Olsen y col. en el año 2006, obtienen una seroprevalencia en personas expuestas del 13% y del 9,3% en individuos sin exposición ($p=0,620$). En 2007 Vulcano y col. en Italia, obtienen una seroprevalencia del 3,3% y del 2,9 % en individuos expuestos y no expuestos ($p=0,562$), respectivamente. Recientemente, en Holanda, los valores obtenidos de seroprevalencia en el grupo con exposición y sin exposición, fueron del 11% y del 2% ($p=0,042$), respectivamente (Bowknecht y col. 2007) (tabla 14).

Tabla 14. Estudios de seroprevalencia del VHE en grupos con exposición y sin exposición a ganado porcino.

[n° E: número de expuestos, n° NE: número de no expuestos, p: nivel de significación (p<0,05: significativo)].

Autor	Año del estudio	País	n° E	n° NE	Prevalencia anti-VHE IgG expuestos	Prevalencia anti-VHE IgG no expuestos	p
Hsieh S.Y.	1999	Taiwán	30	50	26,7%	8%	0,048
Drobeniuc J.	2001	Moldavia	264	255	51,1%	24,7%	0,035
Meng X.J	2002	Estados Unidos	468	400	23%	18%	0,03
Withers M.R	2002	Estados Unidos	165	127	10,9%	2,4%	0,016
Olsen B	2006	Suecia	115	108	13%	9,3%	0,62
Vulcano A.	2007	Italia	92	3511	3,3%	2,9%	0,562
Bouwknegt M.	2007	Holanda	49	153	11%	2%	0,042
Presente estudio	2008	España	113	99	18,5%	4%	0,004

Además de tener en cuenta la exposición a ganado porcino en nuestro estudio, se preguntó a estas personas por el tiempo de exposición a estos animales. La media de tiempo de contacto con cerdos en los 21 individuos seropositivos expuestos fue de 20 años (2-30 años). Este dato es superior al resultado obtenido por Whithers y col. en 2002, que detectaron un tiempo medio de exposición de 13 años. En esta publicación no se encontraron diferencias significativas entre el tiempo de exposición a ganado porcino y la presencia de

anticuerpos anti-VHE de tipo IgG, aunque sugieren que el tiempo de contacto puede ser un factor a tener en cuenta para la infección por el VHE.

La gran variedad entre las prevalencias descritas en los diferentes estudios citados, puede ser debida a la diversidad del tamaño muestral, al país donde se realiza el estudio y/o a la técnica de diagnóstico utilizada. En este contexto, se han realizado diversos estudios en países desarrollados, que analizan la variabilidad de la sensibilidad, dependiendo del ensayo utilizado para el diagnóstico serológico. Uno de estos estudios demuestra una amplia variación de sensibilidad (entre el 17% y 100%) y una concordancia entre las muestras positivas del 0% al 89% (media del 32%) (Mast y col. 1998). Los antígenos utilizados en estos enzimoimmunoensayos son péptidos sintéticos o proteínas recombinantes del VHE que difieren no sólo en longitud, sino además en la región del genoma que las codifica y en el genotipo. En este orden de cosas, Herremans y col., en 2007, mantienen que la especificidad de los ensayos que se utilizan para determinar anticuerpos anti-VHE IgM es aceptable. En cambio, para la determinación de anti-VHE IgG, la especificidad es muy variable dependiendo del ensayo utilizado. Actualmente, los ensayos serológicos comerciales tienen tapizados los pocillos con antígenos pertenecientes a cepas del genotipo 1 y 2, aunque se están desarrollando inmunoensayos con antígenos pertenecientes a cepas del genotipo 3 (Herremans y col. 2007b).

En nuestro estudio, todas las muestras que resultaron positivas a la presencia de anticuerpos anti-VHE IgG e IgM, se confirmaron mediante una prueba de inmunoblot (RECOMBLOT HEV IgG/IgM, Mikrogen, Alemania). Diversos

estudios ratifican la necesidad de utilizar esta prueba para disminuir falsos positivos y aumentar la especificidad de los estudios (Echevarria-Mayo 2006; Herremans y col. 2007a; Borgen y col. 2008).

En este estudio el consumo de agua no tratada se mostró como un factor de riesgo ($p=0,008$) con una OR de 5,24 y un IC de 2,2-12,6 (tabla 13). El consumo de agua no tratada es una práctica habitual en las distintas áreas rurales. En nuestra área de estudio (Comunidad Valenciana) existe un gran número de fuentes o pozos de agua no tratadas lo que facilita su consumo. Además, los agricultores suelen abonar los campos con fertilizantes compuestos por heces de diversos animales (generalmente de cerdo) y regarlos con agua de fosas de purines de granjas de cerdo. Este hecho puede permitir que esta agua se filtre a través de la tierra, contaminando las aguas subterráneas o acuíferos y consecuentemente el agua de fuentes cercanas a estos campos. En este orden de cosas, en la Comunidad Valenciana se ha detectado el ARN-VHE en fosas de purines en un 50% de las granjas muestreadas (Fernández-Barredo y col. 2007) por lo que estos datos sugieren que si estas aguas no son tratadas y se utilizan para regar los campos, pueden contaminar el agua de fuentes o pozos cercanos y constituir un problema emergente en Salud Pública. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser confirmada realizando estudios que detecten el VHE en aguas de fuentes. En España, sólo se ha publicado un estudio que analice el VHE en aguas residuales (Pina y col. 1998), pero no existe ninguno que lo detecte en aguas no pertenecientes a la red pública.

Once (44%) de los 25 individuos positivos a anticuerpos anti-VHE IgG, presentaron ambos factores de riesgo (exposición a ganado porcino y consumo de agua no tratada).

En lo que respecta a la variable viaje al extranjero, existen diversos estudios que describen casos esporádicos de hepatitis E en individuos que habían viajado a zonas endémicas y no endémicas. En el presente estudio, de los 25 individuos que resultaron positivos a anti-VHE IgG, solamente 6 habían viajado al extranjero. Los países visitados fueron Francia, Alemania, Holanda y Reino Unido, zonas consideradas como no endémicas, pero en los que se han descrito casos autóctonos de hepatitis E. Así, en Francia se realizó un estudio en 431 pacientes con hepatitis aguda de etiología desconocida, detectándose la presencia de anticuerpos anti-VHE IgG en un 10,7% y el ARN-VHE en un 25,4% (Mansuy y col. 2004). Asimismo, en 2006, en este mismo país se detectaron 23 casos de hepatitis E aguda (Peron y col. 2006). En Holanda, en el período de 2004-2006, se detectaron 19 casos de hepatitis aguda en personas que no habían viajado a zonas endémicas (Borgen y col. 2008). Estos individuos refirieron en la encuesta epidemiológica que consumían carne de cerdo y tenían una edad avanzada. En Reino Unido, en 2005, se han documentaron 33 casos de hepatitis E aguda (Lewis y col. 2008). En este estudio los individuos presentaban las siguientes características: consumían carne e hígado de cerdo, marisco, vegetales y agua de la red pública. En 2007, en este mismo país, Dalton y col. detectaron 333 casos de hepatitis E considerándose, 21 de ellos como hepatitis E autóctona (Dalton y col. 2007). En Alemania, también se han publicado casos de hepatitis E clínicas en individuos sin historia de viaje y debido al gran número de casos detectados en

los últimos años en este país, desde el año 2001 la hepatitis E está considerada como una enfermedad de declaración obligatoria (Preiss y col. 2006).

En España, es importante destacar, la existencia de varios casos esporádicos de hepatitis E autóctona (Sánchez y col. 2002). En Cataluña, se detectaron 10 casos esporádicos de hepatitis E sin historia de viaje a zonas endémicas, detectándose también cepas del VHE en aguas residuales de la misma zona geográfica (Buti y col. 2004). En 2006, en Madrid se describieron 18 casos de hepatitis, de las cuales 12 fueron hepatitis autóctonas y 6 importadas de países endémicos (Mateos y col. 2006). Recientemente, en España se ha documentado un caso autóctono de hepatitis E agudo en un hombre de 62 años que trabajaba en un matadero (Pérez-Gracia y col. 2007). El paciente consumía habitualmente bebidas alcohólicas, no había viajado a zonas endémicas en el último año y no consumía carne cruda. En este estudio se consiguió aislar el virus y se realizó el análisis filogenético de un fragmento de 260 pb perteneciente a la región ORF2, observándose que este aislado tenía un elevado porcentaje de homología (87,3%-97,3%) con cepas porcinas españolas y con cepas españolas de origen humano (91,5%-96,9%). El aislado pertenecía al genotipo 3, subtipo 3f.

Los estudios epidemiológicos que investigan el consumo de marisco crudo como posible factor de riesgo para contraer la infección por el VHE, se han realizado solamente en países donde es habitual el consumo de este alimento crudo o poco cocinado. En este sentido, en Japón (Koizumi y col. 2004), se

documentó un caso de hepatitis E aguda en un individuo de 56 años, que había viajado recientemente a Vietnam y que había ingerido marisco crudo durante su viaje. En este estudio, se obtuvo un aislado perteneciente al genotipo 4 con una identidad nucleotídica del 98,8% con cepas vietnamitas. En nuestro estudio, no se observó relación estadísticamente significativa entre este factor de riesgo y la presencia de anticuerpos frente a este virus. No obstante, hay que tener en cuenta que el número de individuos que consumían este alimento fue muy reducido (3%).

En cuanto a la otra variable del estudio analizada, como es el consumo de verduras crudas no hubo diferencias estadísticamente significativas con la presencia de anticuerpos frente al VHE.

Para evaluar la corrección del modelo estadístico planteado en todas las variables se realizó la prueba de bondad de ajuste de Hosmer y Lemeshow, con un resultado próximo a 1 (0,92), lo que ratifica la validez del estudio.

En países industrializados de Europa y Norteamérica, entre el 2% y el 21% de la población general presenta anticuerpos anti-VHE (tabla 15). En nuestro estudio, hemos observado en individuos sin contacto con ganado porcino (grupo control) una seropositividad del 4%. Este dato es superior al encontrado en otro estudio realizado en España, por Mateos y col. en 1998, que estimó la prevalencia de anticuerpos anti-VHE IgG en 863 donantes de sangre, obteniendo una seropositividad del 2,8%. Sin embargo, nuestro dato es menor al detectado por Buti y col. en 2006, que estimaron una prevalencia de

anticuerpos anti-VHE IgG del 7,3% (96/1.280) en población general. Aunque cabe destacar que en este estudio, no se tuvo en cuenta el contacto con ganado porcino y que las muestras positivas no fueron confirmadas mediante inmunoblot.

En otros países se han descrito valores de seroprevalencia en donantes voluntarios similares a los encontrados en nuestro estudio, como los realizados en Japón, Holanda y Francia. En Japon, Fukuda y col, en 2004 determinan una seroprevalencia de anticuerpos anti-VHE IgG del 3,9%. En 2007, estos investigadores en un estudio similar al realizado en 2004, analizaron la prevalencia de anticuerpos anti-VHE de clase IgG, IgM e IgA, obteniendo unos valores del 6%, 1,9% y 1,9%, respectivamente (Fukuda y col. 2004; Fukuda y col. 2007). En Holanda, de 644 individuos analizados se detectó una seroprevalencia del 2% (Bouwknegt y col. 2007). En Francia, Nicand y col. detectaron una prevalencia del 2,8% (Nicand y col. 2008). En cambio, en países endémicos como Egipto (Abdel Hady y col. 1998) e Indonesia (Wibawa y col. 2004), los valores de seropositividad detectados fueron más elevados, 45,2% y 20%, respectivamente (tabla 15).

Tabla 15. Estudios de seroprevalencia del VHE en donantes voluntarios en diferentes países.

[nº número de donantes].

Autor	Año del estudio	País	nº	Prevalencia anti-VHE IgG	Patrón epidemiológico
Thomas L.	1997	Estados Unidos	300	21%	Esporádico
Andel Hady Sl.	1998	Egipto	95	45,2%	Epidémico
Mateos M.L.	1998	España	863	2,8%	Esporádico
Wibawa I.D.	2004	Indonesia	1.115	20%	Epidémico
Fukuda S.	2004	Japón	5.343	3,9%	Esporádico
Kondili L.A.	2006	Albania	190	12,1%	Esporádico
Bortoliero A.L.	2006	Brasil	996	2,3%	Esporádico
Butj M.	2006	España	1.280	7,3%	Esporádico
Taremi M.	2007	Iran	399	7,8%	Esporádico
Bouwknegt M.	2007	Holanda	644	2%	Esporádico
Fukuda S.	2007	Japon	4.019	6%	Esporádico
Assarehzadegan M.A.	2007	Iran	400	11,5%	Esporádico
Mansuy J.M.	2008	Francia	529	16,6%	Esporádico
Dalton H.R	2008	Reino Unido	500	16%	Esporádico
Nicand E.	2008	Francia	2527	2,8%	Esporádico
Presente estudio	2008	España	99	4%	Esporádico

En lo que respecta a la presencia de anticuerpos anti-VHE IgM, solamente fueron detectados en una mujer de 18 años perteneciente al grupo de no exposición a ganado porcino, que no presentó anti-VHE IgG ni IgA. Esta persona no viajó al extranjero ni consumió marisco crudo, verdura cruda o agua sin tratar. No se obtuvieron valores estadísticos significativos ya que solamente existía un caso (tabla 16). La detección de estos anticuerpos es limitada debido a que solamente son detectables en la fase aguda de la enfermedad y sus niveles disminuyen rápidamente al finalizar la viremia (Seriwatana y col. 2002).

Tabla 16. Características y factores de riesgo en la población estudiada, según la presencia o ausencia de anticuerpos anti-VHE IgM.

[OR: Odds Ratio. IC: intervalo de confianza. p: nivel de significación ($p^* < 0,05$: significativo)].

	Anti-VHE IgM positivo	Anti-VHE IgM negativo	p	OR	IC 95%
Sexo					
Hombre	0 (0%)	113 (100%)	0,996	0	0
Mujer	1 (1%)	98 (99%)			
Edad (años)	18 ± 1	36 ± 10			
ALT(UI/L)	10 ± 1	20 ± 16,1			
AST(UI/L)	14 ± 1	9 ± 7,3			
Exposición a ganado porcino					
No	1 (1%)	98 (99%)	0,996	0	0
Si	0 (0%)	113 (100%)			
Viaje al extranjero					
No	1 (0,6%)	148 (99,4%)	0,997	0	0
Si	0 (0%)	63 (100%)			
Consumo marisco crudo					
Esporádicamente	1 (0,4%)	209 (99,6%)	0,999	0	0
Habitualmente	0 (0%)	2 (100%)			
Consumo de verduras crudas					
Esporádicamente	1 (3,3%)	29 (96,7%)	0,998	0	0
Habitualmente	0 (0%)	182 (100%)			
Consumo de agua no tratada					
Esporádicamente	1 (0,5%)	171 (99,5%)	0,998	0	0
Habitualmente	0 (0%)	40 (100%)			

Hasta la fecha, este estudio es el único en España, que detecta la presencia de anticuerpos anti-VHE IgA en población general. En nuestro trabajo, hemos obtenido una prevalencia de anticuerpos anti-VHE IgA del 1,4% (3/212). Esta baja prevalencia se corresponde con la ausencia de hepatitis aguda en los individuos estudiados. Varios trabajos revelan que los anticuerpos anti-VHE IgA tienen una mayor persistencia en el suero que los anticuerpos de clase IgM, por lo tanto, podrían utilizarse como un adecuado marcador diagnóstico de hepatitis E aguda (Mitsui y col. 2005; Tian y col. 2006; Elkady y col. 2007). De los 3 individuos en los que encontramos este tipo de anticuerpos, 2 (2/113, 1,7%) fueron hombres y 1 (1/99, 1%) mujer. Además, 2 individuos presentaron anticuerpos anti-VHE IgG y ninguno presentó anticuerpos anti-VHE IgM. De estas 3 personas, 2 (2/113, 1,7%) pertenecían al grupo de expuestos y 1 (1/99, 1%) al grupo de no expuestos. Todos los seropositivos habían viajado al extranjero, siendo los países visitados Francia y Holanda. Ninguno de estos individuos había consumido marisco crudo, mientras que los 3 individuos (3/183, 1,6%) seropositivos consumían verduras crudas, y solamente 1 (1/40, 2,5%) consumía agua no tratada (tabla 17). En este caso, tampoco se obtuvieron valores estadísticos significativos, debido al reducido número de seropositivos.

Tabla 17. Características y factores de riesgo en la población estudiada, según la presencia o ausencia de anticuerpos anti-VHE IgA.

[OR: Odds Ratio. IC: intervalo de confianza. p: nivel de significación (p < 0,05: significativo)].

	Anti-VHE IgA positivo	Anti-VHE IgA negativo	p	OR	IC 95%
Sexo					
Hombre	2 (1,7%)	111(98,3%)	0,996	0	0
Mujer	1 (1%)	98 (99%)			
Edad (años)	42,6± 13,8	30,7 ± 10,6			
ALT(UI/L)	35,6 ± 19,7	18,9 ± 12			
AST(UI/L)	16,6± 10,1	11 ± 7,9			
Exposición a ganado porcino					
No	1 (1%)	98 (99%)	0,796	0	0
Si	2 (1,7%)	111 (98,3%)			
Viaje al extranjero					
No	0(0%)	146 (100%)	0,997	0	0
Si	3 (4,5%)	63 (95,5%)			
Consumo de marisco crudo					
Esporádicamente	0(0%)	210 (100%)	0,999	0	0
Habitualmente	0(0%)	3 (100%)			
Consumo de verduras crudas					
Esporádicamente	0 (0%)	29 (100%)	0,998	0	0
Habitualmente	3 (1,6%)	180 (98,4%)			
Consumo de agua no tratada					
Esporádicamente	2 (1,1%)	170 (98,9%)	0,662	0	0
Habitualmente	1 (2,5%)	39 (97,5%)			

En la tabla 18, se muestra un resumen de la detección de marcadores del VHE en la población estudiada según los diferentes factores de riesgo analizados.

Tabla 18. Detección de marcadores del VHE en la población estudiada según los factores de riesgo analizados.

Factores de riesgo	Marcadores positivos del VHE			
	ARN-VHE	Anti-VHE IgG	Anti-VHE IgM	Anti-VHE IgA
Exposición ganado porcino				
SI	0 (0%)	21 (18,5%)	0 (0%)	2 (1,7%)
NO	0 (0%)	4 (4%)	1 (1%)	1 (1%)
Viaje al extranjero				
SI	0 (0%)	6 (9,5%)	0 (0%)	3 (4,7%)
NO	0 (0%)	19 (12,7%)	1 (0,6%)	0 (0%)
Consumo marisco crudo				
Habitualmente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Esporádicamente	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,4%)	3 (1,4%)
Consumo de verduras crudas				
Habitualmente	0 (0%)	23 (12,6%)	0 (0%)	3 (1,6%)
Esporádicamente	0 (0%)	2 (6,8%)	1 (3%)	0 (0%)
Consumo agua no tratada				
Habitualmente	0 (0%)	12 (30%)	0 (0%)	1 (2,5%)
Esporádicamente	0 (0%)	13 (7,5%)	1 (0,5%)	2 (1,1%)

En conclusión, este es el primer estudio en Europa que determina el consumo de agua no tratada como factor de riesgo para contraer la infección por el VHE. Además, es el primer estudio realizado en España, que analiza la presencia del VHE en personas que trabajan en contacto con el ganado sugiriendo que la infección por este virus podría tratarse como una enfermedad ocupacional en trabajadores del sector porcino y que deberían tomarse las medidas higiénico sanitarias correspondientes en este grupo para disminuir la exposición al VHE.

7. CONCLUSIONES

1. En este estudio no se ha detectado la presencia del ARN-VHE en ninguna muestra. El corto periodo de viremia y la ausencia de historial de hepatitis entre los individuos estudiados, pueden explicar la no aparición de este virus.

2. La elevada tasa de seroprevalencia descrita en el grupo de individuos expuestos a ganado porcino, junto a la ausencia de viremia, puede sugerir que el VHE sea el responsable de infecciones subclínicas.

3. La exposición a ganado porcino ha representado un factor de riesgo para la adquisición de la infección por el VHE (OR: 5,19; IC: 1,7-15,7). La infección por el VHE podría considerarse como una enfermedad ocupacional en trabajadores expuestos a ganado porcino, por lo tanto deberían tomarse las correspondientes medidas higiénico sanitarias para disminuir la exposición al VHE en este grupo.

4. El consumo de agua no tratada ha supuesto un riesgo para contraer la infección por el VHE (OR: 5,24; IC: 2,2-12,6).

5. El consumo de marisco crudo, verduras crudas y viaje al extranjero no han supuesto en este estudio, un factor de riesgo para contraer el VHE.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdel Hady, S. I., El Din, M. S., and El Din, M. E. A high hepatitis E virus (HEV) seroprevalence among unpaid blood donors and haemodialysis patients in Egypt. *J.Egypt.Public Health Assoc.* 1998; 3-4(73): 165-179.

Abdelaal, M., Zawawi, T. H., al Sobhi, E., Jeje, O., Gilpin, C., Kinsara, A., Osoha, A., and Oni, G. A. Epidemiology of hepatitis E virus in male blood donors in Jeddah, Saudi Arabia. *Ir.J.Med.Sci.* 1998; 2(167): 94-96.

Acharya, S. K., Madan, K., Dattagupta, S., and Panda, S. K. Viral hepatitis in India. *Natl.Med.J.India* 2006; 4(19): 203-217.

Aggarwal, R. Hepatitis E and pregnancy. *Indian J.Gastroenterol.* 2007; 1(26): 3-5.

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

Aggarwal, R., McCaustland, K. A., Dilawari, J. B., Sinha, S. D., and Robertson, B. H. Genetic variability of hepatitis E virus within and between three epidemics in India. *Virus Res.* 1999; 1(59): 35-48.

Agrawal, S., Gupta, D., and Panda, S. K. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Virology* 2001; 1(282): 87-101.

Ahn, J. M., Kang, S. G., Lee, D. Y., Shin, S. J., and Yoo, H. S. Identification of novel human hepatitis E virus (HEV) isolates and determination of the seroprevalence of HEV in Korea. *J.Clin.Microbiol.* 2005; 7(43): 3042-3048.

Ahn, J. M., Rayamajhi, N., Gyun, Kang S., and Sang, Yoo H. 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.* 2006; 3(56): 269-274.

Amon, J. J., Drobeniuc, J., Bower, W. A., Magana, J. C., Escobedo, M. A., Williams, I. T., Bell, B. P., and Armstrong, G. L. Locally acquired hepatitis E virus infection, El Paso, Texas. *J.Med.Virol.* 2006; 6(78): 741-746.

Anderson, D. A., Li, F., Riddell, M., Howard, T., Seow, H. F., Torresi, J., Perry, G., Sumarsidi, D., Shrestha, S. M., and Shrestha, I. L. ELISA for IgG-class antibody to hepatitis E virus based on a highly conserved, conformational epitope expressed in *Escherichia coli*. *J.Virol.Methods* 1999; 1-2(81): 131-142.

Arankalle, V. A., Chadha, M. S., Mehendale, S. M., and Tungatkar, S. P. Epidemic hepatitis E: serological evidence for lack of intrafamilial spread. *Indian J.Gastroenterol.* 2000; 1(19): 24-28.

Arankalle, V. A., Chadha, M. S., Tsarev, S. A., Emerson, S. U., Risbud, A. R., Banerjee, K., and Purcell, R. H. Seroepidemiology of water-borne hepatitis in

India and evidence for a third enterically-transmitted hepatitis agent. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1994; 8(91): 3428-3432.

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

Arankalle, V. A. and Chobe, L. P. Retrospective analysis of blood transfusion recipients: evidence for post-transfusion hepatitis E. Vox Sang. 2000; 2(79): 72-74.

Arankalle, V. A., Chobe, L. P., Joshi, M. V., Chadha, M. S., Kundu, B., and Walimbe, A. M. Human and swine hepatitis E viruses from Western India belong to different genotypes. J.Hepatol. 2002; 3(36): 417-425.

Arankalle, V. A., Chobe, L. P., Walimbe, A. M., Yergolkar, P. N., and Jacob, G. P. Swine HEV infection in south India and phylogenetic analysis (1985-1999). J.Med.Virol. 2003; 3(69): 391-396.

Arankalle, V. A., Joshi, M. V., Kulkarni, A. M., Gandhe, S. S., Chobe, L. P., Rautmare, S. S., Mishra, A. C., and Padbidri, V. S. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. J.Viral Hepat. 2001; 3(8): 223-227.

Arankalle, V. A., Paranjape, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Walimbe, A. M. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from India (1976-1993). J.Gen.Virol. 1999.80 (Pt 7): 1691-1700.

Aye, T. T., Uchida, T., Ma, X., Iida, F., Shikata, T., Ichikawa, M., Rikihisa, T., and Win, K. M. Sequence and gene structure of the hepatitis E virus isolated from Myanmar. *Virus Genes* 1993; 1(7): 95-109.

Aye, T. T., Uchida, T., Ma, X. Z., Iida, F., Shikata, T., Zhuang, H., and Win, K. M. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res.* 1992; 13(20): 3512.

Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P., and Poleschuk, V. F. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 1(20): 23-31.

Banait, V. S., Sandur, V., Parikh, F., Murugesh, M., Ranka, P., Ramesh, V. S., Sasidharan, M., Sattar, A., Kamat, S., Dalal, A., and Bhatia, S. J. Outcome of acute liver failure due to acute hepatitis E in pregnant women. *Indian J. Gastroenterol.* 2007; 1(26): 6-10.

Banks, M., Bendall, R., Grierson, S., Heath, G., Mitchell, J., and Dalton, H. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 5(10): 953-955.

Berke, T., Golding, B., Jiang, X., Cubitt, D. W., Wolfaardt, M., Smith, A. W., and Matson, D. O. Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *J. Med. Virol.* 1997; 4(52): 419-424.

Berke, T. and Matson, D. O. Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch.Virol.* 2000; 7(145): 1421-1436.

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

Boccia, D., Guthmann, J. P., Klovstad, H., Hamid, N., Tatay, M., Ciglencecki, I., Nizou, J. Y., Nicand, E., and Guerin, P. J. High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. *Clin.Infect.Dis.* 2006; 12(42): 1679-1684.

Borgen, K., Herremans, T., Duizer, E., Vennema, H., Rutjes, S., Bosman, A., Roda Husman, A. M., and Koopmans, M. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2. *BMC.Infect.Dis.* 2008; 1(8): 61-

Bortoliero, A. L., Bonametti, A. M., Morimoto, H. K., Matsuo, T., and Reiche, E. M. Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Parana , Brazil. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* 2006; 2(48): 87-92.

Boutrouille, A., Bakkali-Kassimi, L., Cruciere, C., and Pavio, N. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *J.Clin.Microbiol.* 2007; 6(45): 2009-2010.

Bouwknegt, M., Engel, B., Herremans, M. M., Widdowson, M. A., Worm, H. C., Koopmans, M. P., Frankena, K., Husman, A. M., De Jong, M. C., and DER Poel, W. H. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol.Infect.* 2007a 1-10.

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

Buisson, Y., Grandadam, M., Nicand, E., Cheval, P., Cuyck-Gandre, H., Innis, B., Rehel, P., Coursaget, P., Teysou, R., and Tsarev, S. Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria. *J.Gen.Virol.* 2000; Pt 4(81): 903-909.

Buti, M., Clemente-Casares, P., Jardi, R., Formiga-Cruz, M., Schaper, M., Valdes, A., Rodriguez-Frias, F., Esteban, R., and Girones, R. Sporadic cases of acute autochthonous hepatitis E in Spain. *J.Hepatol.* 2004; 1(41): 126-131.

Caron, M., Enouf, V., Than, S. C., Dellamonica, L., Buisson, Y., and Nicand, E. Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J.Clin.Microbiol.* 2006; 9(44): 3440-3442.

Chandler, J. D., Riddell, M. A., Li, F., Love, R. J., and Anderson, D. A. Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds. *Vet.Microbiol.* 1999; 1-2(68): 95-105.

Chapman, B. A., Burt, M. J., Wilkinson, I. D., and Schousboe, M. I. Community acquired viral hepatitis in New Zealand: a case of sporadic hepatitis E virus infection. *Aust.N.Z.J.Med.* 1993; 6(23): 722-723.

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

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

Chauhan, A., Jameel, S., Dilawari, J. B., Chawla, Y. K., Kaur, U., and Ganguly, N. K. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 1993; 8838(341): 149-150.

Chen, H. Y., Lu, Y., Howard, T., Anderson, D., Fong, P. Y., Hu, W. P., Chia, C. P., and Guan, M. Comparison of a new immunochromatographic test to enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of immunoglobulin m antibodies to hepatitis e virus in human sera. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 2005; 5(12): 593-598.

Clayson, E. T., Innis, B. L., Myint, K. S., Snitbhan, R., Vaughn, D. W., and Shrestha, M. P. Short report: relative risk of hepatitis A and E among foreigners in Nepal. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1995; 6(52): 506-507.

Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martin, M., Bofill-Mas, S., and Girones, R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg.Infect.Dis.* 2003; 4(9): 448-454.

Colson, P., Borentain, P., Motte, A., Lagrange, X., Kaba, M., Henry, M., Tamalet, C., and Gerolami, R. First human cases of hepatitis E infection with genotype 3c strains. *J.Clin.Virol.* 2007a.

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

Cooper, K., Huang, F. F., Batista, L., Rayo, C. D., Bezanilla, J. C., Toth, T. E., and Meng, X. J. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J.Clin.Microbiol.* 2005; 4(43): 1684-1688.

Corwin, A. L., Khiem, H. B., Clayson, E. T., Pham, K. S., Vo, T. T., Vu, T. Y., Cao, T. T., Vaughn, D., Merven, J., Richie, T. L., Putri, M. P., He, J., Graham, R., Wignall, F. S., and Hyams, K. C. A waterborne outbreak of hepatitis E virus

transmission in southwestern Vietnam. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1996; 6(54): 559-562.

Corwin, A. L., Tien, N. T., Bounlu, K., Winarno, J., Putri, M. P., Laras, K., Larasati, R. P., Sukri, N., Endy, T., Sulaiman, H. A., and Hyams, K. C. The unique riverine ecology of hepatitis E virus transmission in South-East Asia. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1999; 3(93): 255-260.

Cowie, B. C., Adamopoulos, J., Carter, K., and Kelly, H. Hepatitis E infections, Victoria, Australia. *Emerg.Infect.Dis.* 2005; 3(11): 482-484.

Cuyck-Gandre, H., Zhang, H. Y., Tsarev, S. A., Clements, N. J., Cohen, S. J., Caudill, J. D., Buisson, Y., Coursaget, P., Warren, R. L., and Longer, C. F. Characterization of hepatitis E virus (HEV) from Algeria and Chad by partial genome sequence. *J.Med.Virol.* 1997; 4(53): 340-347.

Cuyck-Gandre, H., Zhang, H. Y., Tsarev, S. A., Warren, R. L., Caudill, J. D., Snellings, N. J., Begot, L., Innis, B. L., and Longer, C. F. Short report: phylogenetically distinct hepatitis E viruses in Pakistan. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2000; 2(62): 187-189.

Dahiya, M., Kumar, A., Kar, P., Gupta, R. K., and Kumar, A. Acute viral hepatitis in third trimester of pregnancy. *Indian J.Gastroenterol.* 2005; 3(24): 128-129.

Dalton, H. R., Hazeldine, S., Banks, M., Ijaz, S., and Bendall, R. Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease. *Lancet* 2007; 9569(369).

Dawson, G. J., Chau, K. H., Cabal, C. M., Yarbough, P. O., Reyes, G. R., and Mushahwar, I. K. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J.Virol.Methods* 1992; 1(38): 175-186.

de Deus, N., Seminati, C., Pina, S., Mateu, E., Martin, M., and Segales, J. 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.* 2007; 2-4(119): 105-114.

Deest, G., Zehner, L., Nicand, E., Gaudy-Graffin, C., Goudeau, A., and Bacq, Y. [Autochthonous hepatitis E in France and consumption of raw pig meat.]. *Gastroenterol.Clin.Biol.* 2007; 12(31): 1095-1097.

Dong, C., Dai, X., and Meng, J. H. The first experimental study on a candidate combined vaccine against hepatitis A and hepatitis E. *Vaccine* 2007; 9(25): 1662-1668.

Drabick, J. J., Gambel, J. M., Gouvea, V. S., Caudill, J. D., Sun, W., Hoke, C. H., Jr., and Innis, B. L. A cluster of acute hepatitis E infection in United Nations Bangladeshi peacekeepers in Haiti. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1997; 4(57): 449-454.

Drobeniuc, J., Favorov, M. O., Shapiro, C. N., Bell, B. P., Mast, E. E., Dadu, A., Culver, D., Iarvoi, P., Robertson, B. H., and Margolis, H. S. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J.Infect.Dis.* 2001; 12(184): 1594-1597.

Ducancelle, A., Payan, C., Nicand, E., Le Guillou, H., Cales, P., and Lunel-Fabiani, F. Intrafamilial hepatitis E in France. *J.Clin.Virol.* 2007; 1(39): 51-53.

Echevarria-Mayo, J. M. [Identification of human acute hepatitis E infections by detection of specific IgG and IgM antibody recombinant immunoblot testing]. *Med.Clin.(Barc.)* 2006; 6(126): 238-239.

Elkady, A., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Hirashima, N., Sugiyama, M., Khan, A., Kato, H., Okumura, A., and Mizokami, M. Evaluation of anti-hepatitis E virus (HEV) immunoglobulin A in a serological screening for HEV infection. *J.Gastroenterol.* 2007; 11(42): 911-917.

Emerson, S. U. and Purcell, R. H. Hepatitis E virus. *Rev.Med.Virol.* 2003; 3(13): 145-154.

Emerson, S. U. and Purcell, R. H. Hepatitis E. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 2007; 12(26): 1147-1148.

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

Favorov, M. O., Kosoy, M. Y., Tsarev, S. A., Childs, J. E., and Margolis, H. S. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J.Infect.Dis.* 2000; 2(181): 449-455.

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

Fernández-Barredo, S., Galiana, C., Garcia, A., Vega, S., Gomez, M. T., and Perez-Gracia, M. T. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J.Vet.Diagn.Invest* 2006; 5(18): 462-465.

Fukuda, S., Ishikawa, M., Ochiai, N., Suzuki, Y., Sunaga, J., Shinohara, N., Nozawa, K., Tsuda, F., Takahashi, M., and Okamoto, H. Unchanged high prevalence of antibodies to hepatitis E virus (HEV) and HEV RNA among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan during 1991-2006. *Arch.Virol.* 2007

Fukuda, S., Sunaga, J., Saito, N., Fujimura, K., Itoh, Y., Sasaki, M., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among Japanese blood donors: identification of three blood donors infected with a genotype 3 hepatitis E virus. *J.Med.Virol.* 2004; 4(73): 554-561.

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

Gerolami, R., Moal, V., and Colson, P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N.Engl.J.Med.* 2008; 8(358): 859-860.

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

Graff, J., Nguyen, H., Yu, C., Elkins, W. R., St Claire, M., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J.Virol.* 2005; 11(79): 6680-6689.

Green, K. Y., Ando, T., Balayan, M. S., Berke, T., Clarke, I. N., Estes, M. K., Matson, D. O., Nakata, S., Neill, J. D., Studdert, M. J., and Thiel, H. J. Taxonomy of the caliciviruses. *J.Infect.Dis.* 2000.181 Suppl 2): S322-S330.

Grieco, A., Miele, L., Gasbarrini, G., and Grillo, R. Sporadic HEV hepatitis in Italy. *Gut* 2001; 4(48): 580-

Guo, H., Zhou, E. M., Sun, Z. F., and Meng, X. J. Egg whites from eggs of chickens infected experimentally with avian hepatitis E virus contain infectious virus, but evidence of complete vertical transmission is lacking. *J.Gen.Virol.* 2007; Pt 5(88): 1532-1537.

Gyarmati, P., Mohammed, N., Norder, H., Blomberg, J., Belak, S., and Widen, F. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays:

TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. *J.Virol.Methods* 2007; 1-2(146): 226-235.

Haqshenas, G., Shivaprasad, H. L., Woolcock, P. R., Read, D. H., and Meng, X. J. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J.Gen.Virol.* 2001; Pt 10(82): 2449-2462.

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

Herremans, M., Duizer, E., Jusic, E., and Koopmans, M. P. Detection of hepatitis E virus-specific IgA in genotype 1 and genotype 3 hepatitis E patients. *Clin.Vaccine Immunol.* 2007b.

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

Hirano, M., Ding, X., Li, T. C., Takeda, N., Kawabata, H., Koizumi, N., Kadosaka, T., Goto, I., Masuzawa, T., Nakamura, M., Taira, K., Kuroki, T., Tanikawa, T., Watanabe, H., and Abe, K. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *HepatoI.Res.* 2003; 1(27): 1-5.

Hofmann, H. and Holzmann, H. [Incidence of hepatitis E in Austria].
Wien.Klin.Wochenschr. 1995; 11(107): 336-339.

Hsieh, S. Y., Meng, X. J., Wu, Y. H., Liu, S. T., Tam, A. W., Lin, D. Y., and Liaw, Y. F. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. J.Clin.Microbiol. 1999; 12(37): 3828-3834.

Huang, C. C., Nguyen, D., Fernandez, J., Yun, K. Y., Fry, K. E., Bradley, D. W., Tam, A. W., and Reyes, G. R. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). Virology 1992; 2(191): 550-558.

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

Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., Toth, T. E., and Meng, X. J. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. J.Clin.Microbiol. 2002; 4(40): 1326-1332.

Humphrey, C. D., Cook, E. H., Jr., and Bradley, D. W. Identification of enterically transmitted hepatitis virus particles by solid phase immune electron microscopy. J.Virol.Methods 1990; 2(29): 177-188.

Ijaz, S., Arnold, E., Banks, M., Bendall, R. P., Cramp, M. E., Cunningham, R., Dalton, H. R., Harrison, T. J., Hill, S. F., Macfarlane, L., Meigh, R. E., Shafi, S., Sheppard, M. J., Smithson, J., Wilson, M. P., and Teo, C. G. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J.Infect.Dis.* 2005; 7(192): 1166-1172.

Inoue, J., Takahashi, M., Yazaki, Y., Tsuda, F., and Okamoto, H. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J.Virol.Methods* 2006; 2(137): 325-333.

Ishida, S., Yoshizumi, S., Miyoshi, M., Okui, T., Ishida, A., Abe, S., Otsuka, H., Okano, M., and Yonekawa, M. A cluster of hepatitis E virus infection in Hokkaido, Japan. *Jpn.J.Infect.Dis.* 2006; 2(59): 135-136.

Jardi, R., Buti, M., Rodriguez-Frias, F., and Esteban, R. Hepatitis E infection in acute sporadic hepatitis in Spain. *Lancet* 1993; 8856(341): 1355-1356.

Jary, C. and et al. Hepatitis E and meat carcasses. *Br.J.Gen.Pract.* 2005; 516(55): 557-558.

Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X. J., and Hill, V. R. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J.Virol.Methods* 2006; 1(131): 65-71.

Kabrane-Lazizi, Y., Fine, J. B., Elm, J., Glass, G. E., Higa, H., Diwan, A., Gibbs, C. J., Jr., Meng, X. J., Emerson, S. U., and Purcell, R. H. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1999; 2(61): 331-335.

Kaci, S., Nockler, K., and Johne, R. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet.Microbiol.* 2007

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

Kasorndorkbua, C., Thacker, B. J., Halbur, P. G., Guenette, D. K., Buitenwerf, R. M., Royer, R. L., and Meng, X. J. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can.J.Vet.Res.* 2003; 4(67): 303-306.

Kawai, H. F., Koji, T., Iida, F., Kaneko, S., Kobayashi, K., and Nakane, P. K. Shift of hepatitis E virus RNA from hepatocytes to biliary epithelial cells during acute infection of rhesus monkey. *J.Viral Hepat.* 1999; 4(6): 287-297.

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

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

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

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

Kondili, L. A., Chionne, P., Porcaro, A., Madonna, E., Taffon, S., Resuli, B., Taliani, G., and Rapicetta, M. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) antibody and the possible association with chronic liver disease: a case-control study in Albania. *Epidemiol.Infect.* 2006; 1(134): 95-101.

Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E., Purdy, M. A., Rozanov, M. N., Reyes, G. R., and Bradley, D. W. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 17(89): 8259-8263.

Koonin, E. V. and Ilyina, T. V. Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. *Biosystems* 1993; 1-3(30): 241-268.

Krawczynski, K. Hepatitis E. *Hepatology* 1993; 5(17): 932-941.

Krawczynski, K., Aggarwal, R., and Kamili, S. Hepatitis E. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 2000; 3(14): 669-687.

Krawczynski, K. and Bradley, D. W. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J.Infect.Dis.* 1989; 6(159): 1042-1049.

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

Kumar, R. M., Uduman, S., Rana, S., Kochiyil, J. K., Usmani, A., and Thomas, L. Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* 2001; 1(100): 9-15.

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

Lewis, H., Morgan, D., Ijaz, S., and Boxall, E. Indigenous hepatitis E virus infection in England and Wales. *BMJ* 2006; 7556(332): 1509-1510.

Li, T. C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., Kurata, Y., Ishida, M., Sakamoto, S., Takeda, N., and Miyamura, T. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg.Infect.Dis.* 2005a; 12(11): 1958-1960.

Li, T. C., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y., Wang, J. C., Engvall, H., Hammar, L., Xing, L., and Cheng, R. H. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J.Virol.* 2005b; 20(79): 12999-13006.

Li, T. C., Yamakawa, Y., Suzuki, K., Tatsumi, M., Razak, M. A., Uchida, T., Takeda, N., and Miyamura, T. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J.Virol.* 1997; 10(71): 7207-7213.

Lin, C. C., Wu, J. C., Chang, T. T., Chang, W. Y., Yu, M. L., Tam, A. W., Wang, S. C., Huang, Y. H., Chang, F. Y., and Lee, S. D. Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J.Clin.Microbiol.* 2000; 11(38): 3915-3918.

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

Lu, L., Drobeniuc, J., Kobylnikov, N., Usmanov, R. K., Robertson, B. H., Favorov, M. O., and Margolis, H. S. Complete sequence of a Kyrgyzstan swine

hepatitis E virus (HEV) isolated from a piglet thought to be experimentally infected with human HEV. *J.Med.Virol.* 2004; 4(74): 556-562.

Lu, L., Li, C., and Hagedorn, C. H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev.Med.Virol.* 2006; 1(16): 5-36.

Magden, J., Takeda, N., Li, T., Auvinen, P., Ahola, T., Miyamura, T., Merits, A., and Kaariainen, L. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. *J.Virol.* 2001; 14(75): 6249-6255.

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

Maneerat, Y., Wilairatana, P., Pongponratn, E., Chaisri, U., Puthavatana, P., Snitbhan, R., Raengsakulrach, B., Clayson, E. T., Vaughn, D. W., Kurathong, S., Pramoolsinsup, S., and Juthaputhi, A. Etiology of acute non-A, B, C hepatitis in Thai patients: preliminary study. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* 1996; 4(27): 844-846.

Mansuy, J. M., Legrand-Abravanel, F., Calot, J. P., Peron, J. M., Alric, L., Agudo, S., Rech, H., Destruel, F., and Izopet, J. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J.Med.Virol.* 2008; 2(80): 289-293.

Mansuy, J. M., Peron, J. M., Abravanel, F., Poirson, H., Dubois, M., Miedouge, M., Vischi, F., Alric, L., Vinel, J. P., and Izopet, J. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J.Med.Virol.* 2004; 3(74): 419-424.

Margulies, A., Bernuau, J., Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Dubois, F., Goudeau, A., Rueff, B., and Benhamou, J. P. Non-A, non-B fulminant viral hepatitis in France in returnees from Asia and Africa. *Dig.Dis.Sci.* 1987; 10(32): 1151-1154.

Mast, E. E., Alter, M. J., Holland, P. V., and Purcell, R. H. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 1998; 3(27): 857-861.

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

Mateos, M. L., Camarero, C., Lasa, E., Teruel, J. L., Mir, N., and Baquero, F. Hepatitis E virus: relevance in blood donors and other risk groups. *Vox Sang.* 1998; 4(75): 267-269.

Mateos, M. L., Molina, A., Ta, T. H., Moreira, V., Millicua, J. M., and Barcena, R. [Acute hepatitis E in Madrid: description of 18 cases]. *Gastroenterol.Hepatol.* 2006; 7(29): 397-400.

Mateos, M. L., Teruel, J. L., Sierra, M. P., and Gazapo, E. High prevalence of hepatitis E virus antibodies in Spanish hemodialysis patients. *Nephron* 1997; 2(76): 231-232.

Matsuda, H., Okada, K., Takahashi, K., and Mishiro, S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J.Infect.Dis.* 2003; 6(188): 944-

McCrudden, R., O'Connell, S., Farrant, T., Beaton, S., Iredale, J. P., and Fine, D. Sporadic acute hepatitis E in the united kingdom: an underdiagnosed phenomenon? *Gut* 2000; 5(46): 732-733.

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

Menendez, C., Sanchez-Tapias, J. M., Kahigwa, E., Mshinda, H., Costa, J., Vidal, J., Acosta, C., Lopez-Labrador, X., Olmedo, E., Navia, M., Tanner, M., Rodes, J., and Alonso, P. L. Prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis viruses B, C, and E in Southern Tanzania. *J.Med.Virol.* 1999; 3(58): 215-220.

Meng, X. J. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J.Hepatol.* 2000; 5(33): 842-845.

Meng, J., Dai, X., Chang, J. C., Lopareva, E., Pillot, J., Fields, H. A., and Khudyakov, Y. E. Identification and characterization of the neutralization

Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., Haynes, J. S., Thacker, B. J., and Emerson, S. U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997; 18(94): 9860-9865.

Meng, X. J., Wiseman, B., Elvinger, F., Guenette, D. K., Toth, T. E., Engle, R. E., Emerson, S. U., and Purcell, R. H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J.Clin.Microbiol.* 2002; 1(40): 117-122.

Mizuo, H., Suzuki, K., Takikawa, Y., Sugai, Y., Tokita, H., Akahane, Y., Itoh, K., Gotanda, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J.Clin.Microbiol.* 2002; 9(40): 3209-3218.

Mitsui, T., Tsukamoto, Y., Suzuki, S., Yamazaki, C., Masuko, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Tsatsralt-Od, B., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Serological and molecular studies on subclinical hepatitis E virus infection using periodic serum samples obtained from healthy individuals. *J.Med.Virol.* 2005; 4(76): 526-533.

Mitsui, T., Tsukamoto, Y., Yamazaki, C., Masuko, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Prevalence of hepatitis E virus infection among

hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J.Med.Virol.* 2004; 4(74): 563-572.

Mizuo, H., Yazaki, Y., Sugawara, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. 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.* 2005; 3(76): 341-349.

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

Mushahwar, I. K., Dawson, G. J., Bile, K. M., and Magnius, L. O. Serological studies of an enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Somalia. *J.Med.Virol.* 1993; 3(40): 218-221.

Naik, S. R., Aggarwal, R., Salunke, P. N., and Mehrotra, N. N. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull.World Health Organ* 1992; 5(70): 597-604.

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

Nanda, S. K., Panda, S. K., Durgapal, H., and Jameel, S. Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected

rhesus monkeys: evidence for viral replication. *J.Med.Virol.* 1994; 3(42): 237-240.

Nicand, E., Armstrong, G. L., Enouf, V., Guthmann, J. P., Guerin, J. P., Caron, M., Nizou, J. Y., and Andraghetti, R. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus in Darfur, Sudan, and neighboring Chad. *J.Med.Virol.* 2005; 4(77): 519-521.

Nicand, E., Bigaillon, C., and Tesse, S. [Hepatitis E: An emerging disease?]. *Pathol.Biol.(Paris)* 2008.

Nishizawa, T., Takahashi, M., Endo, K., Fujiwara, S., Sakuma, N., Kawazuma, F., Sakamoto, H., Sato, Y., Bando, M., and Okamoto, H. Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J.Gen.Virol.* 2005; Pt 12(86): 3321-3326.

Nishizawa, T., Takahashi, M., Mizuo, H., Miyajima, H., Gotanda, Y., and Okamoto, H. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome. *J.Gen.Virol.* 2003; Pt 5(84): 1245-1251.

Okamoto, H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2007

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Fukai, K., Muramatsu, U., and Yoshikawa, A. Analysis of the complete genome of indigenous swine hepatitis E virus isolated in Japan. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001; 5(289): 929-936.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Usui, R., and Kobayashi, E. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection* 2004; 1(32): 57-58.

Olsen, B., Axelsson-Olsson, D., Thelin, A., and Weiland, O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand.J.Infect.Dis.* 2006; 1(38): 55-58.

Panda, S. K. and Acharya, S. K. Hepatitis E virus infection: where are we? *Natl.Med.J.India* 1998; 2(11): 56-58.

Panda, S. K., Ansari, I. H., Durgapal, H., Agrawal, S., and Jameel, S. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J.Virol.* 2000; 5(74): 2430-2437.

Panda, S. K., Thakral, D., and Rehman, S. Hepatitis E virus. *Rev.Med.Virol.* 2007; 3(17): 151-180.

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

Pérez-Gracia MT, Rodríguez-Iglesias M. Aspectos actuales del virus de la hepatitis E (VHE). *Medicina Clínica* 2003; 121:787-792

Pérez-Gracia MT, Fernández-Barredo S, Galiana C, García A, Gómez MT, Vega S. "Virus de la hepatitis E". *Profesión Veterinaria* 2004; 59: 16-22.

Pérez-Gracia, M. T., Garcia-Valdivia, M. S., Galan, F., and Rodriguez-Iglesias, M. A. Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol.* 2004; 3(48): 197-200.

Pérez-Gracia MT. "Revisión actualizada del virus de la hepatitis E (VHE)". *Revista Salud(i)Ciencia* Vol. 16, Diciembre 2007: 1085-1089

Pérez-Gracia, M. T., Mateos, M. L., Galiana, C., Fernandez-Barredo, S., Garcia, A., Gomez, M. T., and Moreira, V. Autochthonous Hepatitis E Infection in a Slaughterhouse Worker. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2007; 5(77): 893-896.

Peron, J. M., Mansuy, J. M., Poirson, H., Bureau, C., Dupuis, E., Alric, L., Izopet, J., and Vinel, J. P. 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.* 2006; 5(30): 757-762.

Pham, B. N., Guigonis, V., Durand, F., Bernuau, J., Udin, L., and Bezeaud, A. Anti-HEV antibodies in acute hepatitis in France. *J.Hepatol.* 1994a; 5(20): 679.

Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J., and Girones, R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J.Hepatol.* 2000; 5(33): 826-833.

Pina, S., Jofre, J., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Girones, R. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage

in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl.Environ.Microbiol.* 1998; 11(64): 4485-4488.

Preiss, J. C., Plentz, A., Engelmann, E., Schneider, T., Jilg, W., Zeitz, M., and Duchmann, R. Autochthonous hepatitis E virus infection in Germany with sequence similarities to other European isolates. *Infection* 2006; 3(34): 173-175.

Psichogiou, M., Vaindirli, E., Tzala, E., Voudiclari, S., Boletis, J., Vosnidis, G., Moutafis, S., Skoutelis, G., Hadjiconstantinou, V., Troonen, H., and Hatzakis, A. Hepatitis E virus (HEV) infection in haemodialysis patients. The Multicentre Haemodialysis Cohort Study on Viral Hepatitis. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1996; 6(11): 1093-1095.

Purcell, R. H. and Emerson, S. U. Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. *J.Hepatol.* 2008

Purcell, R. H., Nguyen, H., Shapiro, M., Engle, R. E., Govindarajan, S., Blackwelder, W. C., Wong, D. C., Prieels, J. P., and Emerson, S. U. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine* 2003; 19-20(21): 2607-2615.

Renou, C., Cadranel, J. F., Bourliere, M., Halfon, P., Ouzan, D., Rifflet, H., Carencu, P., Harafa, A., Bertrand, J. J., Boutrouille, A., Muller, P., Igual, J. P., Decoppet, A., Eloit, M., and Pavio, N. Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner. *Emerg.Infect.Dis.* 2007; 7(13): 1094-1096.

Reuter, G., Fodor, D., Katai, A., and Szucs, G. Identification of a novel variant of human hepatitis E virus in Hungary. *J.Clin.Virol.* 2006; 2(36): 100-102.

Reyes, G. R., Huang, C. C., Tam, A. W., and Purdy, M. A. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch.Virol.Suppl* 1993(7): 15-25.

Reyes, G. R., Purdy, M. A., Kim, J. P., Luk, K. C., Young, L. M., Fry, K. E., and Bradley, D. W. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 4948(247): 1335-1339.

Rodríguez-Iglesias M, Pérez-Gracia MT. "Nuevos conceptos sobre el virus de la hepatitis E y su importancia creciente en los países desarrollados". *Enfermedades emergentes* 2003; 5(2):18-26

Saad, M. D., Hussein, H. A., Bashandy, M. M., Kamel, H. H., Earhart, K. C., Fryauff, D. J., Younan, M., and Mohamed, A. H. Hepatitis E virus Infection in Work Horses in Egypt. *Infect.Genet.Evol.* 2007; 3(7): 368-373.

Saeed, A. A., al Rasheed, A., Olewicz, G., and Yarbough, P. O. ELISA for diagnosis of acute sporadic hepatitis E. *Lancet* 1992; 8797(339): 882.

Sánchez, M. A., Moreno, M. E., García, Avello A., and Mateos, M. L. [Two new cases of autochthonous hepatitis E]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2002a; 3(20): 138.

Sanz, E., Moreira, V. F., Merono, E., de la, Serna C., Mir, N., and Mateos, M. L. [Acute hepatitis E in Spain]. *Gastroenterol.Hepatol.* 1999; 4(22): 180-182.

Schlauder, G. G., Desai, S. M., Zanetti, A. R., Tassopoulos, N. C., and Mushahwar, I. K. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J.Med.Virol.* 1999; 3(57): 243-251.

Schlauder, G. G., Frider, B., Sookoian, S., Castano, G. C., and Mushahwar, I. K. Identification of 2 novel isolates of hepatitis E virus in Argentina. *J.Infect.Dis.* 2000; 1(182): 294-297.

Schlauder, G. G. and Mushahwar, I. K. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J.Med.Virol.* 2001; 2(65): 282-292.

Seriwatana, J., Shrestha, M. P., Scott, R. M., Tsarev, S. A., Vaughn, D. W., Myint, K. S., and Innis, B. L. Clinical and epidemiological relevance of quantitating hepatitis E virus-specific immunoglobulin M. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 2002; 5(9): 1072-1078.

Sheikh, A., Sugitani, M., Kinukawa, N., Moriyama, M., Arakawa, Y., Komiyama, K., Li, T. C., Takeda, N., Ishaque, S. M., Hasan, M., and Suzuki, K. Hepatitis e virus infection in fulminant hepatitis patients and an apparently healthy population in Bangladesh. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2002; 6(66): 721-724.

Shrestha, S. M., Shrestha, S., Tsuda, F., Nishizawa, T., Gotanda, Y., Takeda, N., and Okamoto, H. Molecular investigation of hepatitis E virus infection in

patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. *J.Med.Virol.* 2003; 2(69): 207-214.

Shrestha, M. P., Scott, R. M., Joshi, D. M., Mammen, M. P., Jr., Thapa, G. B., Thapa, N., Myint, K. S., Fourneau, M., Kuschner, R. A., Shrestha, S. K., David, M. P., Seriwatana, J., Vaughn, D. W., Safary, A., Endy, T. P., and Innis, B. L. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N.Engl.J.Med.* 2007; 9(356): 895-903.

Singh, S., Mohanty, A., Joshi, Y. K., Deka, D., Mohanty, S., and Panda, S. K. Mother-to-child transmission of hepatitis E virus infection. *Indian J.Pediatr.* 2003; 1(70): 37-39.

Skaug, K., Hagen, I. J., and von der, Lippe B. Three cases of acute hepatitis E virus infection imported into Norway. *Scand.J.Infect.Dis.* 1994; 2(26): 137-139.

Smith, J. L. A review of hepatitis E virus. *J.Food Prot.* 2001; 4(64): 572-586.

Somani, S. K., Aggarwal, R., Naik, S. R., Srivastava, S., and Naik, S. A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J.Viral Hepat.* 2003; 6(10): 446-449.

Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T., Sato, Y., Bando, M., Fukui, E., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J.Clin.Microbiol.* 2004; 11(42): 5371-5374.

Sun, Z. F., Larsen, C. T., Dunlop, A., Huang, F. F., Pierson, F. W., Toth, T. E., and Meng, X. J. Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *J.Gen.Virol.* 2004; Pt 3(85): 693-700.

Takahashi, K., Kang, J. H., Ohnishi, S., Hino, K., and Mishiro, S. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J.Infect.Dis.* 2002; 9(185): 1342-1345.

Takahashi, K., Kang, J. H., Ohnishi, S., Hino, K., Miyakawa, H., Miyakawa, Y., Maekubo, H., and Mishiro, S. Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan. *Intervirology* 2003a; 5(46): 308-318.

Takahashi, K., Toyota, J., Karino, Y., Kang, J. H., Maekubo, H., Abe, N., and Mishiro, S. Estimation of the mutation rate of hepatitis E virus based on a set of closely related 7.5-year-apart isolates from Sapporo, Japan. *Hepatol.Res.* 2004; 4(29): 212-215.

Takahashi, M., Kusakai, S., Mizuo, H., Suzuki, K., Fujimura, K., Masuko, K., Sugai, Y., Aikawa, T., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J.Clin.Microbiol.* 2005; 1(43): 49-56.

Takahashi, M., Nishizawa, T., Miyajima, H., Gotanda, Y., Iita, T., Tsuda, F., and Okamoto, H. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J.Gen.Virol.* 2003b; Pt 4(84): 851-862.

Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K. E., and Reyes, G. R. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991; 1(185): 120-131.

Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., and Okamoto, H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J.Gen.Virol.* 2007; Pt 3(88): 903-911.

Taremi, M., Gachkar, L., MahmoudArabi, S., Kheradpezhoh, M., and Khoshbaten, M. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among male blood donors in Tabriz, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr.Health J.* 2007; 1(13): 98-102.

Taremi, M., Khoshbaten, M., Gachkar, L., EhsaniArdakani, M., and Zali, M. Hepatitis E virus infection in hemodialysis patients: a seroepidemiological survey in Iran. *BMC.Infect.Dis.* 2005; 1(5): 36.

Tarrago, D., Lopez-Velez, R., Turrientes, C., Baquero, F., and Mateos, M. L. Prevalence of hepatitis E antibodies in immigrants from developing countries. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 2000; 4(19): 309-311.

Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., and Mishiro, S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 9381(362): 371-373.

Tian, D. Y., Chen, Y., and Xia, N. S. Significance of serum IgA in patients with acute hepatitis E virus infection. *World J.Gastroenterol.* 2006; 24(12): 3919-3923.

Tolari, F., Chiaro, L. D., Card, R., Mazzei, M., Bandecchi, P., and Banks, M. Phylogenetic study of viral isolates of Swine and human hepatitis e virus. *Vet.Res.Commun.* 200630 Suppl 1): 273-276.

Tsarev, S. A., Binn, L. N., Gomatos, P. J., Arthur, R. R., Monier, M. K., Cuyck-Gandre, H., Longer, C. F., and Innis, B. L. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus isolates from Egypt. *J.Med.Virol.* 1999; 1(57): 68-74.

Tsarev, S. A., Emerson, S. U., Reyes, G. R., Tsareva, T. S., Legters, L. J., Malik, I. A., Iqbal, M., and Purcell, R. H. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 2(89): 559-563.

Tsarev, S. A., Emerson, S. U., Tsareva, T. S., Yarbough, P. O., Lewis, M., Govindarajan, S., Reyes, G. R., Shapiro, M., and Purcell, R. H. Variation in course of hepatitis E in experimentally infected cynomolgus monkeys. *J.Infect.Dis.* 1993; 6(167): 1302-1306.

Usmanov, R. K., Balaian, M. S., Dvoynikova, O. V., Alymbaeva, D. B., Zamiatina, N. A., Kazachkov, IuA, and Belov, V. I. [An experimental infection in lambs by the hepatitis E virus]. *Vopr.Virusol.* 1994; 4(39): 165-168.

Usmanov, R. K., Favorov, M. O., Vasil'eva, V. I., Aidarbekova, D. S., Karas', F. R., Iashina, T. L., Mineeva, R. M., Aslanian, R. G., Zairov, G. K., Alymbaeva, D. B., and . [A comparative study of enteral hepatitis E (non-A, non-B) in the valley and mountainous areas of Kirghizia]. *Vopr.Virusol.* 1991; 1(36): 66-69.

van der Poel, W. H., Verschoor, F., Van der, Heide R., Herrera, M. I., Vivo, A., Kooreman, M., and Roda Husman, A. M. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg.Infect.Dis.* 2001; 6(7): 970-976.

Viswanathan, R. and SIDHU, A. S. Infectious hepatitis; clinical findings. *Indian J.Med.Res.* 1957; Suppl.(45): 49-58.

Vitral, C. L., Pinto, M. A., Lewis-Ximenez, L. L., Khudyakov, Y. E., dos Santos, D. R., and Gaspar, A. M. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 2005; 2(100): 117-122.

Wang, Y. C., Zhang, H. Y., Xia, N. S., Peng, G., Lan, H. Y., Zhuang, H., Zhu, Y. H., Li, S. W., Tian, K. G., Gu, W. J., Lin, J. X., Wu, X., Li, H. M., and Harrison, T. J. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J.Med.Virol.* 2002; 4(67): 516-521.

Wibawa, I. D., Muljono, D. H., Mulyanto, Suryadarma, I. G., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: Identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus. *J.Med.Virol.* 2004; 1(73): 38-44.

Widdowson, M. A., Jaspers, W. J., van der Poel, W. H., Verschoor, F., Roda Husman, A. M., Winter, H. L., Zaaijer, H. L., and Koopmans, M. Cluster of cases of acute hepatitis associated with hepatitis E virus infection acquired in the Netherlands. *Clin.Infect.Dis.* 2003; 1(36): 29-33.

Withers, M. R., Correa, M. T., Morrow, M., Stebbins, M. E., Seriwatana, J., Webster, W. D., Boak, M. B., and Vaughn, D. W. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2002; 4(66): 384-388.

Worm, H. C., van der Poel, W. H., and Brandstatter, G. Hepatitis E: an overview. *Microbes.Infect.* 2002b; 6(4): 657-666.

Wu, J. C., Chen, C. M., Chiang, T. Y., Sheen, I. J., Chen, J. Y., Tsai, W. H., Huang, Y. H., and Lee, S. D. Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J.Med.Virol.* 2000; 2(60): 166-171.

Wu, J. C., Chen, C. M., Chiang, T. Y., Tsai, W. H., Jeng, W. J., Sheen, I. J., Lin, C. C., and Meng, X. J. Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan. *J.Med.Virol.* 2002; 4(66): 488-492.

Xia, N. S., Zhang, J., Zheng, Y. J., Ge, S. X., Ye, X. Z., and Ou, S. H. Transfusion of plasma from a blood donor induced hepatitis E in Rhesus monkey. *Vox Sang.* 2004; 1(86): 45-47.

Yajima, Y., Takahashi, N., Yamagishi, H., Kodama, A., Miyazaki, A., Sugiyama, K., Eda, Y., and Okamoto, H. [An acute hepatitis case domestically infected with a hepatitis E virus whose nucleotide sequence showed a high similarity to that from a domestic swine in Japan]. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 2003; 4(100): 454-458.

Yamamoto, T., Suzuki, H., Toyota, T., Takahashi, M., and Okamoto, H. Three male patients with sporadic acute hepatitis E in Sendai, Japan, who were domestically infected with hepatitis E virus of genotype III or IV. *J. Gastroenterol.* 2004; 3(39): 292-298.

Yarborough, P. O. Hepatitis E virus. *Advances in HEV biology and HEV vaccine approaches. Intervirology* 1999; 2-3(42): 179-184.

Yarborough, P. O., Tam, A. W., Fry, K. E., Krawczynski, K., McCaustland, K. A., Bradley, D. W., and Reyes, G. R. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *J. Virol.* 1991a; 11(65): 5790-5797.

Yarborough, P. O., Tam, A. W., Fry, K. E., Krawczynski, K., McCaustland, K. A., Bradley, D. W., and Reyes, G. R. Hepatitis E virus: identification of type-common epitopes. *J. Virol.* 1991b; 11(65): 5790-5797.

Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., and Okamoto, H. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J.Gen.Virol.* 2003; Pt 9(84): 2351-2357.

Zaaijer, H. L., Kok, M., Lelie, P. N., Timmerman, R. J., Chau, K., and van der Pal, H. J. Hepatitis E in The Netherlands: imported and endemic. *Lancet* 1993b; 8848(341): 826.

Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Kumar, R., Panda, S. K., and Jameel, S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J.Virol.* 1999; 5(73): 4074-4082.

Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Panda, S. K., and Jameel, S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J.Virol.* 1997b; 12(71): 9045-9053.

Zanetti, A. R., Schlauder, G. G., Romano, L., Tanzi, E., Fabris, P., Dawson, G. J., and Mushahwar, I. K. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J.Med.Virol.* 1999; 4(57): 356-360.

Zhao, C., Li, Z., Yan, B., Harrison, T. J., Guo, X., Zhang, F., Yin, J., Yan, Y., and Wang, Y. Comparison of real-time fluorescent RT-PCR and conventional RT-PCR for the detection of hepatitis E virus genotypes prevalent in China. *J.Med.Virol.* 2007; 12(79): 1966-1973.

Zhou, Y. H., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine* 2004; 20(22): 2578-2585.

9. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

A: adenosina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

Anti-VHE IgA: anticuerpos frente al virus de la hepatitis E de tipo

Inmunoglobulina A

Anti-VHE IgG: anticuerpos frente al virus de la hepatitis E de tipo

Inmunoglobulina G

Anti-VHE IgM: anticuerpos frente al virus de la hepatitis E de tipo

Inmunoglobulina M

ARN: ácido ribonucleico

ARNasas: ribonucleasas

ARN-VHE: ácido ribonucleico del virus de la hepatitis E.

ALT: alanina aminotransferasa

AST: aspartato aminotransferasa

B

BR: bilirrubina

C

C: citosina

cm: centímetros

D

DTT: ditiotreitól

E

EDTA: ácido etilen diamin tetra-acético

ELISA: enzimoimmunoensayo

G

G: guanina

GGT: γ -glutamyl-transferasa

I

IgG: inmunoglobulina de tipo G

IgM: inmunoglobulina de tipo M

IC: intervalo de confianza

L

LDH: lactato deshidrogenasa

M

mV: mili Voltios

MDH: malato deshidrogenasa

μ l: microlitros

N

NADH: nicotin-adenosin-dinucleotido

nested-PCR: reacción en cadena de la polimerasa anidada

nm: nanometros

O

ORF: fragmento de lectura abierta

OR: odds Ratio

P

pb: pares de bases

PM: peso molecular

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

P/V: peso/Volumen

R

RT: retrotranscripción

RT-PCR: retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa

T

T: timina

T_m: temperatura melting.

T_a: temperatura de hibridación.

V

VHE: virus de la hepatitis E

**9. PUBLICACIONES RELACIONADAS
CON LA TESIS**

